



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

MÁRCIA CRISTINA OLIVEIRA DA ROCHA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA AÇÃO  
TERAPÊUTICA DE DOCETAXEL ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS  
LIPÍDICAS SÓLIDAS EM CARCINOMA MAMÁRIO MURINO.**

Brasília

2020

MÁRCIA CRISTINA OLIVEIRA DA ROCHA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA AÇÃO TERAPÊUTICA  
DE DOCETAXEL ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS EM  
CARCINOMA MAMÁRIO MURINO.

Programa de Pós-Graduação em Nanociência  
e Nanobiotecnologia, do Instituto de Ciências  
Biológicas da Universidade de Brasília.

**Orientadora:** Profa. Dra. Sônia Nair Bão

Brasília,

2020

## *Agradecimentos*

---

A Deus, pela oportunidade de aprender, por me permitir viver tantas experiências incríveis e por não me deixar desistir nos momentos difíceis.

À minha amada mãe, por sempre me motivar e ser um exemplo diário de determinação, dedicação e amor incondicional. À minha família, pelo apoio e incentivo.

À professora e orientadora Sônia Nair Bão, pela oportunidade, orientação e ensinamentos valiosos. Agradeço por sempre me incentivar e acreditar no meu potencial, me impulsionando a buscar o meu melhor. Certamente, todos estes anos de trabalho me fizeram evoluir como profissional e também pessoalmente.

Ao professor João Paulo Longo, pelos ensinamentos, apoio, e orientação que possibilitou a execução desse trabalho. Pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pelo auxílio até mesmo quando estava na Alemanha.

À professora Patrícia Bento, pela amizade, apoio, colaborações e ensinamentos compartilhados. Admiro muito a sua dedicação. Sou extremamente grata pela sua ajuda nos momentos mais difíceis. Obrigada pelos cafés e momentos de descontração em meio aos experimentos.

À professora Irina Estrela-Lopis e seu grupo de pesquisa por ter me recebido em seu laboratório na Universidade de Leipzig, e pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

Aos professores Ricardo Bentes, Luis Muehlmann, César Grisólia e Marcelo Henrique por me permitir realizar etapas deste estudo em seus laboratórios, pelos ensinamentos e auxílio.

Ao grupo de pesquisa, laboratório de Microscopia Eletrônica, Ana Luísa, Bárbara Yasmin, Bárbara, Brígida, Bruna, Dayse, Diogo, Eloísio, Fabíola, Gabriel, Guilherme, Karen, Karine, Laís, Lorena, Matheus, Melissa, Natália, Núbia, Stephanie, Thatiane,

## Agradecimentos

---

Wellington e Weskly, meu muito obrigada pelo companheirismo, parceria e por ter tornado os momentos de trabalho mais alegres e leves.

Em especial, agradeço a Ingrid por tantos anos de amizade e apoio você foi fundamental durante essa jornada. Agradeço a Marina que me acompanha desde o início deste trabalho e sempre está pronta a me ajudar. Agradeço a amizade, os momentos dentro e fora da universidade. A Bruna Guido, por ser tão prestativa, sempre disposta a ajudar. Agradeço a oportunidade de ter aprendido tanto e por ter contribuído com a minha evolução profissional. A Bárbara Yasmin pela parceria e ajuda nos experimentos deste trabalho, sua ajuda foi muito importante.

Aos amigos do Departamento de Genética e Morfologia Rayane, Jaque Vaz, Mosar, Victor Hugo, Victor Melo, Jaqueline, Willie, Marcela, Camila, Débora, Luísa, Raquel, Henrique, Kissia, Diego Moura, Thyago e Danielle pelas importantes discussões, sugestões, ajuda nos experimentos e troca de experiências. Em especial a Karen, pela ajuda com os experimentos no HPLC. A Jaqueline Vaz pela amizade e ajuda nos experimentos *in vivo*.

Ao laboratório Micra pela parceria nos experimentos de imunohistoquímica.

À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, pela estrutura para realização deste estudo e oportunidade.

Às agências de fomento CNPq, FAPDF, FINEP e FINATEC pelo financiamento que viabiliza a realização deste trabalho.

À CAPES pela bolsa de estudos durante o doutorado e ao programa CAPES-PDSE (doutorado sanduíche) pela bolsa durante os estudos no exterior, que foram de extrema importância para a realização deste projeto.

Enfim, a todos os que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho, muito obrigada!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

“A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”  
(Albert Einstein)

“Anybody who has been seriously engaged in scientific work of any kind realizes that over the entrance to the gates of the temple of science are written the words: 'Ye must have faith.'” (Max Planck)

## Resumo

---

O câncer é um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, resultando na formação de um novo tecido chamado de tumor maligno. O câncer de mama, atualmente, é o tipo de neoplasia mais comum entre mulheres. Os tratamentos convencionais induzem toxicidade tanto em células tumorais, quanto em células normais, causando toxicidade sistêmica. Com o objetivo de tentar melhorar esta questão da falta de especificidade dos agentes terapêuticos convencionais, os estudos sobre nanobiotecnologia têm crescido. Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) com docetaxel parecem ser uma alternativa às terapêuticas convencionais. Este trabalho teve como objetivo desenvolver, caracterizar e avaliar os efeitos biológicos e a atividade terapêutica de uma formulação de nanopartículas lipídicas sólidas contendo docetaxel (NLS-DTX) em carcinoma mamário. As NLS foram produzidas usando o método de alta energia. O Compritol ATO 888 foi selecionado como matriz lipídica, o Pluronic F127 e o Span 80 como surfactantes para estabilizar a dispersão das nanopartículas. As partículas mostraram ser estáveis por pelo menos 120 dias. As NLS apresentaram tamanho médio de 120 nm, índice de polidispersão (PDI) de 0,2 e Potencial Zeta negativo (-11 mV). As NLS apresentam uma alta eficiência de encapsulação do docetaxel (DTX) (86%) e um perfil de liberação controlada do fármaco. A concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>) das nanopartículas lipídicas sólidas contendo docetaxel (NLS-DTX) em células 4T1 foi 100 vezes menor que a do fármaco livre (DTX) após 24 horas de tratamento. No teste de internalização, as NLS-DTX foram significativamente mais captadas pela célula do que o DTX livre. A quantidade de células paradas nas fases G2-M foi significativamente maior nas células tratadas com NLS-DTX (73,6%) do que nas células tratadas com DTX livre (67,8%) assim, induzindo apoptose. A análise de MET revelou que a internalização das NLS-DTX é mediada por endocitose, e a microscopia de fluorescência mostrou danos aos microtúbulos induzidos pelo DTX. Estudos *in vivo* mostraram que NLS-DTX em comparação com o docetaxel livre exibiu maior eficácia antitumoral reduzindo o volume do tumor (\*\*\*\*p<0,0001) e também preveniu metástases espontâneas nos pulmões de camundongos portadores de tumor 4T1. A análise histológica dos pulmões confirma que o tratamento com NLS-DTX foi capaz de prevenir metástase. Os níveis séricos de IL-6, expressão de ki-67 e BCL-2 foram analisados e mostraram uma redução significativa quando o fármaco encapsulado foi utilizado. Esses resultados indicam que as NLS-DTX

*Resumo*

---

podem ser um carreador promissor no tratamento do câncer de mama e na prevenção de metástase.

**Palavras-chave:** Internalização, endocitose, 4T1, NIH-3T3, IL-6, BCL-2, Ki-67 e atividade antitumoral.

## *Abstract*

---

Cancer is a group of diseases involving abnormal cell growth, resulting in the formation of a new tissue called tumor. Breast cancer, is the most common type of cancer in women. Conventional treatments induce toxicity in both tumor and normal cells, causing systemic toxicity. In aiming to improve this issue, the lack of specificity of conventional therapeutic agents, studies about nanotechnology have emerged. Docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) appears to be an alternative to conventional therapies. The aim of this study was to develop, characterize and evaluate the biological effects and therapeutic activity of a docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles (SLN-DTX) formulation in breast cancer. Solid lipid nanoparticles (SLNs) were produced using the high-energy method. Compritol 888 ATO was selected as the lipid matrix, and Pluronic F127 and Span 80 as the surfactants to stabilize nanoparticle dispersion. The particles showed high stability for at least 120 days. SLNs' dispersion size was 128 nm, their polydispersity index (PDI) was 0.2, and they showed a negative zeta potential (-11 mV). SLNs had high docetaxel (DTX) entrapment efficiency (86%) and showed a controlled drug-release profile. The half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of Docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles (SLN-DTX) in 4T1 cells was 100 times lower than that of free DTX after 24h treatment. In the cellular uptake test, SLN-DTX was more significantly taken into the cells than free DTX. The accumulation in the G2-M phase was significantly higher in cells treated with SLN-DTX (73.6%) than in cells treated with free DTX (67.8%), which induced subsequent apoptosis. TEM analysis revealed that SLN-DTX internalization is mediated by endocytosis, and fluorescence microscopy showed DTX induced microtubule damage. *In vivo* studies showed that SLN-DTX compared to free docetaxel exhibited higher antitumor efficacy by reducing tumor volume (\*\*\*\*p<0.0001) and also prevented spontaneous lung metastasis in 4T1 tumor-bearing mice. Histological studies of lungs confirmed that treatment with SLN-DTX was able to prevent metastasis. IL-6 serum levels, Ki-67 and BCL-2 expression were analyzed and showed a remarkably robust decrease when SLN-DTX was used. These results indicate that DTX-loaded SLNs may be a promising carrier to treat breast cancer and to prevent metastasis. **Keywords:** Cellular uptake, endocytosis, 4T1, NIH-3T3, IL-6, BCL-2, Ki-67 and antitumor effect.



## Lista de figuras

---

FIGURA 1 – PRINCIPAIS FATORES DE RISCO PARA O SURGIMENTO DO CÂNCER. ....	21
FIGURA 2 – (A) REPRESENTAÇÃO DE UMA GLÂNDULA MAMARIA. (B) ESQUEMA DA PROGRESSÃO TUMORAL EM CÂNCER DE MAMA.....	23
FIGURA 3 – CASCATA METASTÁTICA. MEC: MATRIZ EXTRACELULAR.....	27
FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DO DOCETAXEL. ....	29
FIGURA 5 - EFEITO DO DOCETAXEL NA FUNÇÃO DOS MICROTÚBULOS. ....	29
FIGURA 6 – PRINCIPAIS TIPOS DE NANOPARTÍCULAS.. ....	32
FIGURA 7- TRÊS MODELOS DE INCORPORAÇÃO DE FÁRMACOS EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS...	35
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO EFEITO DE PERMEABILIDADE E RETENÇÃO AUMENTADA DAS NANOPARTÍCULAS EM TUMORES. ....	36
FIGURA 9 - TRANSPORTE ATIVO EM CÉLULAS.....	38
FIGURA 10 – DESENHO EXPERIMENTAL.....	44
FIGURA 11 – DOCETAXEL SOLUBILIZADO EM ETANOL, FORMULAÇÕES DE NLS-BRANCA E NLS-DTX. ....	46
FIGURA 12 – REPRESENTAÇÃO DA OBTENÇÃO DAS NLS. ....	47
FIGURA 13 – ILUSTRAÇÃO DA TÉCNICA DE DIÁLISE <i>IN VITRO</i> . ....	51
FIGURA 14 – DESENHO EXPERIMENTAL DA EFICÁCIA <i>IN VIVO</i> DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS TRATAMENTOS.....	63
FIGURA 15 – LINHA DO TEMPO DO EXPERIMENTO DE EFICÁCIA TERAPÊUTICA <i>IN VIVO</i> . ....	64
FIGURA 16 – DESENHO EXPERIMENTAL DA BIODISTRIBUIÇÃO DOS TRATAMENTOS APÓS 6 E 24 HORAS NOS ÓRGÃOS DE CAMUNDONGOS BALB/C.....	69
FIGURA 17 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS (NLS-DTX).....	72
FIGURA 18 – DIÂMETRO HIDRODINÂMICO (DH), ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO (PDI) E O POTENCIAL ZETA DE NLS-DTX EM FUNÇÃO DO TEMPO. ....	73
FIGURA 19 – (A) DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS NLS-DTX OBTIDO PELA TÉCNICA ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS (NTA). (B) FOTO DO VÍDEO FEITO DURANTE A LEITURA DAS NANOPARTÍCULAS POR NTA. OS PONTOS BRANCOS REPRESENTAM AS NANOPARTÍCULAS. ....	74
FIGURA 20 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	75
FIGURA 21 – (A-B) CURVA DE DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO EM NANÔMETROS DAS NANOPARTÍCULAS.....	75
FIGURA 22 – CICLO DE RESFRIAMENTO E AQUECIMENTO DAS NLS.....	76

## *Lista de figuras*

---

FIGURA 23 – ESTABILIDADE POR CENTRIFUGAÇÃO. ....	77
FIGURA 24 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO DOCETAXEL. ....	78
FIGURA 25 - PERFIL DE LIBERAÇÃO DO DOCETAXEL EM NLS-DTX PELO MÉTODO DE DIÁLISE EM PH 7,4 E 5,0. ....	80
FIGURA 26 - ESPECTRO VIBRACIONAL NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO DOCETAXEL. ....	81
FIGURA 27 - ESPECTROS VIBRACIONAIS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO COMPRITOL 888 ATO, PLURONIC 127, SPAN 80, DOCETAXEL, NLS-BRANCA E NLS-DTX.....	82
FIGURA 28 - ESPECTROS VIBRACIONAIS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO DOCETAXEL E DAS FORMULAÇÕES NLS-BRANCA E NLS-DTX.....	84
FIGURA 29 - ESPECTRO DE RAMAN DO DOCETAXEL (DTX). ....	85
FIGURA 30 – ESPECTROS DE RAMAN DO DOCETAXEL E DAS FORMULAÇÕES NLS-BRANCA E NLS-DTX. ..	88
FIGURA 31 – TERMOGRAMA DAS FORMULAÇÕES NLS-DTX E NLS-BRANCA; DOCETAXEL E DOS COMPONENTES DAS FORMULAÇÕES: COMPRITOL, PLURONIC E SPAN 80.....	89
FIGURA 32 - VIABILIDADE DAS CÉLULAS 4T1 (A E B) E NIH-3T3 (C E D) APÓS 24 E 48 HORAS DE TRATAMENTO .....	93
FIGURA 33 - MORFOLOGIA DAS CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DA MAMA MURINO (4T1).....	94
FIGURA 34 - ÍNDICES DE ADESÃO CELULAR EM TEMPO REAL DAS CÉLULAS (A) 4T1 E (B) NIH3T3 AO LONGO DE 120 HORAS DE MONITORAMENTO.....	96
FIGURA 35 - GRÁFICO REPRESENTATIVO DA DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS APOPTÓTICAS.....	98
FIGURA 36 - PERFIS REPRESENTATIVOS DE CITOMETRIA DE FLUXO DA DISTRIBUIÇÃO DA FASE DO CICLO CELULAR DE CÉLULAS 4T1. ....	100
FIGURA 37 - ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DE CÉLULAS 4T1 MOSTRANDO OS EFEITOS CAUSADOS APÓS OS TRATAMENTOS NA ORGANIZAÇÃO DOS MICROTÚBULOS. ....	101
FIGURA 38 - ANÁLISE QUANTITATIVA DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DAS NLS EM ERITRÓCITOS. ....	103
FIGURA 39 - PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR CÉLULAS 4T1 APÓS OS TRATAMENTOS COM NLS-DTX, DTX E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO. ....	104
FIGURA 40 - PORCENTAGEM DE CÉLULAS 4T1 QUE APRESENTARAM FLUORESCÊNCIA APÓS INCUBAÇÃO COM NLS-FTALO.....	106

## Lista de figuras

---

FIGURA 41 - MÉDIA DA INTENSIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA DAS CÉLULAS 4T1 APÓS INTERNALIZAÇÃO DA NLS-FTALO.....	107
FIGURA 42 - INTERNALIZAÇÃO DE NLS-FTALO POR CÉLULAS 4T1 EXPOSTAS A DIFERENTES INIBIDORES DE ENDOCITOSE. C.....	108
FIGURA 43 - EXPRESSÃO RELATIVA DAS PROTEÍNAS CLATRINA E CAVEOLINA. ....	110
FIGURA 44 - ULTRAESTRUTURA DE CÉLULAS 4T1 TRATADAS COM 10 µG/ML DE NLS-DTX POR 24 HORAS. .....	112
FIGURA 45 - ESTUDOS DE CAPTAÇÃO CELULAR IN VITRO DE DTX EM CÉLULAS 4T1. ....	113
FIGURA 46 - PESO CORPORAL DOS ANIMAIS AO LONGO DO EXPERIMENTO (28 DIAS)..	115
FIGURA 47 – (A) EFEITO DOS TRATAMENTOS SOBRE O VOLUME DO TUMOR 4T1 DE CAMUNDONGOS TRATADO COM DTX (DOCETAXEL), NLS-DTX (NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDA CONTENDO DOCETAXEL), NLS-BRANCA (NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDA) E GRUPO PBS (CONTROLE COM TUMOR)..	118
FIGURA 48 - (A) FOTO DOS PULMÕES FIXADOS COM BOUIN EVIDENCIANDO NÓDULOS DE METÁSTASE PULMONAR. (B) ANÁLISE ESTATÍSTICA DO NÚMERO DE NÓDULOS DE METÁSTASE MACROSCÓPICA NOS PULMÕES. (C) HISTOLOGIA DOS PULMÕES. (D) NÍVEIS SÉRICOS DE IL-6 ANALISADO POR ELISA. ...	120
FIGURA 49 - ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DO PULMÃO. ....	123
FIGURA 50 - ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DO TUMOR. ....	124
FIGURA 51 - EFEITO DOS TRATAMENTOS NO CICLO DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS..	125
FIGURA 52 –EFEITOS DOS TRATAMENTOS SOBRE A FRAGMENTAÇÃO DO DNA EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS .....	126
FIGURA 53 - BIODISTRIBUIÇÃO DE DOCETAXEL APÓS ADMINISTRAÇÃO DE NLS-DTX E DTX LIVRE EM ÓRGÃOS DE CAMUNDONGOS BALB/C PORTADORES DE TUMOR 4T1 .....	128
FIGURA 54 - FOTOMICROGRAFIAS DA HISTOLOGIA DE CARCINOMA MAMÁRIO DE CAMUNDONGOS FÊMEAS BALB/C. ....	130
FIGURA 55 - FOTOMICROGRAFIAS DA HISTOLOGIA DO PULMÃO DE CAMUNDONGOS FÊMEAS BALB/C. ....	132
FIGURA 56 - FOTOMICROGRAFIAS DA HISTOLOGIA DO FÍGADO DE CAMUNDONGOS FÊMEAS BALB/C.....	134
FIGURA 57 - FOTOMICROGRAFIAS DA HISTOLOGIA DO RIM DE CAMUNDONGOS FÊMEAS BALB/C.....	136
FIGURA 58 - FOTOMICROGRAFIAS DA HISTOLOGIA DO BAÇO DE CAMUNDONGOS FÊMEAS BALB/C. ....	137

*Lista de tabelas*

---

TABELA 1 – LISTA DE MATERIAIS UTILIZADOS NO PROJETO.....	45
TABELA 2 - COMPONENTES DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS. ....	47
TABELA 3 - FREQUÊNCIAS VIBRACIONAIS REFERENTE AO COMPRITOL 888 ATO, PLURONIC 127, SPAN 80, DOCETAXEL, NLS-BRANCA E NLS-DTX E SUAS RESPECTIVAS ATRIBUIÇÕES. ....	83
TABELA 4 - ATRIBUIÇÕES DOS MODOS VIBRACIONAIS DE ESPECTROS DE RAMAN DO DOCETAXEL E NLS- DTX.....	86
TABELA 5 – CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC) DOS CONSTITUINTES DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS E DOCETAXEL.....	89
TABELA 6 — PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE CAMUNDONGOS BALB/C FÊMEAS PORTADORES DE CARCINOMA MAMÁRIO TRATADOS COM NLS-DTX E DTX.....	117

*Lista de abreviaturas*

---

DH – Diâmetro hidrodinâmico

DLS - Dynamic Light Scattering

DMEM – Meio de cultivo - *Eagle Modificado por Dulbecco*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DRX – Difração de raio – X

DSC - *Differential scanning calorimetry* / Calorimetria Diferencial de Varredura

DTX – Docetaxel

EDTA - Etilenodiamino tetra-acético

EPR - *Enhanced Permeability and Retention*

FTIR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier)

HER2 – Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano

IC<sub>50</sub> – *Inhibitory concentration of 50%* / Concentração Inibitória de 50%

INCA - Instituto Nacional de Câncer

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NIH-3T3 - Linhagem de fibroblasto murino

NLS – Nanopartículas lipídicas sólidas

NLS-Branca – Nanopartícula lipídica sólida sem o fármaco

NLS-DTX – Nanopartículas lipídicas sólidas com docetaxel

NLS-Ftalo – Nanopartículas lipídicas sólidas com alumínio-ftalocianina

NPs - Nanopartículas

O/A – Óleo em água

PBS - *Phosphate Buffered Saline* /Tampão fosfato-salino

PDI – Índice de polidispersão

pH – Potencial hidrogeniônico

PI – Iodeto de propídeo

RPM – Rotações por minutos

RTCA - *Real Time Cell Analysis*

SFB – Soro fetal bovino

*Lista de abreviaturas*

---

TDLU - *Terminal duct lobular unit*

4T1 – Linhagem de carcinoma mamário murino

1. INTRODUÇÃO .....	20
1.1 Câncer e aspectos epidemiológicos .....	20
1.2 Classificação quanto ao estadiamento do tumor, tipo histológico e molecular.....	22
1.3 Metástase .....	26
1.4 Diagnóstico e tratamentos.....	27
1.5 Docetaxel .....	28
1.6 Nanobiotecnologia .....	31
1.7 Nanopartículas lipídicas sólidas.....	32
1.8 Transporte de nanopartículas .....	35
1.9 Internalização de nanopartículas.....	37
3. OBJETIVOS .....	41
3.1 Objetivo Geral: .....	41
3.2 Objetivos Específicos: .....	41
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	44
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
5.1 Reagentes .....	45
5.2 Formulação de nanopartículas lipídicas sólidas.....	46
5.3 Caracterização das formulações.....	48

---

5.3.1	Determinação do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta ( $\zeta$ ) Mv .....	48
5.3.2	Análise de Rastreamento de Nanopartículas.....	48
5.3.3	Teste de centrifugação .....	49
5.3.4	Teste – ciclo aquecimento e resfriamento.....	49
5.3.5	Microscopia eletrônica de transmissão (MET) .....	49
5.3.6	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	50
5.3.7	Condições de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação do docetaxel .....	50
5.3.8	Análise do perfil de liberação de DTX .....	51
5.3.9	Teste de eficiência de encapsulação.....	52
5.3.10	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR).....	52
5.3.11	Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	53
5.3.12	Espectroscopia Raman .....	53
5.4	Ensaio <i>in vitro</i> .....	53
5.4.1	Cultura celular.....	53
5.4.2	Tratamento <i>in vitro</i> .....	54
5.4.3	Teste de viabilidade celular.....	54
5.4.4	Dinâmica de proliferação celular pelo sistema RTCA.....	55
5.4.5	Morfologia celular.....	56



---

5.4.6	Análise do conteúdo de DNA por marcação com iodeto de propídio (PI).....	56
5.4.7	Caracterização da morte celular induzida pelas NLS .....	57
5.4.8	Ensaio hemolítico.....	58
5.4.9	Ensaio de internalização com NLS-FTALO por citometria de fluxo .....	59
5.4.10	Vias de internalização por citometria de fluxo .....	60
5.4.11	Análise da internalização de NLS-DTX por Microscopia Eletrônica de Transmissão em células 4T1 .....	60
5.4.12	Internalização de docetaxel em células 4T1 ( <i>uptake</i> ) por HPLC..	61
5.4.13	Análise de espécies reativas de oxigênio .....	61
5.4.14	Ensaio de imunofluorescência .....	62
5.5	Ensaio <i>in vivo</i> .....	62
5.5.1	Manutenção dos animais .....	62
5.5.2	Indução tumoral e tratamento – Experimento eficácia.....	63
5.5.3	Testes bioquímicos e hematológicos.....	65
5.5.4	Obtenção e processamento do material.....	64
5.5.5	Histologia .....	66
5.5.6	Imunohistoquímica.....	66
5.5.7	Quantificação de interleucina (IL-6).....	67

---

5.5.8	Avaliação de genotoxicidade de células da medula óssea por fragmentação de DNA e ciclo celular.....	68
5.5.9	Biodistribuição.....	69
5.6	Análise estatística.....	70
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
6.1	Caracterização.....	71
6.1.1	Características coloidais e estabilidade das nanopartículas lipídicas sólidas.....	71
6.1.2	Quantificação de docetaxel nas NLS por CLAE.....	77
6.1.3	Perfil de liberação do docetaxel da NLS-DTX.....	78
6.1.4	Espectroscopia no infravermelho com transformada de <i>Fourier</i> (FTIR).....	80
6.1.5	Espectroscopia Raman.....	85
6.1.6	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	88
6.2	Testes <i>in vitro</i> .....	91
6.2.1	Teste de viabilidade das células 4T1 após 24 e 48 horas de tratamento com as NLS-DTX e DTX.....	91
6.2.2	Morfologia celular.....	93
6.2.3	Perfil de proliferação das células NIH-3T3 e 4T1 após tratamento com DTX, NLS-Branca, NLS-DTX em Tempo Real.....	95
6.2.4	Morte celular.....	96

---

6.2.5	Ciclo celular .....	98
6.2.6	Efeitos do DTX nos microtúbulos de células 4T1 .....	100
6.2.7	Hemólise.....	102
6.2.8	Espécies reativas de oxigênio.....	103
6.2.9	ESTUDO DE INTERNALIZAÇÃO COM NLS-FTALO.....	105
6.2.9.1	Internalização da NLS-FTALO na linhagem 4T1 .....	105
6.2.10	ESTUDO DE INTERNALIZAÇÃO COM NLS-DTX .....	110
6.3	Testes <i>in vivo</i> .....	113
6.3.1	Peso corpóreo .....	114
7.	CONCLUSÕES .....	138
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	140

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Câncer e aspectos epidemiológicos**

Câncer é definido como um conjunto de doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado de células anormais. Esse comportamento é atribuído à múltiplas alterações na expressão gênica que conduzem a um desequilíbrio na proliferação e morte celular (INCA, 2019).

Ao considerar os tipos de câncer, o de mama, atualmente, é o tipo de neoplasia mais comum entre mulheres, sendo o principal fator de morte por câncer em países desenvolvidos e o segundo principal fator em países em desenvolvimento. Para o Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) em 2019, foram esperados 60.000 novos casos de câncer de mama (INCA, 2019).

O aumento dos casos de câncer está associado a alguns fatores como, o crescimento e envelhecimento populacional, obesidade, tabagismo, sedentarismo, menarca precoce, menopausa tardia, ingestão de álcool, exposição à radiação, histórico familiar e etc. (Figura 1). Prática de atividade física associada à alimentação saudável são fatores associados a uma redução de 30% do risco de desenvolver câncer de mama. A idade é um fator de risco, e isso quer dizer que o câncer de mama, quando observado em mulheres jovens, apresenta características clínicas e epidemiológicas bem diferentes das observadas em mulheres mais velhas. Neste caso, em mulheres mais jovens, a doença costuma ser mais agressiva, apresentando uma alta taxa de mutação dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, além da superexpressão do gene do fator de crescimento epidérmico humano receptor 2 (HER2) que são os tipos de câncer de mama hereditário (INCA, 2019).



**Figura 1** – Principais fatores de risco para o surgimento do câncer.

A detecção precoce do câncer favorece a sobrevivência das mulheres e, por isso, é necessário realizar mapeamento de risco e identificar a neoplasia em estágio inicial (WHO, 2017). No Brasil, a detecção precoce do câncer de mama representa uma barreira a ser superada. Ainda existem fatores que dificultam a detecção, como as condições econômicas, a extensão territorial e a desigualdade no acesso aos serviços de saúde. São necessárias melhorias nas políticas públicas voltadas à saúde da mulher para ter uma qualidade na assistência e êxito na prevenção e controle do câncer de mama (ZAPPONI *et al.*, 2010).

## **1.2 Classificação quanto ao estadiamento do tumor, tipo histológico e molecular**

O estadiamento é importante durante a descoberta da doença e início do tratamento, e dessa forma pode-se saber em qual estágio a doença está, e qual o melhor tratamento. A classificação de estadiamento clínico mais utilizada são da *American Joint on Cancer* (AJCC) e da União Internacional Contra o Câncer (UICC). Esta se baseia no sistema de classificação do estadiamento tumor-nódulo metástase (TNM) que usa três critérios: o próprio tumor, os linfonodos regionais ao redor do tumor, e se o tumor se espalhou para outras partes do corpo (AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 2010). TNM é a abreviatura em inglês de tumor (**T**), linfonodo (**N**) e metástase (**M**):

**T** – Indica o tamanho do tumor primário.

**N** – Descreve se existe disseminação da doença para os linfonodos regionais.

**M** – Indica se existe presença de metástase.

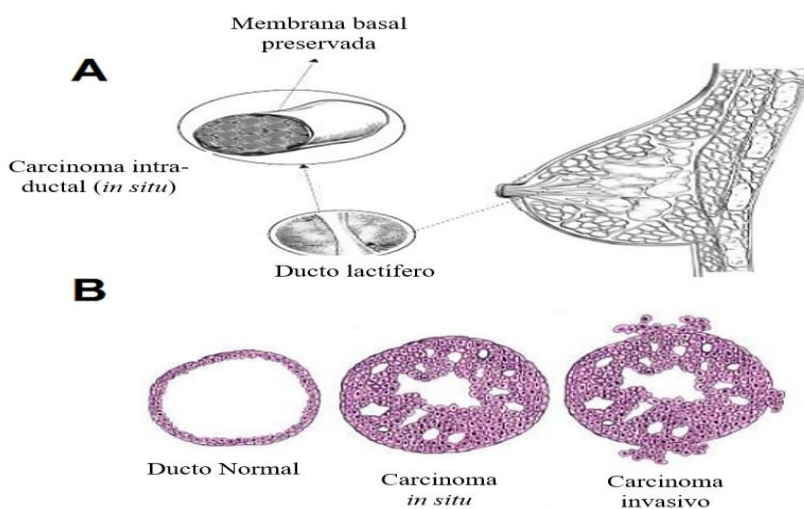
Alguns parâmetros determinam o prognóstico do câncer de mama e são classificados quanto ao tipo histológico. Estes parâmetros são: o tamanho do tumor, o tipo e grau histológico, morfologia, acometimento dos linfonodos auxiliares, a velocidade de proliferação tumoral e a competência imunológica do portador da doença (SENISKI, 2008; CHENG, 2012).

Na fase inicial, quando ainda não existe a presença de nódulos palpáveis, as alterações teciduais promovem um acúmulo de cálcio, o que permite a identificação pelo exame de mamografia. O acúmulo de cálcio pode indicar o câncer em fase precoce, quando iguais ou menores que um centímetro de diâmetro (BARROS, 2001; BRASIL, 2013).

## Introdução

Os tumores são denominados de acordo com o nome do tecido de onde se originam. Assim, a maioria dos cânceres de mama são denominados carcinomas, por terem origem epitelial, na região final dos ductos que se associam às estruturas acinares (Figura 2 – A). Esta região é chamada de unidade terminal ducto-lobular (TDLU) que são consideradas as unidades funcionais da mama (SENISKI, 2008; FIGUEROA *et al.*, 2014).

Quando não existe invasão tecidual do estroma pelas células malignas o carcinoma é chamado *in situ*. O carcinoma ductal *in situ* (CDIS) é descrito como lesão precursora do câncer invasivo, em que as células neoplásicas, apesar de não ultrapassarem a membrana basal, possuem a tendência à progressão para forma invasiva. Se as células tumorais são provenientes do ducto mamário é chamado de carcinoma ductal, se for oriunda do lóbulo mamário é chamado de carcinoma lobular. No carcinoma ductal invasor a proliferação invade a membrana basal e o tecido adjacente. Este é o mais frequente em mulheres, são tumores sólidos, firmes, com consistência arenosa e pouco circunscritos (Figura 2 - B). (OLIVEIRA & SILVA 2010).



**Figura 2** – (A) Representação de uma glândula mamaria. (B) Esquema da progressão tumoral em câncer de mama. Fonte: SENISKI, 2008.

## Introdução

---

Pesquisadores analisaram mais de 8 mil genes e identificaram seis subtipos moleculares de câncer de mama: luminal A, luminal B, superexpressão de HER-2, basaloide e mama-normal símile (PEROU *et al.*, 2000; SØRLIE *et al.*, 2001) e Claudin-low (HERSCHKOWITZ *et al.*, 2007). A detecção destes pode ser feita por imunohistoquímica. São investigadas a expressão de receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR), receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2) e Ki-67.

Os subtipos luminais são chamados assim por as células neoplásicas possuem similaridade com as células mamárias normais, que ficam em contato direto com o lúmen dos ductos mamários, chamadas células luminais. O subtipo molecular luminal A, corresponde cerca de 30 a 40% dos casos e em relação aos demais tipos de câncer de mama, representa o melhor prognóstico. São tumores bastante sensíveis à hormonioterapia. Em sua maioria, são tumores que apresentam baixo grau histológico, receptores de estrogênio positivo (RE) e ou receptor de progesterona (RP) e negativos para HER-2. O índice de Ki-67 evidencia baixa taxa de proliferação (<14%) de células neoplásicas imunomarcadas (WEIGEL & DOWSETT, 2010). Já o subtipo luminal B, corresponde cerca de 20 a 30% dos carcinomas de mama. Estes são receptores hormonais positivos para RE e para HER-2, e possui ki67 mais elevado (>14%) que o luminal A. É sensível a hormonioterapia e caso seja HER-2 positivo, a terapia com trastuzumab pode ser aplicada (PRAT & PEROU, 2011).

O subtipo superexpressão de HER-2 é assim denominado por possuir elevada expressão da oncoproteína HER-2 e na maioria dos casos é negativo para receptores hormonais. Possui de 15 a 20% dos casos (SØRLIE *et al.*, 2001). Está associado ao segundo pior prognóstico em comparação aos outros subtipos moleculares, porém houve



## Introdução

---

uma melhora acentuada no prognóstico dos pacientes, com a introdução da terapia-alvo anti-HER-2, com transtuzumab combinado com quimioterapia (RAKHA *et al.*, 2010; VODUC *et al.*, 2010).

O subtipo basaloide, é caracterizado pela expressão de vários genes expressos em células basais/mioepiteliais. É negativo para receptores hormonais, quanto para a superexpressão de HER-2, portanto este tipo não se beneficia do uso de transtuzumabe (CHEANG *et al.*, 2008). Devido à ausência de imunomarcção de RE, RP e HER-2, estes são chamados por alguns autores como “tumores triplo-negativos”, porém, sabe-se que parte dos tumores triplo-negativos não são equivalentes aos basaloídes, podendo ser classificados como “tumores triplo negativos não basaloídes” (KENNECKE *et al.*, 2010).

O subtipo mama-normal *símile* ou *normal-like* possuem elevada expressão de genes comuns às células epiteliais normais da mama, às células adiposas e outras células estromais. Estes são normalmente negativos para os marcadores tumorais usuais (CIRQUEIRA *et al.*, 2011).

O subtipo *claudin-low*, são tumores triplo-negativos e sua frequência é estimada em 5% dos casos em comparação aos outros subtipos. Estes possuem baixa expressão de genes das claudinas 3, 4 e 7 e perda de E-caderina (HERSCHKOWITZ *et al.*, 2007). Possuem origem a partir de células muito próximas hierarquicamente às primitivas células tronco-mamárias. Demonstram um aumento na expressão de marcadores de transição epitélio-mesenquima, marcadores endoteliais e linfocíticos e marcadores relacionados a células tronco tumorais, como CD44+/CD24-. Demonstra um padrão imunofenotípico triplo-negativo não basaloide e não possui ainda marcadores imunohistoquímicos protocolados para a sua caracterização e nem terapêutica específica (PRAT *et al.*, 2010).

O antígeno Ki-67 (gene de proliferação celular MKI67) é descrito como excelente marcador da atividade proliferativa. Este marcador em elevados níveis de expressão nas células neoplásicas tem associação com um aumento do risco de recorrência da doença, uma vez que é específico para um antígeno nuclear expresso apenas em células em proliferação. A alta expressão da proteína ki-67 está associada positivamente com um tumor de pouca diferenciação, tamanho do tumor, ao maior grau de invasão e com o comprometimento de linfonodos axilares, indicando pior prognóstico (DOWSETT *et al.*, 2011).

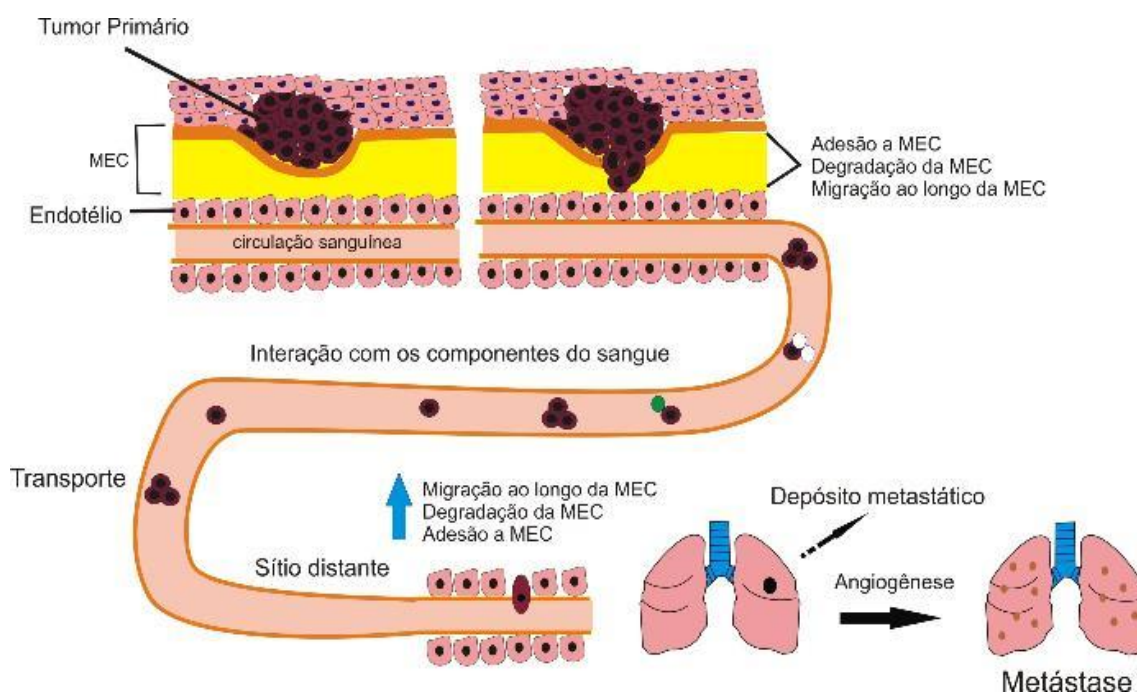
### **1.3 Metástase**

No câncer de mama, em 90% dos casos, a maior causa de morte não é devido ao tumor primário, mas devido a formação de metástases (SCULLY *et al.*, 2012).

O câncer de mama tem início com a formação de uma atipia epitelial benigna ou hiperplasia ductal que são lesões que possuem proliferação aumentada e que pode progredir para um carcinoma *in situ*, que pode se transformar em invasivo. Neste processo as células normais se transformam em células tumorais por causa de mutações e de fatores epigenéticos que regulam vias importantes, ocasionando proliferação exacerbada (CHATTERJEE & MCCAFFREY, 2014). Com este descontrole celular, as células tumorais podem se desprender do tumor primário e invadir tecidos distantes ou adjacentes, ocasionando em metástase. Este processo pode ser descrito com uma cascata de eventos como demonstrado na Figura 3. Durante este processo, as células interagem com o seu microambiente tumoral formando uma rede complexa com macrófagos, fibroblastos e induzindo a formação de novos vasos sanguíneos e linfáticos.

## Introdução

Os locais mais frequentes de metástase para o câncer de mama, embora não haja locais preferenciais, são pulmões, ossos, fígado e cérebro. No câncer de mama, os pulmões são um local frequente de metástase e cerca de 55% dos pacientes evoluem para óbito por complicações pulmonares. O tratamento padrão neste caso é a quimioterapia e a imunoterapia ( ROSENBERG, *et al.*, 1986; MARTIN, 2015;).



**Figura 3** – Cascata metastática. MEC: Matriz extracelular. HILLAIREAU & COUVREUR, 2009.

### 1.4 Diagnóstico e tratamentos

O diagnóstico precoce do câncer de mama é muito importante, pois o tratamento mais adequado e preciso pode ser adotado. Os exames diagnósticos de câncer de mama mais comuns são: autoexame da mama, mamografia, cintilografia, ultrassonografia e

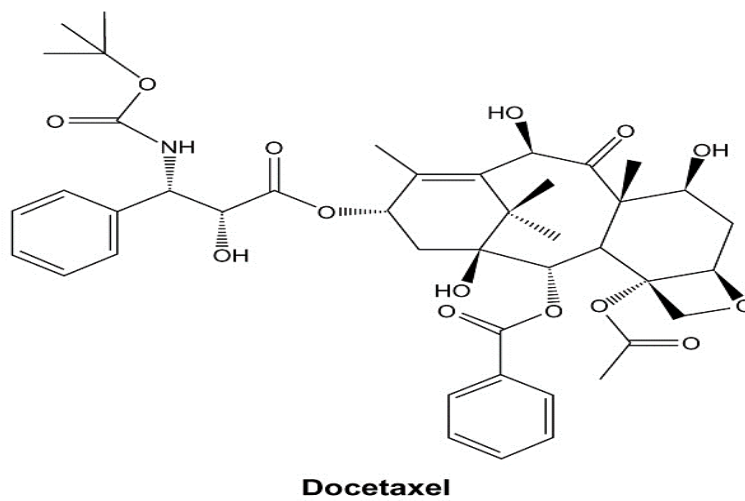
## Introdução

---

ressonância (MARTIN, 2015). Atualmente, a abordagem terapêutica é realizada por uma equipe multidisciplinar visando o tratamento integral do paciente e melhor qualidade de vida, durante e após o tratamento, o que inclui reabilitação funcional e suporte psicológico. O tratamento consiste em cirurgia, quimioterapia neoadjuvante ou adjuvante, radioterapia, hormonioterapia e a imunoterapia que utiliza anticorpos monoclonais, como o transtuzumab e o bevacizumab (CHEUK *et al.*, 2017).

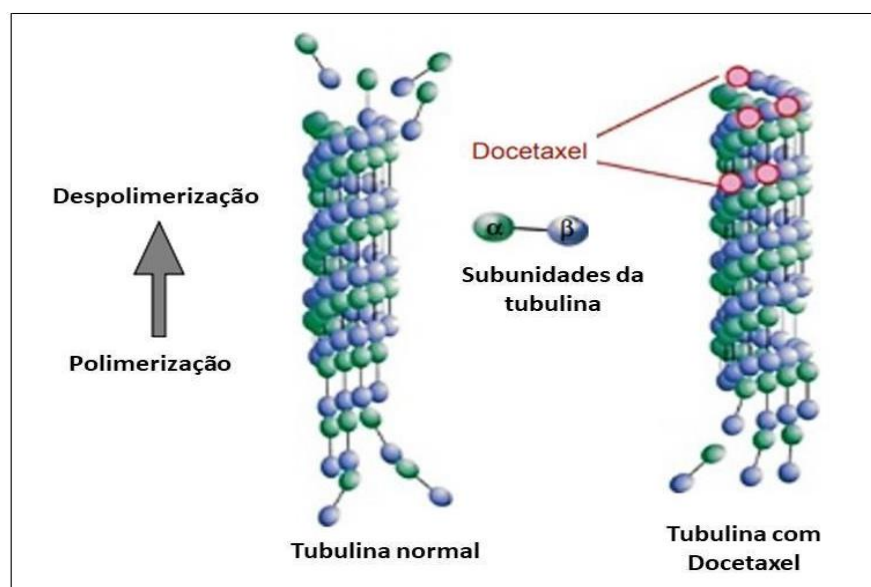
### 1.5 Docetaxel

A quimioterapia vem sendo a opção de escolha no tratamento em alguns casos de câncer de mama, diminuindo a chance de recidiva e aumentando a sobrevida dos pacientes. Dentre os quimioterápicos, o docetaxel (DTX), comercialmente chamado de Taxotere<sup>®</sup> é um taxano semissintético e um quimioterápico lipofílico utilizado amplamente no tratamento do câncer de mama (Figura 4). É um fármaco que faz parte do grupo farmacológico denominado “taxanos”. Possui este nome por ser derivado de uma substância natural encontrada na casca da *Taxus baccata* (teixo), uma árvore que produz taxinas (substância tóxica) e taxol (substância medicinal). Foi demonstrada eficácia em vários tipos de tumores, incluindo pulmão, mama, ovários, melanoma, leucemia e etc. (LIU, 2011). O DTX consta na lista Modelo de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial da Saúde como um dos principais quimioterápicos necessários para manutenção da saúde pública (WHO, 2017).



**Figura 4** – Estrutura química do docetaxel.

Os taxanos possuem ação antimetabólica, atuando na estabilização dos microtúbulos em G2/M do ciclo celular. O docetaxel se liga aos microtúbulos, impedindo o processo de polimerização e, assim, impedindo o processo de divisão celular, levando à apoptose da célula tumoral (Figura 5) (SOHAIL *et al.*, 2018).



**Figura 5** - Efeito do docetaxel na função dos microtúbulos (SOHAIL *et al.*, 2018).

Os microtúbulos são formados por proteínas heterodiméricas, constituídas por duas subunidades  $\beta$  e  $\alpha$  tubulina. As duas subunidades são organizadas por ligações de hidrogênio, formando os microtúbulos com arranjo regular em cilindros. Os microtúbulos são importantes no processo de divisão celular, além de formar o citoesqueleto, o qual determina a forma das células e a posição das organelas. Os microtúbulos são considerados importantes alvos para atuação de agentes quimioterápicos devido a sua versatilidade e importância no crescimento celular (SCATTOLIN, 2015). Outro mecanismo de ação possível do docetaxel é o efeito sobre a proteína BCL-2. A expressão do oncogene BCL-2 protege as células tumorais evitando a apoptose, dessa forma o docetaxel age na fosforilação da proteína levando a perda da função anti-apoptótica (LEUNG, 2001).

Embora o docetaxel seja eficaz, seu uso está relacionado à efeitos adversos como distúrbios neurosensoriais, hipersensibilidade, dermatite, mucosite, mialgia e toxicidade pulmonar (HANNA, *et al.*, 2008). Estes efeitos já foram documentados em estudos clínicos de fase II e III, são previstos e manejados adequadamente quando utilizados, mas ainda assim geram desconforto, o que impacta na qualidade de vida do paciente (JAIN *et al.*, 2016). Além disso, o docetaxel tem limitações como desenvolvimento de resistência pelas células tumorais; baixa solubilidade em meio aquoso, o que leva o uso do diluente polissorbato 80 (relacionado à causa de hipersensibilidade); rápida atividade fagocítica; *clearance* renal e distribuição não-seletiva (DOU *et al.*, 2014). O uso do docetaxel encapsulado é uma estratégia interessante para melhorar a eficácia e minimizar os efeitos adversos causados pelo fármaco.

## 1.6 Nanobiotecnologia

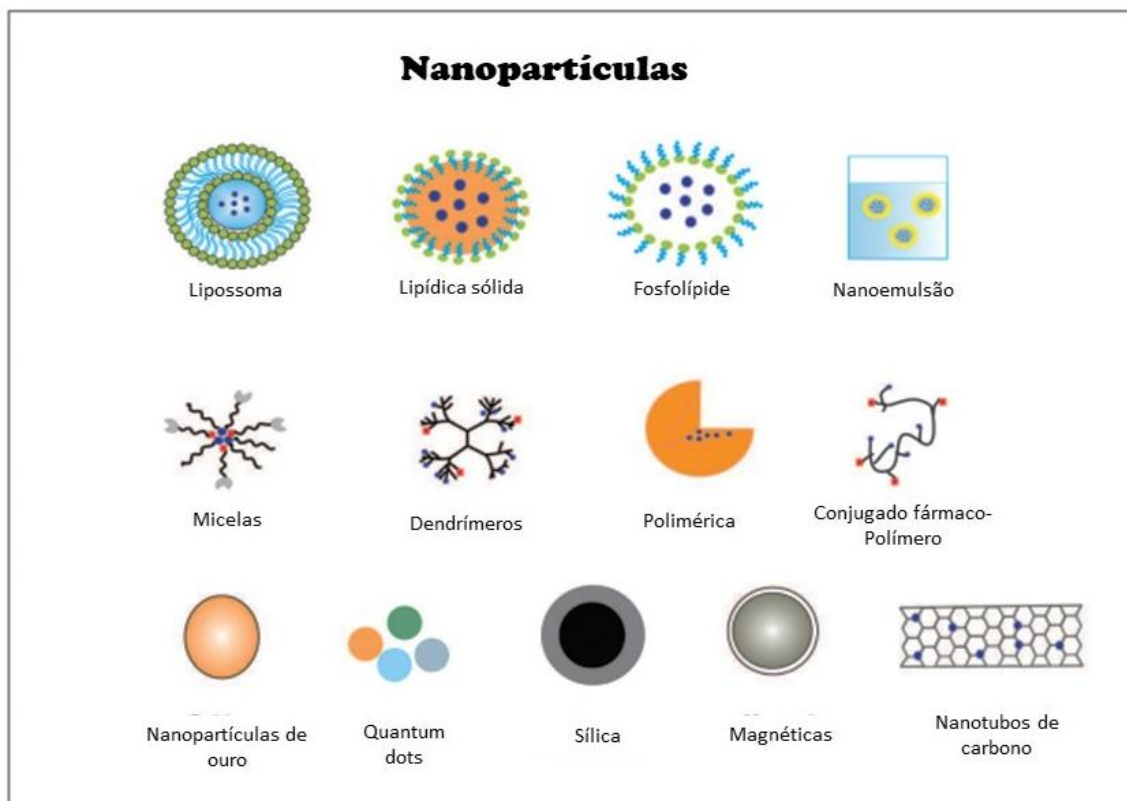
O estudo de nanopartículas como carreadoras de fármacos é um campo de pesquisa promissor para desenvolvimento de terapia contra o câncer. A quimioterapia convencional entrega o fármaco indiscriminadamente nas regiões de tecido tumoral e sadio. Com o objetivo de reduzir os efeitos adversos e melhorar as terapêuticas, algumas estratégias são adotadas por meio da nanobiotecnologia, como: (PENTENERO, 2016)

- Proteção do fármaco contra a degradação prematura;
- Direcionamento do fármaco para a região desejada;
- Melhora no perfil de liberação do fármaco;
- Redução da toxicidade do tratamento;
- Vantagem de fornecer liberação sustentada do fármaco;
- Maior tempo de circulação sistêmica;
- Redução na frequência de administração do fármaco;
- Possibilidade de incorporar substâncias hidrofóbicas e lipofílicas.

O termo sistemas de entrega de fármaco (*Drug Delivery Systems*) começou a ser utilizado em 1960. A ideia foi de melhorar a eficácia dos tratamentos contra várias doenças por ter a capacidade de se deslocar para o alvo terapêutico, poupando fisiologicamente as células e tecidos saudáveis, melhorando a qualidade de vida do paciente e potencializando a ação do princípio ativo (SAFARI & ZARNEGAR, 2014). Em 2005, ficou disponível para a terapia de câncer, nanopartículas com o fármaco paclitaxel (SUNG *et al.*, 2007).

Nanopartículas podem ser preparadas por diferentes métodos e possuem diferentes constituições que incluem as feitas com materiais biodegradáveis, como nanopartículas lipídicas sólidas e nanoemulsões; nanocarreadores tais como,

nanopartículas poliméricas, micelas, dendrímeros; e inorgânicas como, nanotubos de carbono, nanopartículas de ouro, magnéticas, quantum dots e etc. (Figura 6) (ROCHA, *et al.*, 2016).



**Figura 6** – Principais tipos de nanopartículas. Fonte: ROCHA *et al.*, 2016.

### 1.7 Nanopartículas lipídicas sólidas

Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foram apresentadas em 1991 pela primeira vez como carreadores alternativos aos sistemas carreadores coloidais tradicionais, tais como emulsões, lipossomas e poliméricas (ROSTAMI, 2014). A utilização de lipídios sólidos é interessante para o desenvolvimento de carreadores de liberação controlada de



## Introdução

---

fármacos, devido ao fato da mobilidade do fármaco ser mais lenta nos lipídios sólidos, o que evita uma liberação muito rápida dos fármacos (DOKTOROVOVA et al., 2014).

A matriz das NLS é composta por lipídeos que são sólidos em temperatura ambiente e corporal. O termo lipídeo inclui triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos, ceras e ácidos graxos. Todas as classes de tensoativos têm sido utilizadas para estabilizar a dispersão lipídica e a escolha depende da via de administração (ROSTAMI, 2014).

As vantagens das NLS compreendem ao fato da matriz lipídica ser composta de lipídeos biodegradáveis que diminuem a toxicidade aguda e crônica, do fator da matriz sólida proteger as moléculas dos fármacos incorporados contra a degradação química, além de apresentarem custo relativamente baixo, possibilidade de produção em larga escala, não utilização de solventes orgânicos no preparo, possibilidade de liberação controlada do fármaco, amplo espectro de aplicação (oral, intravenosa, dérmica, oftálmica) e possui viável incorporação de fármacos lipofílicos e hidrofílicos (DOKTOROVOVA et al., 2014).

Como as NLS, são sistemas carreadores indicados para fármacos lipofílicos, podem ser consideradas uma alternativa promissora para o transporte do docetaxel. (HU et al., 2005). NAGUIB et al., (2014), demonstraram uma terapia com docetaxel encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas para tratamento de câncer de mama, a qual reduziu a área de nódulos tumorais em estudos *in vivo*. O uso de nanopartículas lipídicas sólidas carreadoras de docetaxel tem atraído um grande número de pesquisas com o objetivo de reduzir a toxicidade sistêmica do docetaxel, enquanto este mantém sua atividade anticâncer (ZHANG, et al., 2010; GAO, et al., 2011; YUAN, et al., 2014). Nesse sentido, a utilização do docetaxel encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas poderia contribuir para a investigação do seu efeito e potencial em câncer de mama.

## *Introdução*

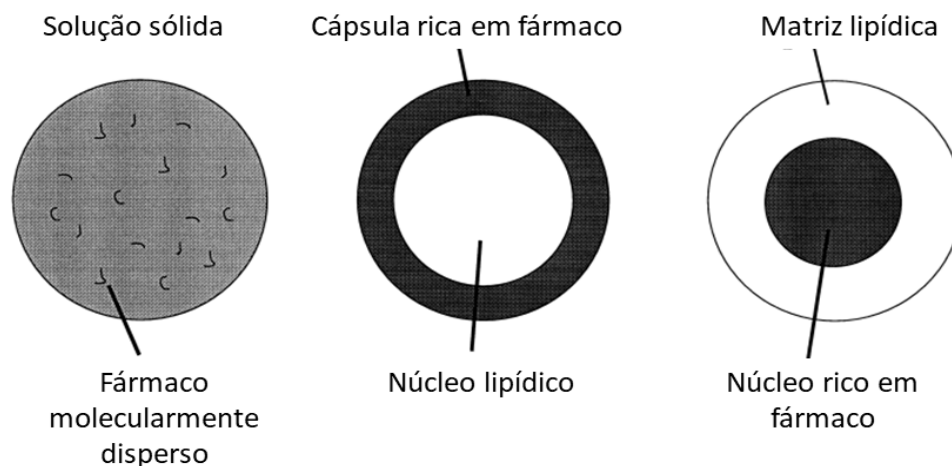
---

As NLS podem ser preparadas por basicamente dois métodos: homogeneização a quente e a frio. O método de homogeneização a quente é utilizado principalmente para encapsular fármacos lipofílicos. Neste método, o fármaco fica disperso ou dissolvido no lipídeo sólido fundido, geralmente de 5-10°C acima do ponto de fusão do lipídeo. Então, o lipídeo e o fármaco são misturados em uma solução aquosa contendo tensoativo e sempre mantendo a temperatura e alta agitação, formando uma pré-emulsão O/A (Óleo/Água). A emulsão obtida passa por um homogeneizador de alta pressão, na temperatura acima do ponto de fusão do lipídeo, obtendo uma nanoemulsão O/A. A nanoemulsão é resfriada em temperatura ambiente ocorrendo a solidificação e, conseqüentemente, e formando as NLS (GESZKE-MORITZL, 2016).

O método de homogeneização a frio é apropriado para fármacos hidrofílicos e termolábeis (que são fármacos sensíveis a certas temperaturas). Na homogeneização a frio, o fármaco é dissolvido no lipídeo fundido com ou sem tensoativo. Esta mistura é solidificada em nitrogênio líquido, onde é realizada moagem para formação de micropartículas entre 50 – 100 µm. Após isso, as micropartículas são emulsificadas em uma fase aquosa fria contendo tensoativo, formando uma pré-suspensão. Esta então é homogeneizada a alta pressão em temperatura ambiente ou a 0°C. Em comparação entre os métodos, a homogeneização à quente resulta em partículas de tamanhos maiores (MEHNERT & MÄDER, 2001; GESZKE-MORITZL, 2016).

Dependendo do método escolhido para preparar as NLS (homogeneização à quente ou frio), o fármaco é incorporado de formas diferentes dentro da partícula, o que influencia diretamente na sua forma de liberação (MEHNERT & MÄDER, 2001). Na literatura, são descritos três tipos diferentes de incorporação do fármaco como: matriz homogênea, cápsula rica em fármaco e núcleo rico em fármaco (Figura 7).

O tipo matriz homogênea é obtido quando utilizado o método homogeneização a frio. O fármaco fica disperso na matriz lipídica. Os outros dois tipos são obtidos por homogeneização a quente. O tipo cápsula rica, possui uma camada externa com fármaco que cobre a matriz lipídica e este tipo pode resultar na liberação imediata do fármaco. O tipo núcleo rico é formado quando a emulsão resfria de forma a precipitar o fármaco primeiro no lipídio fundido. A liberação prolongada do fármaco ocorre quando há interação lipídeo-fármaco no núcleo das NLS (MÜLLER, et al., 2000).



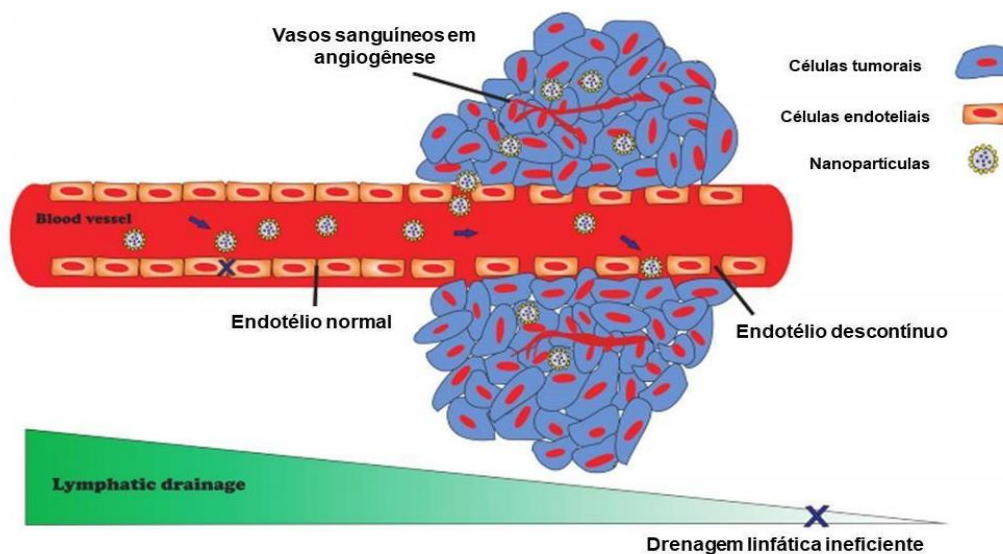
**Figura 7-** Três modelos de incorporação de fármacos em nanopartículas lipídicas sólidas. Fonte: (MÜLLER *et al.*, 2000) com adaptações.

## 1.8 Transporte de nanopartículas

O fármaco pode ser entregue ao tecido alvo de duas formas: passiva e ativa. Na liberação passiva ocorre o efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR - *Enhanced Permeability and Retention*) do tecido tumoral (Figura 8). As nanopartículas passam pelo capilar endotelial do tecido tumoral que é descontínuo (diferente do tecido

## Introdução

saudável) e, conseqüentemente, mais permeável às nanopartículas e outro fator é a redução da drenagem linfática na região tumoral, que permite uma maior concentração de nanopartículas no tecido tumoral (TORCHILIN, 2011).



**Figura 8** - Representação esquemática do efeito de permeabilidade e retenção aumentada das nanopartículas em tumores. Fonte: ROCHA *et al.*, 2016.

A entrega ativa ocorre quando a nanopartícula recebe conjugação de ligantes em sua superfície, permitindo, um acúmulo preferencial da droga no tecido tumoral. Este método serve para direcionar nanopartículas para se ligarem de maneira específica à antígenos ou receptores na superfície da célula tumoral (TORCHILIN, 2011).

### **1.9 Internalização de nanopartículas**

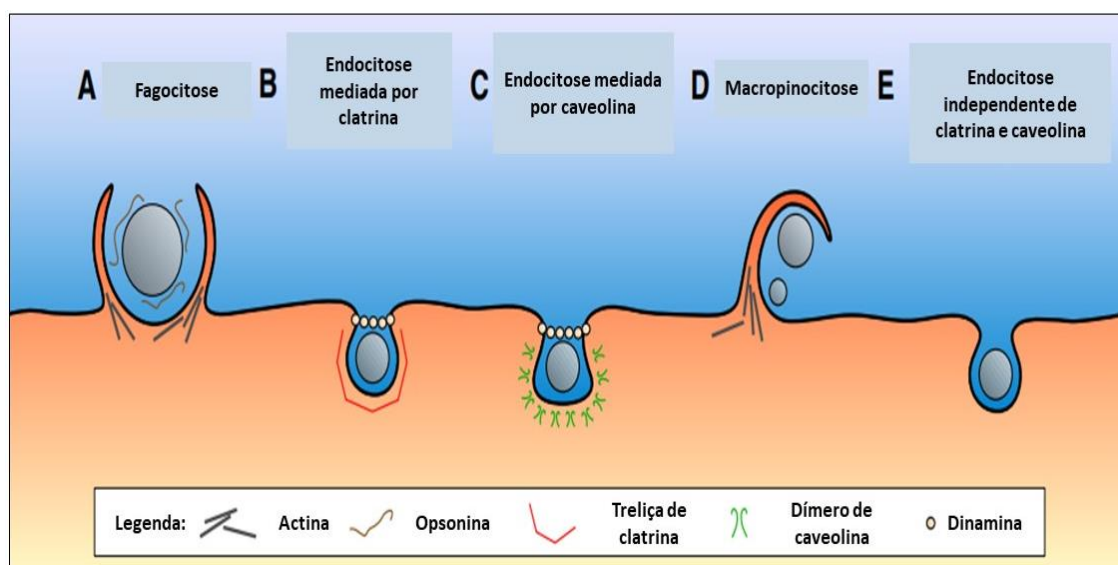
As células fazem trocas com o meio exterior de micro e macromoléculas. As nanopartículas são internalizadas pelas células eucarióticas por mecanismos que precisam de lipídios e proteínas. Obter sucesso na internalização de nanopartículas não é somente no processo de direcionamento para as células-alvo, mas também, ter menor toxicidade e efeitos adversos como, minimizar o contato com as células, tecidos e órgãos que não são o alvo das nanopartículas administradas. Por isso, é importante conhecer os mecanismos de internalização pelas células na hora de desenvolver os nanomateriais. As nanopartículas são internalizadas por transporte ativo, no qual estão envolvidos gastos de energia celular, conhecido como endocitose. Durante a endocitose, ocorre uma invaginação da membrana plasmática que forma uma vesícula lipoproteica na porção interna da célula, que é então liberada no citoplasma. A endocitose é utilizada pelas células para internalizar materiais de interesse como, nutrientes, receptores e etc. A endocitose pode ser dividida em fagocitose e pinocitose (HILLAIREAU & COUVREUR, 2009)

A fagocitose é importante na defesa do organismo contra agentes externos como às nanopartículas. Esta é desempenhada principalmente por células especializadas como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e mastócitos que são células do sistema imunitário. Na fagocitose ocorre o reconhecimento das partículas pelas opsoninas, que são proteínas que tornam as nanopartículas externas visíveis as células fagocíticas e são internalizadas formando um fagossoma (TOURET *et al.*, 2005; HILLAIREAU & COUVREUR, 2009).

## Introdução

A pinocitose é presente em todos os tipos celulares. É constituída por macropinocitose, endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolina e endocitose independente de clatrina e de caveolina (HILLAIREAU & COUVREUR, 2009).

A via de internalização é determinada por vários fatores, como o tamanho, propriedades físico-químicas, carga, funcionalização da superfície, adsorção superficial e etc. É importante lembrar que a forma de internalização não está dependente de uma única via (HILLAIREAU & COUVREUR, 2009).



**Figura 9** - Transporte ativo em células. (A) Fagocitose; (B) Endocitose mediada por clatrina; (C) Endocitose mediada por caveolina; (D) Macropinocitose; (E) Endocitose independente de clatrina e caveolina. Adaptado de HILLAIREAU & COUVREUR, 2009.

A macropinocitose é feita por qualquer célula e está envolvida na internalização de grandes quantidades de material extracelular. Ocorre pela projeção da membrana plasmática guiada por filamentos de actina que formam os macropinosossomas. Na

## *Introdução*

---

internalização, os macropinosomas se fundem com lisossomas. Os macropinosomas oferecem uma rota eficiente para a endocitose de grandes moléculas (PANARITI *et al.*, 2012). São internalizadas por esta via, partículas entre 0.5 a 10  $\mu\text{m}$  e algumas nanopartículas de carga positiva. Esta via é importante para a motilidade celular e obtenção de nutrientes para a célula e é descrita como via para internalização de nanopartículas maiores que 300 nanômetros (ORTH & MCNIVEN, 2006).

A endocitose mediada por clatrina é uma via que é responsável pela absorção de nutrientes essenciais para a sobrevivência celular. Também é crucial na internalização de receptores de membrana e sinalização, citocinas, neurotransmissores e lipoproteínas. Nanopartículas são internalizadas quando interagem com a membrana da célula onde ocorre a invaginação da região por acúmulo de clatrina. As vesículas formadas devido a ação das GTP-ases dinaminas, formam um endossoma, onde possivelmente ocorre a degradação de nanomateriais (CARVER & SCHNITZER, 2003). Esta via pode ter influência na degradação das nanopartículas pelas enzimas lisossomais fazendo com que estes não cheguem ao alvo, portanto, esta via deve ser evitada quando o alvo não for os lisossomas (CANTON & BATTAGLIA, 2012).

A endocitose mediada por caveolina ocorre por invaginações da membrana, chamadas caveossomas. Estas estruturas não são ácidas e por isso podem ser uma via preferencial para a entrega de fármacos pois podem escapar da degradação lisossomal (HILLAIREAU & COUVREUR, 2009).

Além das vias clássicas, existe também a endocitose independente de clatrina e de caveolina. Esta via vem sendo apontada como importante no funcionamento celular e também é utilizada para a invasão de patógenos e toxinas (HILLAIREAU & COUVREUR, 2009).

## **2. JUSTIFICATIVA**

O carcinoma mamário possui alta incidência e constitui grave problema de saúde pública mundial. O docetaxel, um fármaco lipofílico, é um dos tratamentos mais eficazes para o câncer de mama, entretanto, seus efeitos adversos representam um desafio em longo prazo para a saúde do paciente. Atualmente, o docetaxel é diluído em etanol e tween 80, o que causa efeitos adversos. Por isso, algumas melhorias na formulação do produto são necessárias. Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) têm recebido atenção para melhorar a entrega de fármacos lipofílicos devido à alta afinidade dessas moléculas com a matriz lipídica. Com isso, neste trabalho a proposta é utilizar o fármaco docetaxel encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas. Este sistema parece ser uma alternativa para melhorar os problemas relacionados à aplicação biológica do docetaxel e visa não apenas proporcionar melhores propriedades farmacocinéticas, mas também melhorar as formulações do produto. Além de aumentar a taxa de incorporação do fármaco e o direcionamento deste aos tecidos tumorais. Isto gera a redução da quantidade de droga necessária para causar uma resposta satisfatória e ou a redução da concentração de fármaco utilizado. Ainda, protege o fármaco contra a degradação prematura dentro do organismo, antes que este atinja o sítio-alvo. Sendo assim, os efeitos adversos da terapia podem ser minimizados. Com a alta incidência de câncer de mama, faz-se necessário novos estudos científicos que abordem os aspectos decorrentes da utilização do docetaxel como um agente antineoplásico, bem como do seu uso em nanoestruturas.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral:**

Desenvolver, caracterizar e avaliar os efeitos biológicos e a atividade terapêutica de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo docetaxel em carcinoma mamário *in vitro* e *in vivo*.

#### **3.2 Objetivos Específicos:**

*Preparo, caracterização e estabilidade:*

- Preparar formulações de NLS contendo docetaxel;
- Avaliar as características coloidais como, potencial zeta (ZP), diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI);
- Avaliar o perfil de liberação e eficiência de encapsulação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC);
- Verificar o tamanho modal das nanopartículas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e a morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Caracterizar as nanopartículas por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Raman e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC);

## Objetivos

---

### Estudos *in vitro*:

- Avaliar os índices de viabilidade das células de carcinoma mamário (4T1) e de células não tumorais (NIH-3T3) *in vitro* em decorrência dos tratamentos com docetaxel encapsulado em NLS e comparar com o docetaxel livre;
- Verificar se as formulações e DTX livre causam hemólise;
- Verificar a via de internalização das NLS-DTX por citometria, HPLC e MET;
- Verificar por *Western Blotting* a expressão de clatrina e caveolina após os tratamentos;
- Avaliação da tubulina após tratamento com NLS-DTX e DTX livre por microscopia confocal;
- Análise do tipo de morte celular ocasionado pelo tratamento com NLS-DTX;
- Análise do ciclo celular após o tratamento com NLS-DTX;
- Detecção da geração de espécies reativas após tratamento com as NLS-DTX;

### Estudos *in vivo*:

- Avaliar a possível atividade antitumoral de NLS em modelo de implante de células de carcinoma mamário murinho (4T1) em camundongos Balb/C;
- Avaliar os efeitos em decorrência do tratamento com NLS-DTX em parâmetros clínicos histológicos, hematológicos e bioquímicos;

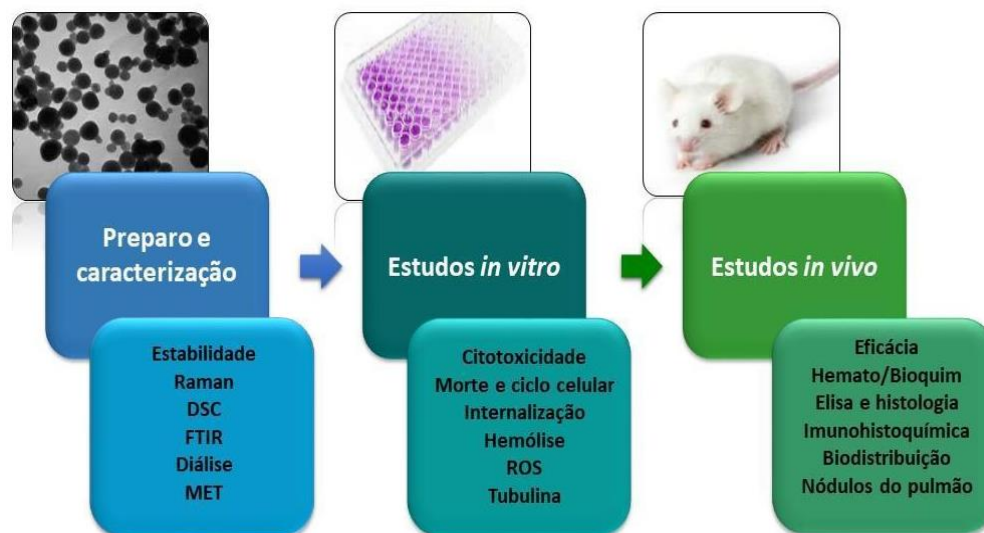
## *Objetivos*

---

- Avaliar a genotoxicidade induzida pelos tratamentos por meio de citometria de fluxo de células da medula óssea dos camundongos;
- Analisar os níveis de IL-6 no soro de camundongos após os tratamentos;
- Analisar a biodistribuição das NLS-DTX em camundongos Balb/C fêmea por HPLC;
- Análise de metástase pulmonar por histologia, imunohistoquímica (ki-67 e BCL-2) e contagem de nódulos macroscópicos de metástase pulmonar.

#### 4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Na Figura 10, está representado o desenho experimental da pesquisa.



**Figura 10** – Desenho experimental.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Reagentes

Os materiais utilizados neste trabalho estão listados na tabela 1:

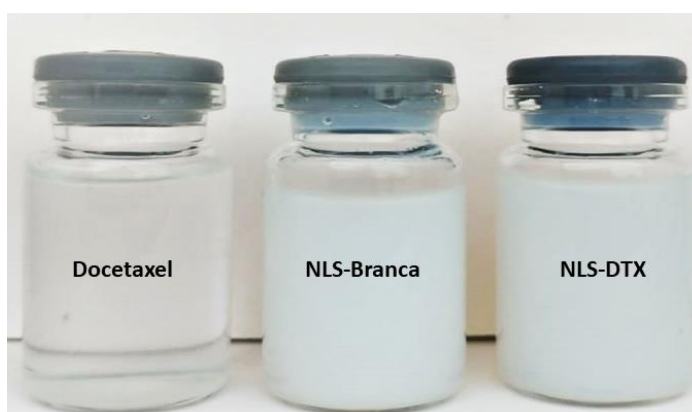
**Tabela 1** – Lista de materiais utilizados.

Materiais	Fabricante
Anticorpos - Bond RTU (BCL2 e Ki67)	Leica, EUA
Azul de tripan, Dimetilsulfóxido (DMSO) (>99,5%), Docetaxel Triidratado, Hematoxilina de Mayer's e Tween 80	Sigma-Aldrich, EUA
Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e Iodeto de Propídeo	Invitrogen, EUA
Cetamina e Xilazina	Agener União, Brasil
Diaminobenzidina (DAB)	Spring, EUA
Entellan e Triton X-100	Merck, Brasil
Eosina e Hematoxilina de Harris	Lafan Química Fina, Brasil
Etanol e Xileno	J.T.Backer, Brasil
Estreptomicina e Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), Penicilina, Soro fetal bovino e Tripsina	Gibco, EUA
Parafina, Paraformaldeído e Peróxido de hidrogênio	Vetec, Brasil
Tampão fosfato (PBS)	Laborclin, Brasil
Suportes para microscopia eletrônica de varredura (stubs), Telas de cobre (300 meshes), Tetróxido de ósmio	Electron Microscopy Sciences, EUA

## 5.2 Formulação de nanopartículas lipídicas sólidas

As nanopartículas lipídicas sólidas foram desenvolvidas no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília (UnB). Foram preparadas as seguintes formulações (Figura 11):

- (1) Nanopartículas lipídicas sólidas branca sem docetaxel contendo apenas a fase lipídica (NLS-BRANCA);
- (2) Nanopartículas lipídicas sólidas contendo docetaxel na concentração de 1 mg/mL (NLS-DTX);
- (3) Nanopartículas lipídicas sólidas com 30  $\mu$ M de cloreto de alumínio-ftalocianina (NLS-FTALO) – Não contém docetaxel. Esta foi utilizada apenas por ter fluorescência para fazer os ensaios de internalização analisados por citometria de fluxo.

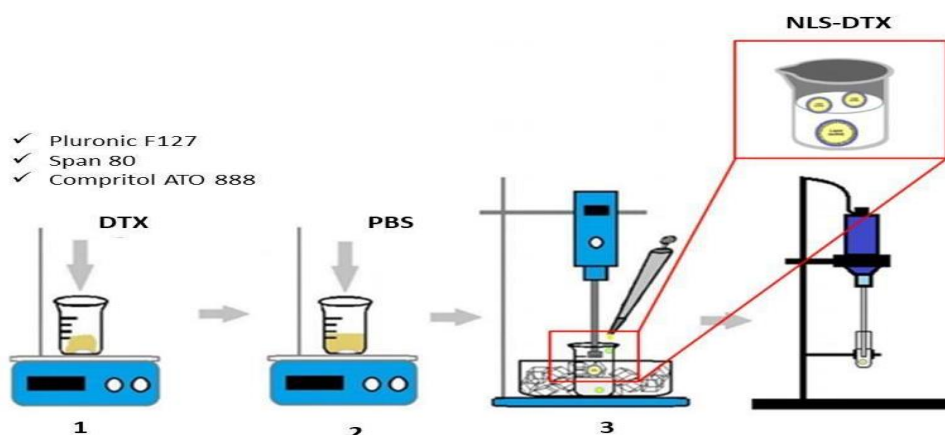


**Figura 11** – Docetaxel solubilizado em etanol, formulações de NLS-Branca e NLS-DTX.

As NLS foram preparadas pelo método de homogeneização a quente, utilizando o agitador Ultra turrax T-25 (Ika Labortechnik, Alemanha). As fases oleosas e aquosas foram pesadas separadamente e aquecidas a 80°C. A fase oleosa (compritol ATO 888,

## Materiais e Métodos

span 80 e pluronic F127) foi homogeneizada até completa dispersão do docetaxel e fusão dos lipídeos, mantendo a temperatura a 80°C. A fase aquosa (PBS) foi lentamente vertida sobre a fase oleosa sob agitação em Ultra-Turrax, mantendo a temperatura de 80°C por 10 minutos a 10.000 rpm, formando uma pré-emulsão óleo em água (Figura 12). Após formulada, as NLS foram armazenadas a temperatura ambiente.



**Figura 12** – Representação da obtenção das NLS. O processo é dividido em três etapas: 1) Aquecimento da fase oleosa e DTX; 2) Adição da fase aquosa (previamente aquecida); 3) Mistura da fase oleosa e aquosa com o equipamento Ultra-turrax. (TOSTA, 2014) com adaptações.

As amostras foram obtidas com a quantidade de componentes como descrito na Tabela 2.

**Tabela 2** - Componentes das nanopartículas lipídicas sólidas.

<i>Fase</i>	<i>Componentes</i>	<i>NLS branca</i>	<i>NLS 1 mg/mL</i>
Fase oleosa	Compritol ATO888	500 mg	500 mg
	Pluronic 127	450 mg	450 mg
	Span 80	50 mg	50 mg
Quimioterápico	Docetaxel	-	20 mg
Fase aquosa	PBS	20 mL	20 mL

### **5.3 Caracterização das formulações**

#### **5.3.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta ( $\zeta$ ) Mv**

O diâmetro hidrodinâmico, o índice de polidispersão e o potencial zeta das NLS foram avaliados por espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering* – DLS) e espalhamento de luz eletroforético em Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). As NLS foram diluídas na proporção 1:20 em água ultrapura. As leituras foram realizadas nos dias 01, 07, 15, 30, 45, 60 e 120 após a obtenção das formulações.

#### **5.3.2 Análise de Rastreamento de Nanopartículas**

Para análise do rastreamento de nanopartículas (*Nanoparticle tracking analysis* - NTA) os experimentos foram realizados utilizando um microscópio digital Sistema LM10 (NanoSight, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, RU), equipado com um compartimento de amostras e um laser de 532 nm. As amostras foram diluídas com PBS filtradas com um filtro de acetato de celulose de 0,45  $\mu\text{m}$  e introduzidas na câmara de amostras por uma seringa. As imagens de vídeo de movimento das partículas em movimento browniano foram analisadas pelo programa analítico NTA versão 2.3. Os vídeos das amostras foram capturados por câmara EMCCD 215S. Cada vídeo foi capturado ao longo de 60s. O tamanho médio obtido pelo programa corresponde à média aritmética dos tamanhos de todas as partículas analisadas. Todas as medições foram realizadas em triplicata em temperatura ambiente.



### **5.3.3 Teste de centrifugação**

Para esse teste, foi separado 1 mL de cada amostra em microtubos. As amostras foram submetidas à centrifugação (Eppendorf, 5424R, Alemanha) a 14.000 rpm por 1 hora a temperatura ambiente. Esse teste foi realizado três dias após a obtenção das NLS.

### **5.3.4 Teste – ciclo aquecimento e resfriamento**

Foram transferidos 2 mL de NLS para microtubos e estes foram acondicionados inicialmente em geladeira (4°C) por 24 horas e em seguida as mesmas amostras foram colocadas em estufa (37°C) por 24 horas, fazendo um ciclo. A cada mudança de temperatura, alíquotas das amostras foram retiradas para leitura no equipamento Zetasizer para leitura do Diâmetro Hidrodinâmico, PDI e Potencial Zeta. No total cada amostra foi submetida a cinco ciclos. Esse teste foi realizado com adaptações do protocolo de BALI *et al.*, 2010.

### **5.3.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

O diâmetro das NLS foi avaliado por microscopia eletrônica de transmissão. As amostras foram diluídas em água ultrapura (1:20) e 5 µL da solução foram colocados em telinhas de cobre (200 *mesh*) cobertas com filme Formvar. Após secas a temperatura ambiente por 24 horas, foram contrastadas com vapor de tetróxido de ósmio por 5 minutos. As imagens foram feitas em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM-1011, Japão) a 100 kV. Foram analisadas no total 400 nanopartículas para verificar o tamanho modal utilizando o *software ImageJ*.

### **5.3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A morfologia das partículas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (JEOL, JSM-700 1-F, Japão). As amostras foram colocadas em suportes (*stubs*) com diluição (1:20). Estas secaram por 24 horas a temperatura ambiente. Foram contrastadas por 5 minutos com vapor de tetróxido de ósmio e metalizadas com ouro (Blazers Union AG, Liechtenstein).

### **5.3.7 Condições de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação do docetaxel**

A quantificação do DTX foi realizada pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) usando o cromatógrafo Shimadzu-Prominence acoplado ao degaseificador (Modelo DGU 20A5), com módulo de distribuição de solvente (modelo LC- 20AT), amostrador automático (modelo SIL-20AHT), forno de coluna (Modelo CTO-20A), detector de fluorescência (Modelo RF-10AXL) e controlador do sistema CBM-20A. Foi utilizada uma coluna C18 de fase-reversa ACE AQ (25 x 0,4 cm, 5 µm diâmetro de partícula) (ACE, Aberdeen, Scotland) com uma pré-coluna (1 x 0,4 cm, 5 µm diâmetro de partícula) (ACE, Aberdeen, Scotland).

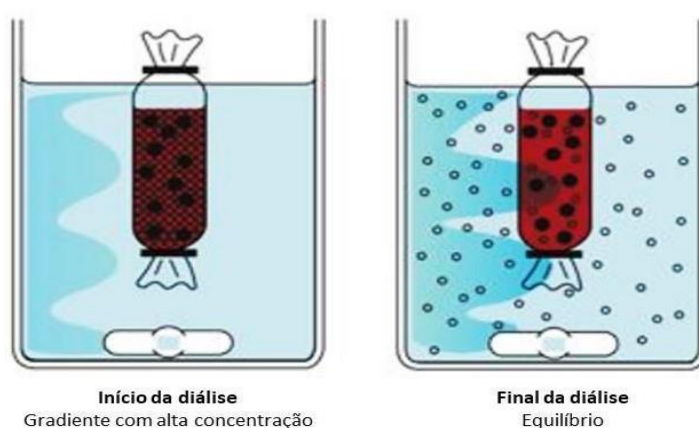
A fase móvel utilizada é constituída de 55% de acetonitrila e 45% de água ultra-pura v:v). As medições foram com comprimento de onda de 232 nm (UV). O volume de injeção foi de 20 µL, a taxa do fluxo durante o ensaio foi de 1 mL/min a uma pressão de trabalho de 120 kgf.cm<sup>-2</sup>. A temperatura da coluna foi mantida a 30°C. O *software LC solution* (Shimadzu, Tokyo, Japan) foi usado para o processamento e identificação dos parâmetros cromatográficos.

A linearidade do método foi determinada com intuito de verificar se os resultados obtidos e a concentração do analito eram proporcionais. Para tal, oito concentrações

distintas foram utilizadas em triplicata para a construção da curva analítica. Uma solução de DTX foi preparada em etanol 99,6% na concentração 1 mg/mL, em seguida foi realizada a diluição em fase móvel para 500 µg/mL e posteriormente realizou-se diluição com fator 2, até o primeiro ponto da curva (3,90 µg/mL). O cálculo de regressão linear foi aplicado pelo método dos mínimos quadrados e feita posteriormente a avaliação da associação linear entre as concentrações por meio do coeficiente de correlação ( $r$ ) e de determinação ( $r^2$ ), de acordo com a RDC N° 166, 24/07/2017 (ANVISA, 2017).

### 5.3.8 Análise do perfil de liberação de DTX

A análise da liberação do docetaxel que está encapsulado nas NLS foi realizada pelo método de diálise (Figura 13). Um sistema composto por dois compartimentos, sendo um compartimento doador (1 mL de NLS-DTX ou DTX livre) e outro acceptor (100 mL, (PBS 7,4 ou 4,5 com 0.1% de Tween 80) separados por uma membrana de celulose com poros de exclusão molecular de 14 kDa, mantidos sob agitação magnética contínua e a temperatura de 37°C.



**Figura 13** – Ilustração da técnica de diálise *in vitro* (ONNAINTY & GRANERO, 2019).

Em tempos determinados, (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 24, 48, 120, 240 horas) 1 mL de meio acceptor foi recolhido e o mesmo volume foi repostado. As alíquotas retiradas foram filtradas em filtro 0.22 µm, diluídas em fase móvel e analisadas por CLAE. Os valores foram calculados de acordo com a percentagem acumulada de liberação do DTX.

### **5.3.9 Teste de eficiência de encapsulação**

NLS-DTX foi diluída 10 vezes em dimetilsulfóxido (DMSO). Esta solução foi centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos para precipitar o Compritol não solubilizado. O sobrenadante foi diluído em fase móvel e filtrado com um filtro de 0,2 µm e injetado no sistema de HPLC. A concentração de DTX foi determinada a partir da curva de calibração. A eficiência de encapsulação (EE) foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$EE \% = \frac{\text{quantidade de DTX encapsulado}}{\text{quantidade de DTX usado no preparado das NPs}} \times 100$$

### **5.3.10 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)**

As mudanças nos grupos funcionais das amostras foram observadas usando espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (Vertex 70, Bruker, Billerica, EUA). O espectro de FT-IR de DTX, Compritol ATO 888, Span 80, Pluronic F127, NLS-DTX e NLS-Branca foram obtidos pelo método de ATR (*Attenuated total reflection*). Os espectros de FT-IR foram medidos no intervalo de 4000-400 cm<sup>-1</sup> com resolução de 4 cm<sup>-1</sup> a 50 varreduras.

### **5.3.11 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)**

Os termogramas dos componentes das NLS, tais como, Compritol ATO 888, Span 80, Pluronic F127, NLS-DTX e NLS-Branca foram obtidos utilizando Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC-60 Shimadzu, Kyoto, Japão). As amostras foram pesadas em cadinho de alumínio e foi utilizado cadinho vazio como referência na leitura. DSC foi realizado na faixa de temperatura de 25 a 400°C por taxa de 10°C/min sob fluxo de N<sub>2</sub> para fornecer atmosfera inerte durante a medição, a fim de evitar uma reação de oxidação.

### **5.3.12 Espectroscopia Raman**

A análise de espectroscopia dos componentes e das formulações de NLS-DTX e NLS-Branca foi realizada por um Raman confocal (Witec GmbH, Alemanha) com o laser 532 nm a 30 mW. Os espectros foram registrados em um tempo de integração de 0.15 segundos por ponto.

## **5.4 Ensaio *in vitro***

### **5.4.1 Cultura celular**

A linhagem de células não tumorais de fibroblastos murino (NIH-3T3) e a linhagem de células de carcinoma mamário murino (4T1) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), e cultivadas em DMEM suplementado com 1% de solução antibiótica (100 unidades/mL de penicilina e 100 mg/mL estreptomicina) e 10% de soro fetal bovino (SFB). Todas as células foram mantidas em incubadora úmida à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **5.4.2 Tratamento *in vitro***

Para os testes feitos *in vitro*, foi feito um estoque concentrado de docetaxel solubilizado em etanol absoluto, que foi diluído em meio de cultura na hora dos experimentos. Os ensaios de viabilidade celular foram feitos com 24 e 48 horas de tratamento nas concentrações de 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL. Para verificar se existe toxicidade causada pelo diluente do docetaxel, o etanol absoluto, foi feito um controle com a porcentagem máxima utilizada nos tratamentos.

#### **5.4.3 Teste de viabilidade celular**

O teste de viabilidade das células 4T1 e NIH-3T3, foi feito por ensaio padrão por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), descrito anteriormente por Mosmann (1983). A solução de MTT interage com as desidrogenases mitocondriais de células viáveis, promovendo a redução do MTT ao composto formazan, o qual possui coloração púrpura. A viabilidade celular é indicada pela quantificação da produção de cristais de formazan.

Para este experimento, foram plaqueadas  $4 \times 10^3$  células em placas de 96 poços. Foi feito o tratamento com NLS-Branca, NLS-DTX, e docetaxel nas células com concentração equivalente de DTX. A porcentagem máxima de etanol absoluto foi de 0,0005%. Após os tempos de 24 e 48 horas, o tratamento foi retirado e foi acrescentado 150 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultura) e incubado por 4 horas a 37°C. Após incubação, esta solução foi retirada e foram adicionados 200 µL de DMSO para a dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas no espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices – USA), utilizando comprimento de onda de 595 nm,

com o auxílio do programa SoftMax Pro (Molecular Devices). O ensaio de MTT foi realizado em triplicata e em três experimentos independentes. Os valores da concentração inibitória 50% (IC<sub>50</sub>) para as células 4T1 e NIH3T3 foram calculados com base nos resultados obtidos pelo teste de viabilidade celular por MTT. O cálculo foi feito utilizando o programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc).

#### **5.4.4 Dinâmica de proliferação celular pelo sistema RTCA**

Com o propósito de analisar a citotoxicidade causada pela exposição das células aos tratamentos e avaliar se a capacidade proliferativa das células é mantida ou não durante a exposição aos tratamentos foi utilizado o sistema xCELLigence™ (Roche/ACEA, EUA). O equipamento RTCA (Real-Time Cell Analyzer) é mantido dentro de uma incubadora à 37°C com microelétrodos que monitoram a proliferação celular em tempo real. Esta detecção é feita de forma automatizada, onde utiliza-se o índice de biomassa celular que é determinado pela impedância eletrônica. O índice celular é diretamente proporcional à quantidade de células aderidas ao fundo da placa de cultivo. Os resultados apresentados são de acordo com o tempo (minutos) em função do índice de biomassa celular (índice celular) analisado no *software* RTCA (Roche/ACEA, EUA). Inicialmente, foram colocados 50 µL de meio de cultura em placas específicas para RTCA (E-Plate16 - Roche/ACEA, EUA) para obter os valores basais. Após isso, 3x10<sup>3</sup> células/poço de 4T1 e NIH3T3 foram adicionadas nas placas e mantidas por 30 minutos para a adesão das células. Em seguida, as placas foram colocadas no equipamento de RTCA. Após 24 horas, a proliferação celular foi analisada. O sistema de detecção foi interrompido e foram adicionados 50 µL de meio contendo o tratamento na concentração

de 10 µg/mL dos tratamentos NLS-DTX, DTX e NLS-Branca. A análise foi feita por 120 horas.

#### **5.4.5 Morfologia celular**

A morfologia e confluência das células 4T1 foram analisadas usando um microscópio de contraste de fase (Zeiss, Alemanha) e o *software* AxioVision® (Zeiss, Alemanha).

Após 24 horas de tratamento (10 µg/mL) as células 4T1 foram fixadas com *Karnovsky*. Então, as amostras foram lavadas com tampão cacodilato (0,1 M), pós-fixadas com tetróxido de ósmio e desidratadas gradualmente com acetona (30-100%). Em seguida, as amostras foram submetidas à secagem ao ponto crítico com CO<sub>2</sub> líquido (Balzers, CPD 030, Alemanha) e metalizadas com ouro. A morfologia celular foi observada por Microscopia Eletrônica de Varredura Jeol 7001 (Jeol, EUA).

#### **5.4.6 Análise do conteúdo de DNA por marcação com iodeto de propídio (PI)**

Foi feita a análise do DNA com a marcação intracelular com Iodeto de Propídio (PI) em células 4T1. O PI é um marcador intercalante de DNA, portanto a marcação presente na célula é diretamente proporcional à quantidade de DNA que a célula possui. Este experimento tem como objetivo quantificar as células que estão em G0/G1 (2N de DNA); G2/M (4N de DNA) e as fases S (quantidades intermediárias de DNA). As células 4T1 (1x10<sup>5</sup>) foram semeadas em placas de 12 poços. Depois de sua adesão, as células receberam o tratamento com NLS-DTX ou docetaxel na concentração de 10 µg/mL ou apenas meio de cultivo (controle) por 24 horas. Após isso, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas. Então, o *pellet* de células foi lavado com PBS e fixado com etanol 70% gelado por duas horas a 4°C. As células foram lavadas com PBS e



resuspendidas em solução de iodeto de propídio (10 µg/mL PI, 100 µg/mL de DNase free RNase e 0.1% Triton X-100) diluído em PBS, por 10 minutos a 37°C. Após o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas, resuspendidas em PBS e 10.000 eventos de cada amostra foram analisados por citometria de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson). Foram feitos três experimentos independentes. O conteúdo de DNA das células nas diferentes fases do ciclo celular foi determinado utilizando a plataforma de ciclo celular do *software FlowJo*.

#### **5.4.7 Caracterização da morte celular induzida pelas NLS**

Para identificar o tipo de morte induzida pelos tratamentos com as nanopartículas foram realizadas as marcações das células 4T1 com Anexina V-FITC e Iodeto de propídio (PI). Com esse experimento é possível identificar células em apoptose, necrose e células viáveis. Foram plaqueadas  $1 \times 10^5$  células 4T1 em placas de 12 poços. As células foram tratadas com NLS-DTX e docetaxel na concentração de 10 µg/mL. Após 24 horas, as células foram lavadas com PBS e receberam tampão de ligação Anexina V (10 mM HEPES, 140 mM NaCl e 2,5 mM de CaCl<sub>2</sub> – pH 7,4) contendo 5 µL de anexina V, por 15 minutos em temperatura ambiente, protegidas da luz. Após isso, 400 µL do tampão de ligação da Anexina V foram adicionados aos tubos. Em seguida foram adicionados 500 µL da solução de PI (PBS e Iodeto de Propídio) mantidos em gelo por 5 minutos. As células foram lavadas com PBS e a aquisição dos dados foi feita no citômetro FACSCalibur com o auxílio do *software CellQuest-Pro*. Foram analisados 10.000 eventos de cada amostra. As análises foram feitas a partir de três experimentos independentes realizados em duplicata.

**5.4.8 Ensaio hemolítico**

Para o estudo hemolítico, o sangue de camundongos foi coletado e colocado em tubo contendo EDTA (10%) para prevenir coagulação. Em seguida o sangue foi transferido para um eppendorf e a amostra foi ressuspensa em tampão fosfato (pH 7,2) e centrifugada a 2.500 rpm por 5 minutos. Este processo foi feito duas vezes. Os tubos foram centrifugados para a remoção do tampão fosfato. Em seguida, foram adicionados os tratamentos com as nanopartículas.

Os tratamentos utilizados estão descritos abaixo:

- (1) controle negativo, eritrócitos tratados com tampão fosfato (pH 7,2);
- (2) controle positivo, eritrócitos tratados com água destilada;
- (3) eritrócitos tratados com NLS-Branca;
- (4) eritrócitos tratados com NLS-DTX na concentração 10, 50 and 100 µg/mL;

Os tubos foram incubados em estufa a 37°C por 120 minutos. Após este período de incubação os tubos foram novamente centrifugados, o sobrenadante foi coletado e depositado em placa de 96 poços. O experimento foi feito em quadruplicata (BANERJEE, 2008). A leitura da placa foi feita com a absorbância em 540 nm, em espectrofotômetro. Para o cálculo da porcentagem de hemólise, foi utilizada a fórmula:

$$\% \text{ hemólise} = \frac{\text{Absorbância}}{\text{Absorbância do Controle Positivo (água destilada)}} \times 100$$

---

Absorbância do Controle Positivo (água destilada)

**5.4.9 Ensaio de internalização com NLS-FTALO por citometria de fluxo**

Para analisar o padrão de internalização das NLS nas células 4T1 foi feita a associação da NLS-Branca com cloreto de alumínio-ftalocianina, uma substância que apresenta um alto coeficiente de emissão espectral na faixa de comprimentos de onda 650-850 nm, correspondendo ao intervalo da região do vermelho visível. O docetaxel por não ser uma molécula fluorescente impede este tipo de análise. Portanto, essa formulação foi feita exclusivamente para este e para o experimento de avaliação das vias de internalização da NLS.

A análise por citometria de fluxo das células tratadas com NLS-FTALO (30 mM) permite a identificação e quantificação de subpopulações de células que internalizaram e/ou tenham nanopartículas presentes na sua membrana e passam a apresentar fluorescência em seu interior e em sua membrana. A concentração de  $2 \times 10^5$  células 4T1 e NIH-3T3 foram cultivadas em placas de 24 poços. Após 24 horas, as células receberam NLS-FTALO diluído em meio de cultura. O poço que não recebeu o tratamento teve seu meio de cultura trocado por um meio de cultura fresco. Os tempos de incubação com a NLS-FTALO foram: 0 min, 30 min, 1h, 3h, 6h, 9h, 15h, 18h, 21h e 24h. Decorrido o tempo de tratamento, o meio com tratamento foi retirado, as células foram lavadas com 1 mL de PBS e depois foram desaderidas com 200  $\mu$ L de tripsina 0,25%. As células foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 500  $\mu$ L de PBS nas células. A análise foi feita no citômetro FACSCalibur com o auxílio do *software* CellQuest-Pro. As análises foram feitas a partir de três experimentos independentes.

#### **5.4.10 Vias de internalização por citometria de fluxo**

Neste experimento, foi verificado por qual via de endocitose as NLS-Ftalo são interiorizadas pelas células 4T1. As células foram plaqueadas ( $5 \times 10^4$ ) em placas de 12 poços e após 24 horas o meio foi removido e o inibidor de endocitose foi adicionado por 1 hora.

Os inibidores utilizados foram: Filipina (1  $\mu\text{g/mL}$ ) e nistatina (20  $\mu\text{g/mL}$ ) que bloqueiam a endocitose mediada por caveolinas; amilorida (0,2 mM) e citocalasina D (1  $\mu\text{M}$ ) que inibem a macropinocitose e óxido de fenilarsina (0,2  $\mu\text{M}$ ) que inibe vias mediadas por clatrina (FILIPA, 2016).

Após isso, as células receberam tratamento com NLS-FTALO (30  $\mu\text{M}$ ) por 4 horas. Para cada tratamento, foram mantidos controles sem incubação com os inibidores. As células foram lavadas, tripsinizadas e centrifugadas. Estas foram analisadas por citometria de fluxo FACSCalibur e 10.000 eventos foram contados por amostra. Os resultados foram tratados pelo programa FlowJO.

#### **5.4.11 Análise da internalização de NLS-DTX por Microscopia Eletrônica de Transmissão em células 4T1**

Nestes próximos experimentos de internalização foram utilizadas as NLS-DTX.

Foram plaqueadas  $1 \times 10^6$  células e tratadas com NLS-DTX na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  por 4 horas. As células foram desaderidas dos poços com tripsina, lavadas com PBS e fixadas por 1 hora em fixador Karnovisk (contendo glutaraldeído 2% (p:v), paraformaldeído 2% (p:v) e sacarose 3% (p:v) em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2). Posteriormente, as células foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% (p:v) e ferricianeto de potássio 0,8% (p:v) por 1 hora. O material foi lavado com tampão cacodilato de sódio e contrastado durante 24 horas com acetato de uranila 0,5% (p:v) a

4°C. Em seguida, as células foram lavadas, desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30%-100%) e embebidas em resina Epon. Secções ultrafinas de 50 nm a 70 nm foram obtidas com facas de diamante em ultramicrotomo (Leica Microsystems, Áustria). As secções foram montadas em telas de cobre e examinadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol 1011 (Jeol, USA) a uma tensão de aceleração de 80 kV.

#### **5.4.12 Internalização de docetaxel em células 4T1 (*uptake*) por CLAE**

A internalização de DTX por células 4T1 foi analisada quantitativamente pelo método analítico CLAE. As células ( $1 \times 10^5$  células/poço) foram plaqueadas em placas de 24 poços e tratadas com NLS-DTX ou DTX (100  $\mu\text{g/mL}$ ) por 1, 4, 18 e 24 h a 37°C sob 5% de  $\text{CO}_2$ . No final do período de incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS gelado para remover qualquer NLS-DTX ou DTX que permanecesse na superfície da membrana celular. As células foram tripsinizadas e em seguida, incubadas com 800  $\mu\text{L}$  de metanol sob agitação por 3 minutos. Depois disso, cada amostra foi mantida a 4°C por 48 horas para garantir a ruptura das nanopartículas e a dissolução de todo o DTX pelo metanol. Após 48 horas, as células foram agitadas no vórtex por 1 minutos e centrifugadas por 10 minutos, 1.000 g a 4°C. O sobrenadante foi mantido e analisado pelo método HPLC da mesma maneira como mencionado anteriormente na seção “5.3.7 - Condições de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação do docetaxel”

#### **5.4.13 Análise de espécies reativas de oxigênio**

Para a análise de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi utilizado o reagente CellROX (molecular probes®), sonda fluorescente utilizada para mensurar EROs em células vivas. Células 4T1 foram plaqueadas na concentração de  $2 \times 10^4$  células/poço em placas de 12 poços. Após 4 horas as células foram tratadas com NLS-

DTX ou DTX (10 µg/mL) e como controle positivo, peróxido de hidrogênio. As células aderidas e em suspensão foram analisadas. As células foram incubadas com 5 µM de CellROX por 30 minutos em estufa à 37°C, e em seguida lavadas com PBS. Então, 10.000 eventos foram contados por amostra em citômetro. A fluorescência do CellROX foi detectada em comprimento de onda de 520 nm. Os resultados foram analisados usando o *software* FlowJo® vX 0.7.

#### **5.4.14 Ensaio de imunofluorescência**

Para o ensaio de imunofluorescência, as células 4T1 foram cultivadas em lamínulas de vidro. Após a adesão celular, as células foram incubadas com os tratamentos por 4 horas (10 µg/mL). Após isso, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS, por 20 minutos. As células foram permeabilizadas em Triton X-100 a 0,1% por 10 minutos e incubadas em anticorpo primário anti  $\alpha$ -tubulina por 1 hora. Após isso, foram incubadas em anticorpo secundário Alexa Fluor 594 (anti-mouse). As lâminas foram lavadas em PBS, incubadas com DAPI por 10 minutos e montadas com *anti-fading*. As amostras foram analisadas em microscópio confocal (Zeiss, Alemanha).

### **5.5 Ensaio *in vivo***

#### **5.5.1 Manutenção dos animais**

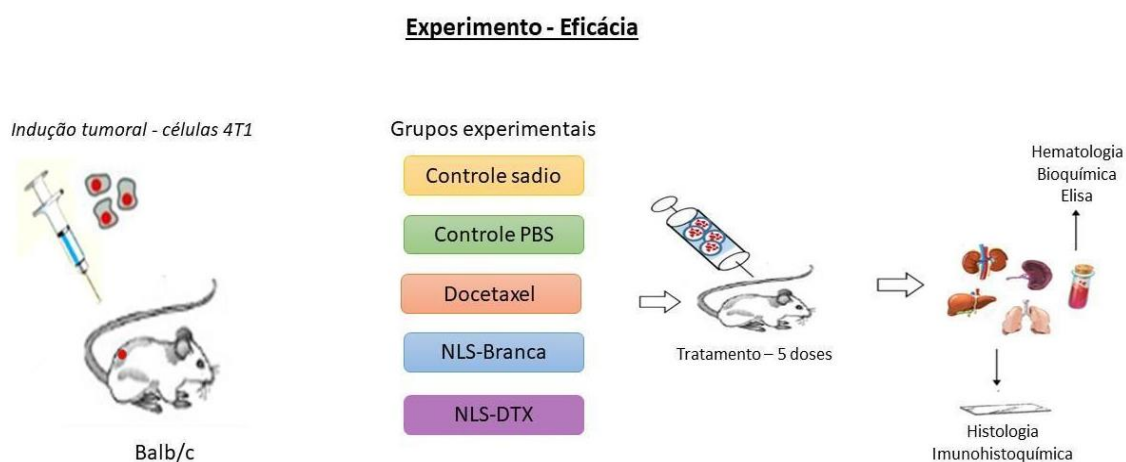
Foram obtidos 50 camundongos fêmeas, da linhagem Balb/C, com 12 semanas de vida, do Biotério da Universidade Católica de Brasília - Brasília, Brasil. Sendo destes 30 utilizados no experimento de eficácia e 20 no experimento de biodistribuição. Os animais ficaram em ambiente com ciclo claro/escuro de 12/12 horas com dieta e água *ad libitum*.

Todos os protocolos experimentais com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília (CEUA-UnB) (Nº. 66726/2016).

### 5.5.2 Indução tumoral e tratamento – Experimento eficácia

Os animais foram pesados semanalmente visando avaliar o efeito toxicológico das NLS-DTX, NLS-Branca e docetaxel no organismo dos animais. Os animais foram anestesiados e células 4T1 na concentração de  $4 \times 10^5/100 \mu\text{L}$ , em meio de cultivo DMEM sem soro fetal bovino, foram inoculados por via subcutânea na região do flanco esquerdo dos camundongos Balb/C (exceto o grupo controle sem tumor). Após isso, os animais foram separados em grupos (n=6).

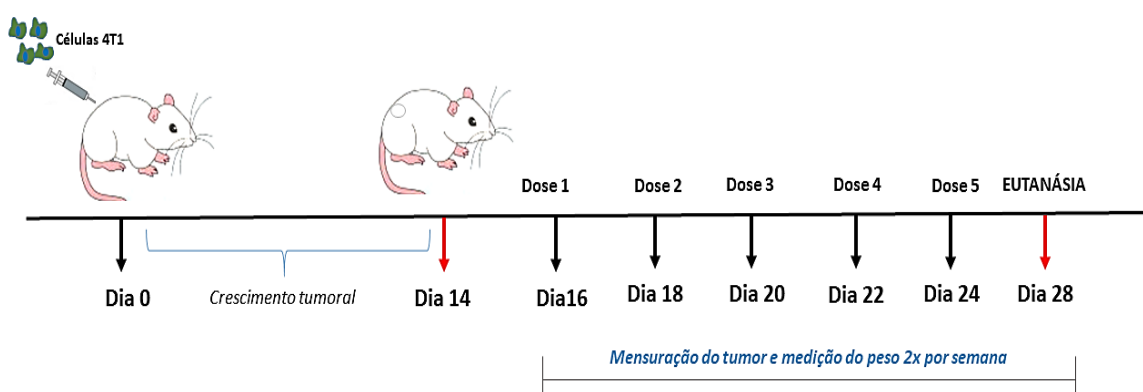
Cada grupo experimental foi composto por seis animais e foram definidos da seguinte forma: (1) animais saudáveis sem tumor; (2) animais com tumor sem tratamento; (3) animais com tumor tratados com NLS-Branca; (4) animais com tumor tratados com NLS-DTX (10 mg/kg); (5); animais com tumor tratados com docetaxel (10 mg/kg). O desenho experimental da eficácia terapêutica *in vivo* está representado na Figura 14.



**Figura 14** – Desenho experimental da eficácia *in vivo* da atividade antitumoral dos tratamentos.

## Materiais e Métodos

Os tratamentos foram iniciados após 14 dias do implante das células tumorais. Os animais portadores de tumor receberam o tratamento administrado por via intraperitoneal em dias alternados, cinco doses, na concentração de 10 mg/kg total. Animais do grupo controle com e sem tumor receberam apenas PBS. A linha do tempo (Figura 15) a seguir mostra a ordem cronológica dos experimentos:



**Figura 15** – Linha do tempo do experimento de eficácia terapêutica *in vivo*.

### 5.5.3 Obtenção e processamento do material

Os animais foram eutanasiados quatro dias após a última dose e submetidos à punção cardíaca para a obtenção do soro para análise bioquímica, hematológica e a quantificação de IL-6 por ELISA. Destes animais também foram coletados os tumores, fígado, baço, pulmão e rins e estes foram processados para histologia. Após a eutanásia, os pulmões foram separados e fixados em *Bouin* para evidenciar os nódulos de metástase. Estes foram fotografados com o auxílio de uma lupa (Stemi 2000, Zeiss, Alemanha) acoplado à câmera Axio Cam HRm (Zeiss, Alemanha). O número de nódulos superficiais e as áreas dos mesmos foram quantificados. Os pulmões foram lavados em álcool 50% até retirar a coloração do fixador *Bouin* e então estes foram processados para histologia.



#### **5.5.4 Testes bioquímicos e hematológicos**

Por meio de punção cardíaca foi retirado sangue dos camundongos (aproximadamente 1.000 µL) com o auxílio de seringas descartáveis de 1 mL. O volume sanguíneo foi, então, separado em minitubos para análise hematológica, com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético bipotássico, 10%), e cuidadosamente homogeneizado por inversão logo após a coleta e, em seguida, centrifugados a 1.000 g por 10 minutos a 4°C. As amostras foram submetidas à leitura em analisador automático de hematologia múltipla (equipamento XZ 2100 Sysmex, Japão). Os parâmetros avaliados foram: (1) leucograma (leucócitos totais - WBC, número de linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos); (2) eritograma (número de hemácias - RBC, hemoglobina - HGB, hematócrito - HCT, volume corpuscular médio - VCM, hemoglobina corpuscular - HCM e concentração de hemoglobina corpuscular média - CHCM); e (3) plaquetograma (número de plaquetas - PLT e volume plaquetário médio - VPM).

Para a análise bioquímica, o sangue coletado foi colocado em um tubo com gel separador de soro sanguíneo. As amostras foram analisadas avaliando as concentrações de transaminase pirúvica (TGP). A quantificação de creatinina foi utilizada como indicador de disfunção renal. Os procedimentos foram realizados com reagentes da marca *Siemens* conforme orientações do fabricante, e as quantificações realizadas em equipamento bioquímico (Analisador automático Chem Well T, LabTest, Brasil). Os resultados dos animais sadios foram utilizados como valores de referência, por esse grupo ser composto por animais submetidos às mesmas condições ambientais.

### **5.5.5 Histologia**

Os tumores, fígado, baço e rins, foram fixados em paraformaldeído 4% e o pulmão em *Bouin* e então, desidratados em uma série de concentrações crescentes de álcool etílico. Em seguida, foram diafanizadas em xilol, incluídos em parafina e emblocados em fôrmas de metal. Os cortes histológicos (5  $\mu\text{m}$ ) foram realizados em micrótomo Leica (RM 2235, Alemanha). As secções foram distendidas, previamente, em álcool 30% e, depois, em banho-maria a 40°C, para serem coletadas com lâminas de vidro. Estas foram mantidas, *overnight*, em estufa a 37°C. Para a coloração, os cortes histológicos foram desparafinizados e reidratados durante três minutos em xilol 100% e em concentrações decrescentes de etanol, respectivamente. Em seguida, foram corados com hematoxilina e eosina por 60 e 120 segundos, respectivamente. A desidratação foi feita com soluções crescentes de etanol e xilol 100% (60 segundos cada banho), as lâminas foram recobertas por lamínulas, utilizando-se Entellan<sup>®</sup> como meio de montagem, e colocadas em estufa (37°C) por 12 horas. As lâminas foram fotografadas com câmera fotográfica (MC 80 DX) acoplada ao microscópio de luz modelo Zeiss (Axiophot, Alemanha).

### **5.5.6 Imunohistoquímica**

Os blocos de parafina (pulmão e tumor) foram submetidos a cortes histológicos (3  $\mu\text{m}$ ) e colocados em lâminas de vidro silanizadas. A imunohistoquímica foi realizada em parceria com o laboratório Micra (Brasília, Brasil) de forma automatizada no equipamento Bond (Leica, EUA). Foi realizada a incubação com os anticorpos anti-ki67 e BCL-2 (anticorpos Bond RTU – Leica, EUA). A revelação foi realizada por meio da incubação com o cromógeno diaminobenzidina (DAB) e lavadas com PBS. As lâminas

foram então contracoloradas com hematoxilina de Mayer's, desidratadas e montadas com Entellan®.

Fotomicrografias de dez campos microscópicos (aumento de 400x) representativos de cada amostra de tecido tumoral e pulmão foram utilizadas para a obtenção dos valores percentuais de células positivamente marcadas. Para este propósito, o total de células em cada imagem foi obtido com o uso do *software* ImageJ – *Plugin IHC* (Rasband, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA), sendo os resultados expressos como percentual da imunomarcação.

### **5.5.7 Quantificação de interleucina (IL-6)**

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina pleiotrópica que atua na regulação de tumores pró-inflamatórios e metastáticos. Estudos demonstraram aumento dos níveis circulantes de IL-6 em pacientes com câncer de mama. Altos níveis de IL-6 também estão associados ao desenvolvimento, progressão e metástase do câncer (SALGADO *et al.*, 2003; ALBANO *et al.*, 2019). Por isso, investigamos os níveis de IL-6 no plasma dos camundongos. A concentração da citocina IL-6 foi avaliada com um *kit* ELISA (Sigma, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. Resumidamente, 100 µL de plasma de camundongo em poços duplicados foram incubados à temperatura ambiente por 45 minutos. Após a lavagem, 100 µL de reagente conjugado enzimático foram adicionados a cada poço e depois incubados. A reação foi parada, as placas foram lidas em leitora de placas a 450 nm. Os dados foram analisados com o programa SoftMax Pro e a quantificação foi baseada na respectiva curva-padrão. Os resultados foram expressos em pg/mL.

**5.5.8 Avaliação de genotoxicidade de células da medula óssea por fragmentação de DNA e ciclo celular**

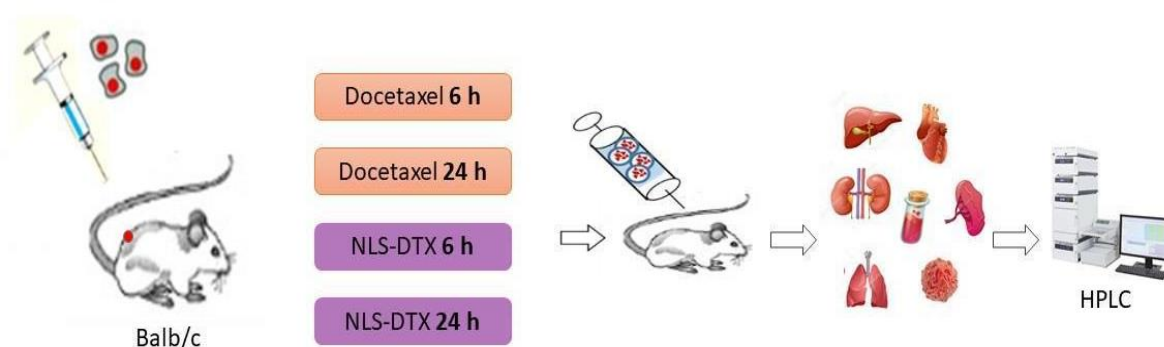
A avaliação do ciclo celular foi feita pela quantificação do DNA total. As células da medula óssea foram coletadas para avaliar o perfil do ciclo celular e a fragmentação de DNA, que são indicadores de toxicidade hematopoiética, sendo uma avaliação complementar ao hemograma. As células obtidas da medula óssea foram fixadas com etanol 70% a 4°C e armazenadas a -20°C. Um volume de 75 µL de suspensão de células foi centrifugado (800 g por 3 minutos a 8°C) o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 500 µL de PBS, para remoção do etanol. Logo, as células foram incubadas com 200 µL de solução de permeabilização contendo 0,1% de citrato de sódio, 0,1% de Triton X-100 e 20 µg/mL de iodeto de propídio e RNase, por 30 minutos em temperatura ambiente e na ausência de luz. As análises de fragmentação de DNA e a identificação das fases do ciclo celular foram feitas em citômetro de fluxo FACSCalibur no canal de fluorescência vermelha FL-2 (sensível a detecções na faixa de 560 a 580 nm). Os dados obtidos foram analisados com o programa FlowJo v.5.2.7 (Tree Star, Inc). O cálculo da proporção de células em cada uma das fases do ciclo celular foi obtido considerando apenas as células com DNA não fragmentado. Somente as células que apresentaram conteúdo de DNA entre 2n e 4n foram consideradas na análise do ciclo celular. O DNA fragmentado foi identificado na população sub-G1 e calculado considerando a totalidade de eventos. Os histogramas gerados para representar os dados foram obtidos pelo programa FlowJo e os gráficos com as análises quantitativas pelo programa GraphPad Prism 7.0.

### 5.5.9 Biodistribuição

Camundongos Balb/C fêmeas foram anestesiados e receberam células 4T1 na concentração de  $4 \times 10^5$  no flanco esquerdo. Após 14 dias, cada grupo experimental (n=5) recebeu dose única de 10 mg/kg de cada tratamento por via intraperitoneal. Após o tempo de tratamento, os animais foram eutanasiados e os órgãos (coração, fígado, baço, pulmão e rins), sangue e tumor foram coletados (Figura 16). Para quantificar o docetaxel, os órgãos, sangue e tumor coletados foram processados para a extração do DTX. Os tecidos foram macerados com a adição de solução de extração (89% de etanol, 10% de DMSO e 1% de ácido acético) e centrifugados por 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi filtrado e diluído em fase móvel. Em seguida, realizou-se a quantificação do DTX por HPLC. Os dados obtidos foram padronizados levando em consideração a absorbância obtida, peso individual de cada órgão e a quantidade utilizada de solução extratora de forma proporcional.

#### Experimento - Biodistribuição

Indução tumoral - células 4T1



**Figura 16** – Desenho experimental da Biodistribuição dos tratamentos após 6 e 24 horas nos órgãos de camundongos Balb/C.

**5.6 Análise estatística**

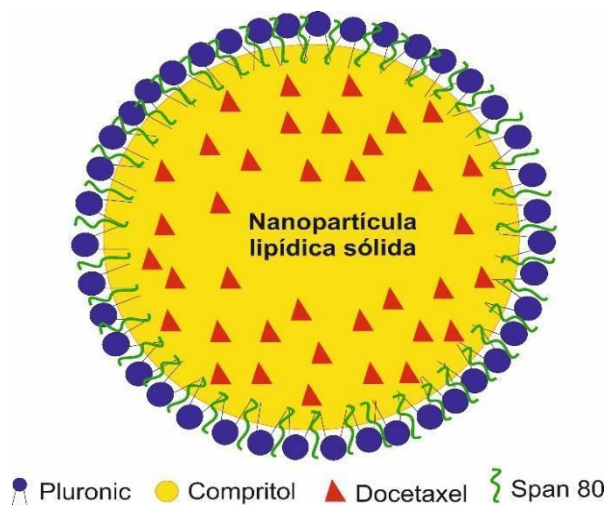
Os dados estão apresentados pela média  $\pm$  SEM (erro padrão da média) ou desvio padrão e os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Dados com distribuição normal, como o peso dos animais, foram comparados por ANOVA para avaliar diferenças entre os grupos. Nos dados sem distribuição normal usou-se o teste Kruskal-Wallis a fim de identificar diferença estatística. Para resultados significativos de ANOVA e de Kruskal-Wallis foi usado o pós-teste de Bonferroni para verificar diferenças entre os tratamentos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc).

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1 Caracterização**

#### **6.1.1 Características coloidais e estabilidade das nanopartículas lipídicas sólidas**

Nanopartículas lipídicas sólidas foram preparadas pelo método de alta energia. O compritol foi selecionado como lipídeo sólido e os surfactantes selecionados foram o Span 80 e Pluronic F127. Esta fase lipídica foi escolhida com base em alguns relatos da literatura (ABURAHMA & BADR-ELDIN, 2014; FU *et al.*, 2015; KAROLEWICZ *et al.*, 2016). A formulação final utilizada foi estabelecida a partir da que se manteve mais estável após a incorporação do docetaxel. O uso de dois surfactantes combinados ao invés de apenas um, é mais eficaz, pois reduz a tensão interfacial das nanopartículas, impedindo sua agregação, assim, produzindo nanopartículas menores e mais estáveis (HELGASON *et al.*, 2009). Um estudo comparando o Pluronic F68 e o Pluronic F127 mostrou que as nanopartículas produzidas com o Pluronic F127 produzem uma interação hidrofóbica mais forte com o DTX do que com o Pluronic F68. Isso se deve ao menor valor de balanço hidrofílico-lipofílico do Pluronic F127. O que resulta em uma melhor formulação e pode impedir a agregação de nanopartículas (PAWAR *et al.*, 2015). Assim, é muito importante escolher o surfactante de forma adequada para preparar as NLS. A Figura 17 mostra uma ilustração esquemática do modelo de nanopartícula lipídica sólida carregada com docetaxel. O modelo foi baseado na lipofilicidade do docetaxel, que em teoria seria dispersa no núcleo lipídico das NLS (FENG & MUMPER, 2013; CHO, 2015;).

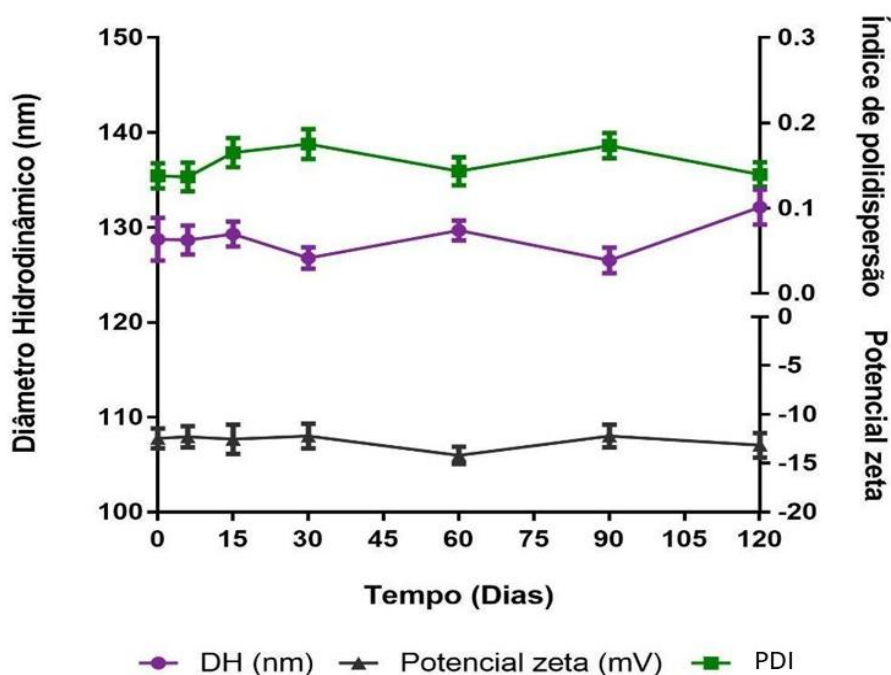


**Figura 17** - Ilustração esquemática de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS-DTX).

A interação da carga das partículas com o meio é medida com o parâmetro potencial zeta. Este parâmetro é considerado como uma referência para a estabilidade coloidal de nanopartículas. Como força superficial repelente, esse parâmetro contribui para manter as nanopartículas separadas, auxiliando assim na estabilidade da formulação (RAHMAN *et al.*, 2010). Foi verificada a estabilidade das nanopartículas ao longo de 120 dias. Na Figura 18, pode-se observar que o valor do potencial zeta variou entre -11 a -15 mV, porém, não houve diferenças significativas.

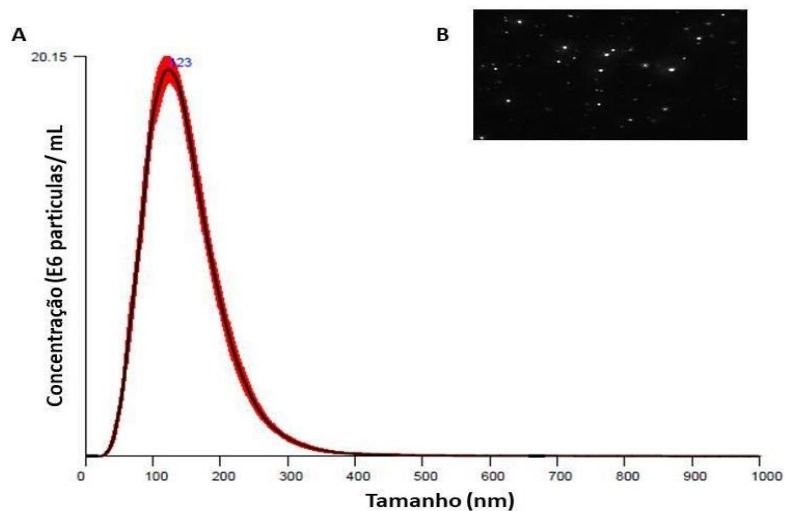
O diâmetro hidrodinâmico das NLS-DTX foi obtido por dispersão dinâmica de luz (DLS). O DH médio foi de  $128 \pm 2,2$  nm e o índice de polidispersão de  $0,153 \pm 0,02$  (Figura 18). Estudos demonstram que valores de índice de polidispersão inferiores a 0,2 indicam uma distribuição homogênea e uniforme das nanopartículas (ANTON; *et al.*, 2008; ESTELLA-HERMOSO *et al.*, 2008). Assim, o potencial zeta, o diâmetro hidrodinâmico e o PDI não apresentaram alterações significativas, indicando que as NLS-DTX são estáveis ao longo de 120 dias.





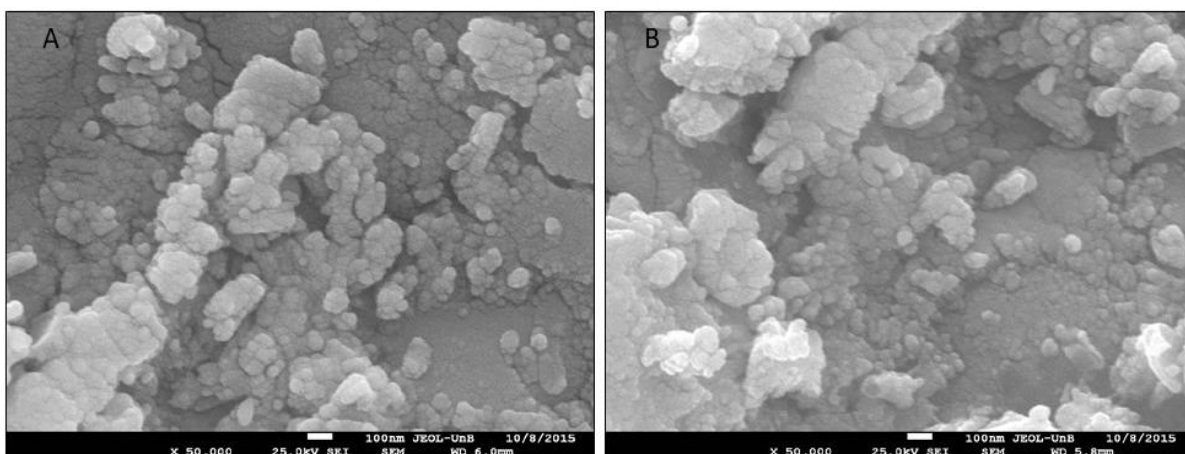
**Figura 18** – Diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI) e o potencial zeta de NLS-DTX em função do tempo.

A análise de nanopartículas por rastreamento (*Nanoparticle tracking analysis* - NTA) é um sistema inovador que consegue fazer a leitura de partículas de 30 a 1.000 nm dependendo do índice de refração das mesmas. Essa técnica combina o espalhamento de luz quando iluminadas por um laser e um dispositivo de câmera que permite a visualização e a gravação de partículas quando em solução. O NTA é capaz de identificar nanopartículas individuais se movendo sob movimento browniano (FILIPE, *et al.*, 2010). Essa técnica foi utilizada a fim de confirmar os resultados obtidos por DLS. Na Figura 19 pode-se observar que os resultados corroboram entre os valores encontrados no DLS e no NTA. Além disso, também pode-se observar uma única população de nanopartículas, sem muita variação de tamanho entre elas. Os valores de tamanho das partículas com a técnica de NTA foi de  $123 \pm 2.5$  nm.

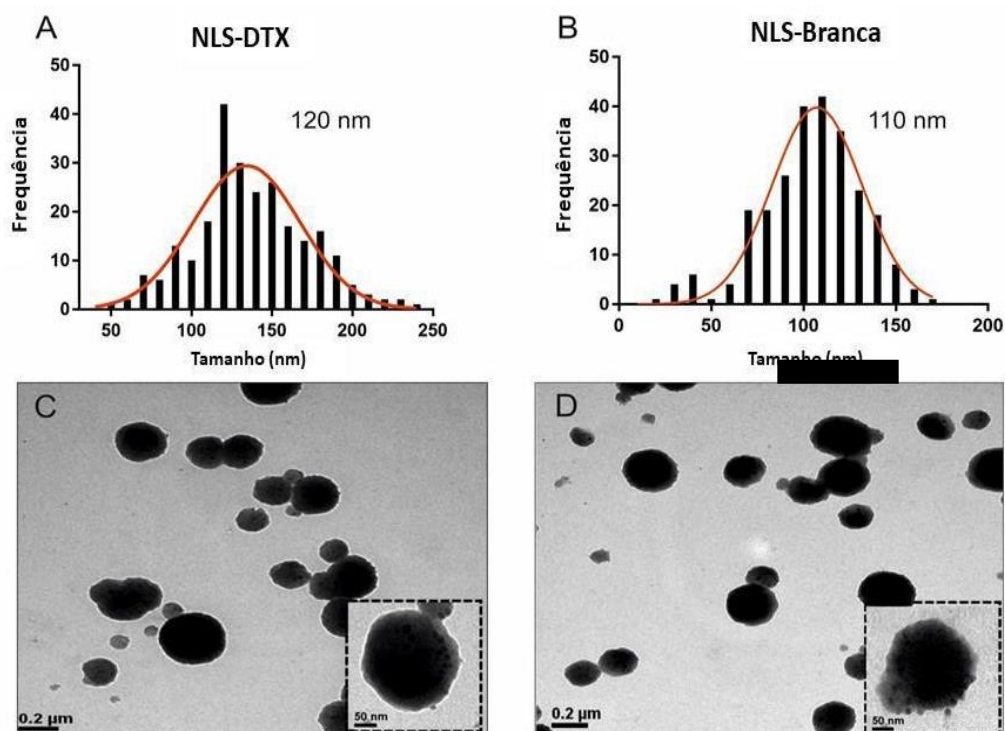


**Figura 19** – (A) Distribuição de tamanho das NLS-DTX obtido pela técnica análise de rastreamento de nanopartículas (NTA). (B) Foto do vídeo feito durante a leitura das nanopartículas por NTA. Os pontos brancos representam as nanopartículas.

Nanopartículas de tamanho médio inferiores a 500 nm com formato esférico aumentaram a eficiência da internalização na célula. As partículas esféricas têm a forma que permite a adesão às células e oferecem um alto volume do fármaco incorporado (SEMETE *et al.*, 2010). Com as micrografias de MET e MEV foi possível ver que as NLS-Branca e NLS-DTX são esféricas e uniformes (Figura 19 e 20). O tamanho médio das partículas NLS-Branca é de 110 nm e das NLS-DTX é de 120 nm (Figura 20). Esses resultados estão próximos com as medidas do DLS e NTA.

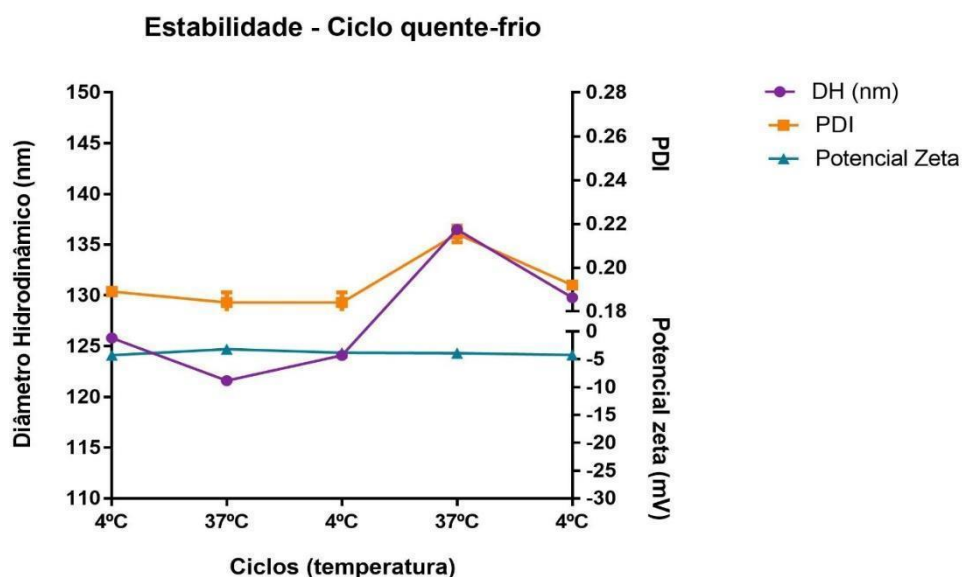


**Figura 20** - Microscopia eletrônica de varredura (MEV). (A) Micrografias dos aglomerados das NLS-DTX. (B) NLS-Branca (50.000X; 25 Kv).



**Figura 21** – (A-B) Curva de distribuição do tamanho em nanômetros das nanopartículas. Micrografias tiradas em microscópio eletrônico de transmissão (C) NLS-DTX; (D) NLS-Branca (Magnificação de 150.000X; 80 Kv).

Foi feito o teste de resfriamento e aquecimento das amostras. Neste experimento as amostras foram submetidas a ciclos de resfriamento (4°C) e aquecimento (37°C) a cada 24 horas. Foram verificados os parâmetros de DH, PDI, Potencial Zeta a cada leitura. Não houve diferença significativa nos parâmetros analisados, embora o DH e o PDI mostraram uma variação em 37°C, na quarta leitura (Figura 21). Este estudo é importante para verificar a forma para a estocagem das NLS e se houver uma mudança brusca de temperatura se estas se mantêm estáveis.



**Figura 22** – Ciclo de resfriamento e aquecimento das NLS. As amostras foram submetidas a ciclos de 4°C e 37°C. A cada troca de temperatura as amostras foram analisadas quanto aos valores de DH, PDI e Potencial Zeta.

As amostras também foram submetidas ao teste de centrifugação. Estas foram submetidas a rotação de 14.000 rpm por 1 hora e não foi possível observar precipitados ao fundo do tubo ou separação de fase após o teste. As amostras de NLS-Branca e NLS-DTX apresentaram DLS de 120 nm e 125 nm, respectivamente, e o PDI 0.2. O

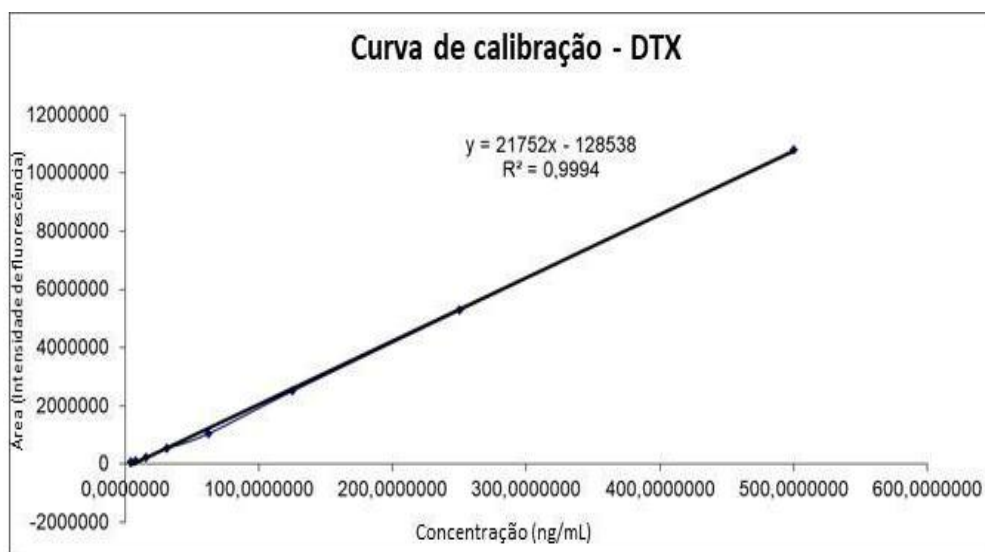
sobrenadante foi retirado cuidadosamente após a centrifugação para melhor identificar precipitados ao fundo do tubo. (Figura 22).



**Figura 23** – Estabilidade por centrifugação. NLS-Branca e NLS-DTX não apresentaram separação de fase após centrifugação.

#### **6.1.1 Quantificação de docetaxel nas NLS por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Para a quantificação do docetaxel por CLAE, uma curva analítica foi feita e o cálculo de regressão linear foi aplicado pelo método dos mínimos quadrados e feita a avaliação da associação linear por meio do coeficiente de correlação e de determinação ( $r^2$ ). A equação da reta obtida foi de  $y = 21752x - 128538$  e coeficiente de correlação obtido com a curva foi de 0,9994, como o apresentado pela Figura 24. Demonstrando uma ótima correlação entre os pontos testados, visto que o coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990 segundo a RDC N° 166, 24/07/2017 (ANVISA, 2017).



**Figura 24** – Curva de calibração do docetaxel.

### 6.1.2 Perfil de liberação do docetaxel da NLS-DTX

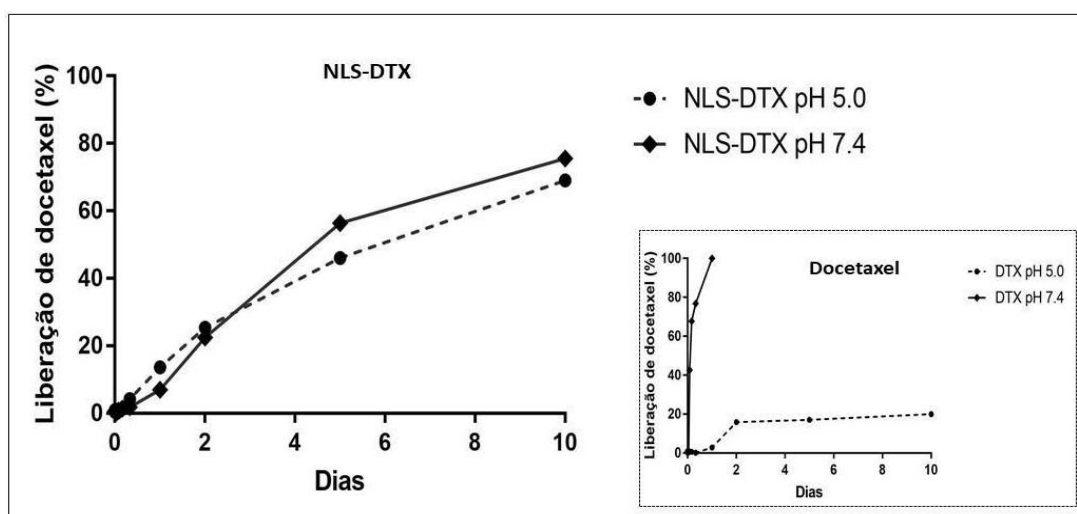
A análise do perfil de liberação *in vitro* é importante para obter informações sobre a disposição do fármaco nas NLS. O DTX, por ser lipofílico, tende a estar distribuído no núcleo da nanopartículas quando encapsulado. Durante o processo de obtenção das NLS, o DTX pode manter-se adsorvido na superfície das nanopartículas e isso pode resultar em um perfil de liberação dividido em duas fases como, uma liberação imediata (*burst effect*) e uma liberação prolongada do fármaco que está dentro da matriz lipídica. O *burst* é indicado quando há necessidade de ação do fármaco rapidamente (BOSE *et al.*, 2013).

Os perfis de liberação do DTX *in vitro* a partir de NLS-DTX foram avaliados nos pHs de 7,4, para mimetizar o pH fisiológico do sangue, e 5,0 o microambiente tumoral. Inicialmente foi possível observar o efeito *burst* em todos os perfis analisados e em seguida uma liberação controlada do DTX nas NLS-DTX em ambos os pHs. As porcentagens de liberação do acúmulo de DTX nas NLS atingiram mais de 77% em pH 5,0 e 69% em pH 7,4 em 10 dias, respectivamente. O perfil de liberação foi pH

independente (Figura 25). POUDEL *et al.* (2018), demonstraram uma liberação mais rápida do DTX encapsulado e livre em pH 5,0 quando comparado com pH 7,4, diferente dos resultados encontrados no nosso estudo. Provavelmente isso pode ter ocorrido devido à cristalização do DTX, o que dificulta a liberação deste para o meio.

É importante salientar que neste teste de liberação *in vitro* o DTX foi liberado apenas por processo de difusão. *In vivo* também ocorre a liberação por degradação enzimática da matriz lipídica e, por isso, o perfil de liberação provavelmente será diferente. A degradação enzimática das NLS é feita por lipases e depende da composição da matriz lipídica e do surfactante utilizado (OLBRICH & MÜLLER, 1999).

A liberação prolongada sugere aprisionamento homogêneo do DTX em todo o sistema. Isso se deve à difusão do fármaco e à degradação do núcleo lipídico sólido, o que leva a uma forte interação fármaco-lipídio (NAGUIB *et al.*, 2014). O benefício do sistema de liberação prolongada pode ser a redução da dose e a administração do medicamento, mantendo as concentrações do fármaco em uma janela terapêutica por um longo período de tempo (QURESHI *et al.*, 2017). A eficiência de encapsulação das NLS-DTX foi de 86%. Esse perfil afirma a aplicabilidade das NLS como um sistema promissor de encapsulamento do DTX.



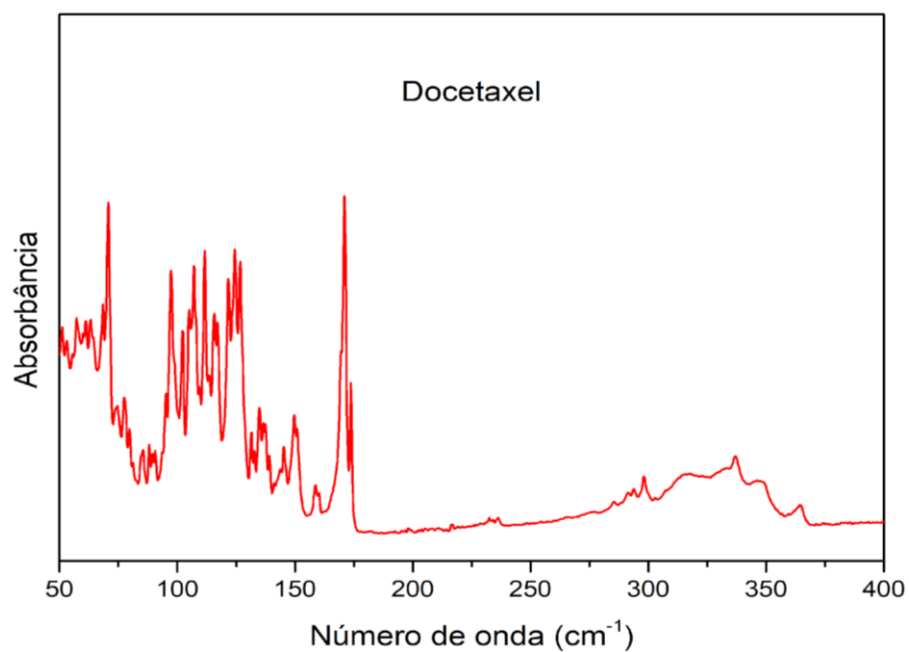
**Figura 25** - Perfil de liberação do docetaxel em NLS-DTX pelo método de diálise em pH 7,4 e 5,0. O DTX liberado foi quantificado por HPLC. Os experimentos foram feitos em triplicata.

### 6.1.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR)

A técnica de espectroscopia foi utilizada na região do infravermelho para determinar a interação no nível de grupos funcionais do material ativo (docetaxel) e do sistema carreador. Com o objetivo de estimar qualquer possibilidade de interação química entre o docetaxel e a nanopartícula lipídica sólida, espectros de FTIR dos constituintes: Compritol 888 ATO, Pluronic F127, Span 80, docetaxel e das formulações NLS-Branca e NLS-DTX foram estudados.

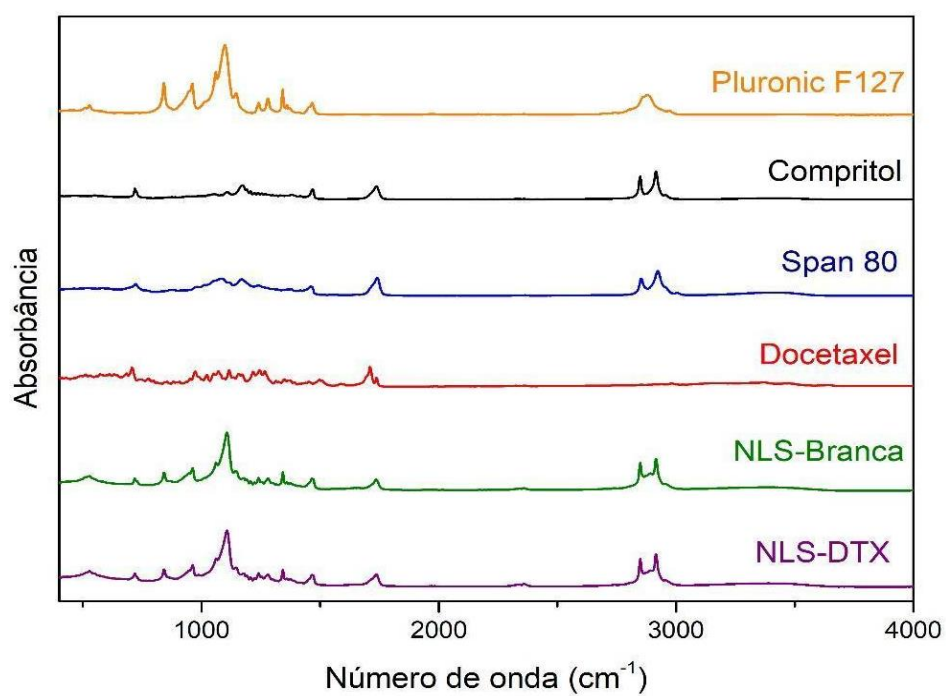
A Figura 26 apresenta o espectro de FTIR do DTX. Um estudo do espectro vibracional na região do infravermelho do docetaxel foi descrito por HAMMADI *et al.*, (2017) e este corrobora com os nossos resultados.





**Figura 26** - Espectro vibracional na região do infravermelho do docetaxel.

A Figura 27 apresenta os espectros vibracionais dos constituintes da NLS-DTX, do docetaxel livre e da NLS-Branca cujas frequências e atribuições estão contidas na Tabela 3.



**Figura 27** - Espectros vibracionais na região do infravermelho do compritol 888 ATO, Pluronic 127, Span 80, Docetaxel, NLS-Branca e NLS-DTX.

*Resultados e discussão*

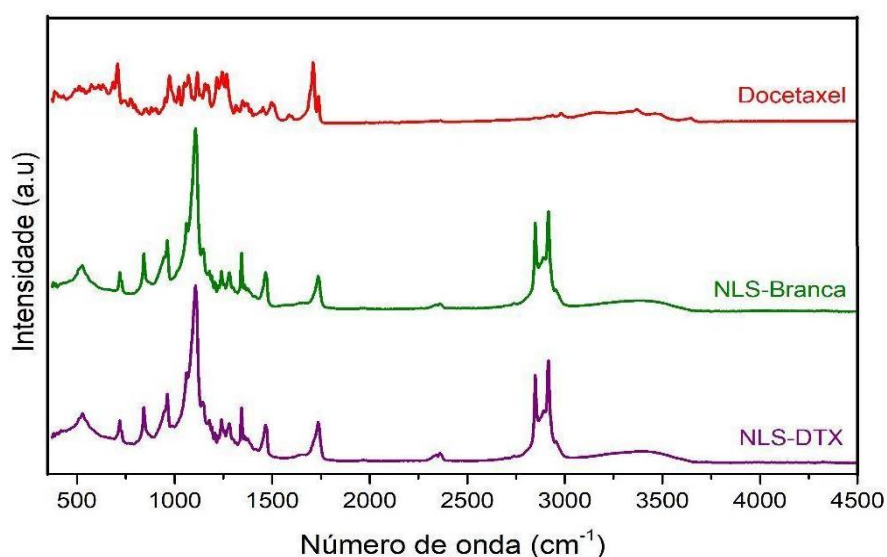
**Tabela 3** - Frequências vibracionais no IV ( $\text{cm}^{-1}$ ) referente ao Compritol 888 ATO, Pluronic 127, Span 80, docetaxel, NLS-Branca e NLS-DTX e suas respectivas atribuições.

Compostos						Atribuição
Compritol (JAGDALE et al., 2011)	Pluronic F127 (ALBANO et al., 2019)	Span 80 (FU et al., 2015a)	Docetaxel (SUNKAVALLI et al., 2016)	NLS-Branca	NLS-DTX	
3423	-	3421	3460	3371	-	$\nu\text{OH}$
-	-	-	3369	-	-	$\nu\text{NH}$
-	-	-	-	-	3389	$\nu\text{OH} + \nu\text{NH}$
2955, 2914	2967	2922	2981, 2938	2955, 2916	2955, 2916	$\nu_{\text{as}}\text{CH}$
2849	2880	2852	2853	2849	2849	$\nu_{\text{s}}\text{CH}$
1736		1740	1738, 1709	1736	1736	$\nu\text{C}=\text{O}$
-	-	-	1587	-	-	N-H
-	-	-	1497, 1437			$\nu\text{C}=\text{C}$ (aromático)
1468	1466	1461, 1377	-	1466	1466	CH ( $\text{CH}_2$ alcano)
-	-	-	1375, 1267, 1244, 1171, 1117, 1070, 1022	1342	1342	$\nu\text{C}-\text{O} + \nu\text{C}-\text{N}$
	1342, 1279	-	-	-	-	COC
1190, 1173	-	1169, 1084	-	-	-	$\nu\text{CO}$
1109	-	-	-	1107, 1060	1107	$\nu\text{CO}$
-	961, 841		974 e 708	962	962	CH
719	-	721	-	719	719	Rocking $\text{CH}_2$

## Resultados e discussão

O espectro de FTIR do DTX mostrou bandas em  $3369\text{ cm}^{-1}$  atribuída aos  $\nu\text{O-H}$  e  $\nu\text{N-H}$ ,  $1437\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao  $\nu\text{C=C}$ , duas bandas atribuídas ao modo vibracional  $\nu\text{C=O}$ , uma em  $1738\text{ cm}^{-1}$  e outra em  $1709\text{ cm}^{-1}$ , referentes aos grupos carbonila do éster e da cetona, respectivamente. Ainda, pode-se visualizar bandas em  $2982\text{ cm}^{-1}$  e  $2937\text{ cm}^{-1}$  atribuídas ao  $\nu_{\text{as}}\text{CH}$  e  $\nu_{\text{s}}\text{CH}$ , respectivamente, e uma em  $709\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao  $\delta\text{CH}$  (HAMMADI *et al.*, 2017).

Ao analisar a Figura 28 observa-se que o espectro da NLS-Branca é muito semelhante ao da formulação NLS-DTX, ainda, é possível observar que nenhuma mudança significativa no ambiente do carreador ocorre após a incorporação do DTX na nanopartícula. Ao comparar os espectros do DTX e da formulação NLS-DTX não se observa as bandas características do fármaco presente no espectro do carreador. Resultados semelhantes foram observados por ALBANO *et al.*, (2019) que estudaram o DTX incorporado em nanopartícula lipídica polimérica, na análise do FTIR foi possível verificar a ausência das bandas do DTX no espectro da formulação NLS-DTX.

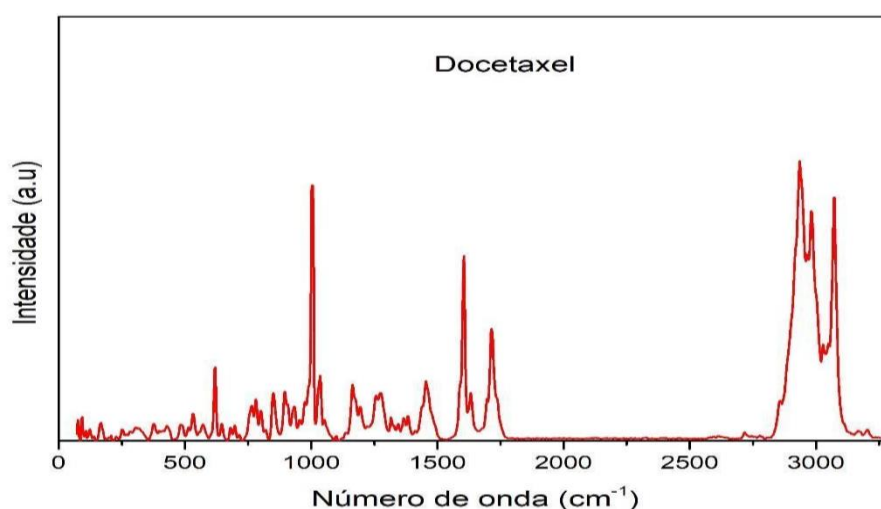


**Figura 28** - Espectros vibracionais na região do infravermelho do Docetaxel e das formulações NLS-Branca e NLS-DTX.

Durante a formulação de um sistema carreador, nesse estudo nanopartícula lipídica sólida, há sempre a possibilidade de qualquer tipo de interação físico-química como, a formação de ligações de hidrogênio entre os constituintes da NLS e o fármaco, o que leva a alterações na frequência. O lipídio sólido pode ser capaz de interagir com os grupos funcionais do DTX acima mencionados. Entretanto, o espectro das NLS mostra picos característicos dos grupos funcionais similares, confirmando que a formulação foi bem-sucedida. Assim, fornecendo evidências de que tais interações de ligações de hidrogênio não estão presentes na nanopartícula preparada e que o fármaco permaneceu intacto durante o procedimento de preparo das nanopartículas. Assim, a análise de FTIR indicou ausência de qualquer interação do fármaco e o lipídio sólido durante a formulação das nanopartículas, o que corrobora com os resultados do estudo de JAIN *e* colaboradores (2014).

#### 6.1.4 Espectroscopia Raman

O espectro de Raman do docetaxel é apresentado na Figura 29 e as respectivas atribuições estão contidas na Tabela 4.



**Figura 29** - Espectro de Raman do Docetaxel (DTX).

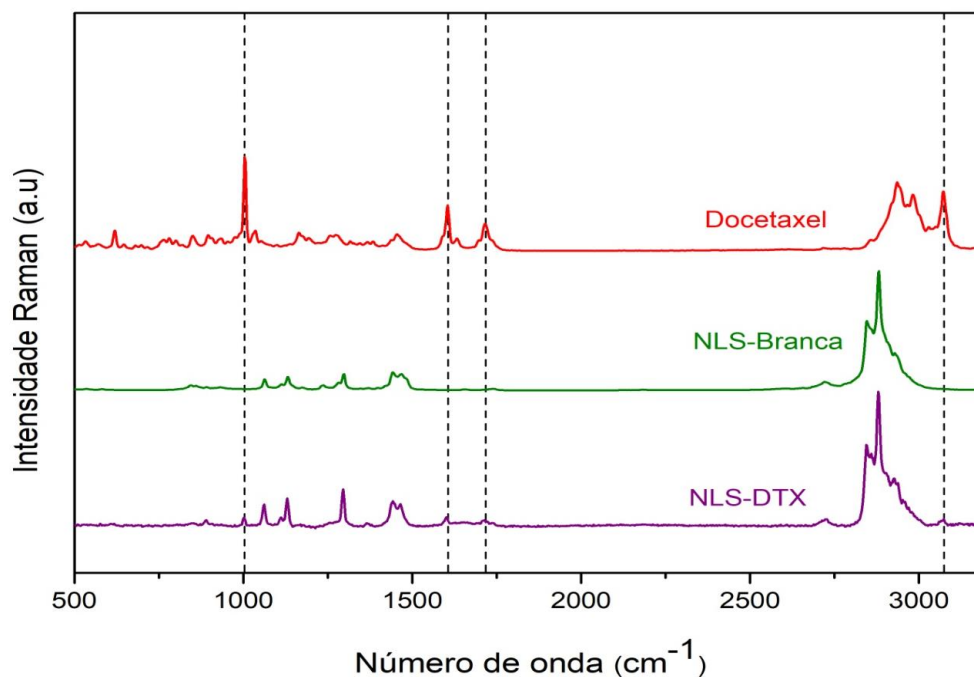
**Tabela 4** - Atribuições dos modos vibracionais de espectros de Raman do Docetaxel e NLS-DTX.

Compostos		Atribuição
Docetaxel (DTX)	NLS-DTX	
1715	1714	C=O
1632	1636	C=C (aromático) conjugado com C=O
1605	1602	C=C (aromático) + CO
1455	1465, 1442	CH (CH <sub>2</sub> e CH <sub>3</sub> )
1367	1369	CH (CH <sub>2</sub> e CH <sub>3</sub> )
1316	-	CH (CH <sub>2</sub> e CH <sub>3</sub> )
1275	-	C-alquil
1256	-	C-O (álcool)
1195, 1164, 1035 e 1006	1167, 1004	C=C (aromático)
956	-	<i>Rocking</i> CH (metila)
896	893	<i>Rocking</i> CH (metila)
799, 780, 763	-	CH
694, 620	-	C=C (aromático)

As bandas do espectro em 620 e 1006  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas a vibrações aromáticas do benzeno monossustituído. Enquanto em 1605, 1632 e 1715  $\text{cm}^{-1}$ , as bandas vibracionais foram, respectivamente, atribuídas ao éster, estiramento aromático ( $\nu\text{C}=\text{C}$ ) (conjugado com o grupo carbonila) e grupos carbonila presentes no fármaco DTX. Há também bandas largas com ombros na região de 1200-1500  $\text{cm}^{-1}$ ; este grupo de picos é atribuído à deformação de CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>. No entanto, o grupo de álcool secundário também

está presente na região de 1200–1430  $\text{cm}^{-1}$ , portanto, uma banda adicional a 1255  $\text{cm}^{-1}$  (LOISEAU *et al.*, 2017).

A Figura 30 apresenta os espectros de Raman da formulação branca comparada a sua respectiva formulação contendo o docetaxel (NLS-DTX). Analisando a figura é possível observar as bandas em 1605, 1636 e 1715  $\text{cm}^{-1}$  no espectro da NLS-DTX, que não são observadas no espectro da NLS-Branca, e que são atribuídas aos modos vibracionais  $\nu\text{C-O}$  do grupo éster,  $\nu\text{C=C}$  (aromático) conjugado ao grupo carbonila, e  $\nu\text{C=O}$  do grupo carbonila. A presença dessas bandas características do composto DTX, mesmo que em uma baixa intensidade, nos permite inferir que o fármaco está presente no sistema lipídico (NLS-DTX). Observa-se ainda no espectro de Raman DTX diversos picos em 620  $\text{cm}^{-1}$ , 896  $\text{cm}^{-1}$ , 1006  $\text{cm}^{-1}$ , 1275  $\text{cm}^{-1}$  e 1605  $\text{cm}^{-1}$ . Entretanto, esses picos diminuíram ou estão ausentes no espectro de Raman da NLS-DTX, sendo estes indícios de que a estrutura cristalina do fármaco foi perdida após a sua incorporação no carreador ou pela baixa concentração do fármaco na formulação. O mesmo foi observado no estudo de GAO *et al.*,(2011) que incorporou DTX em nanopartícula lipídica de albumina, no qual as bandas em 615  $\text{cm}^{-1}$ , 893  $\text{cm}^{-1}$ , 1000  $\text{cm}^{-1}$ , 1272  $\text{cm}^{-1}$  e 1599  $\text{cm}^{-1}$  do DTX tiveram sua intensidade reduzida ou desapareceram após a incorporação no nanosistema.



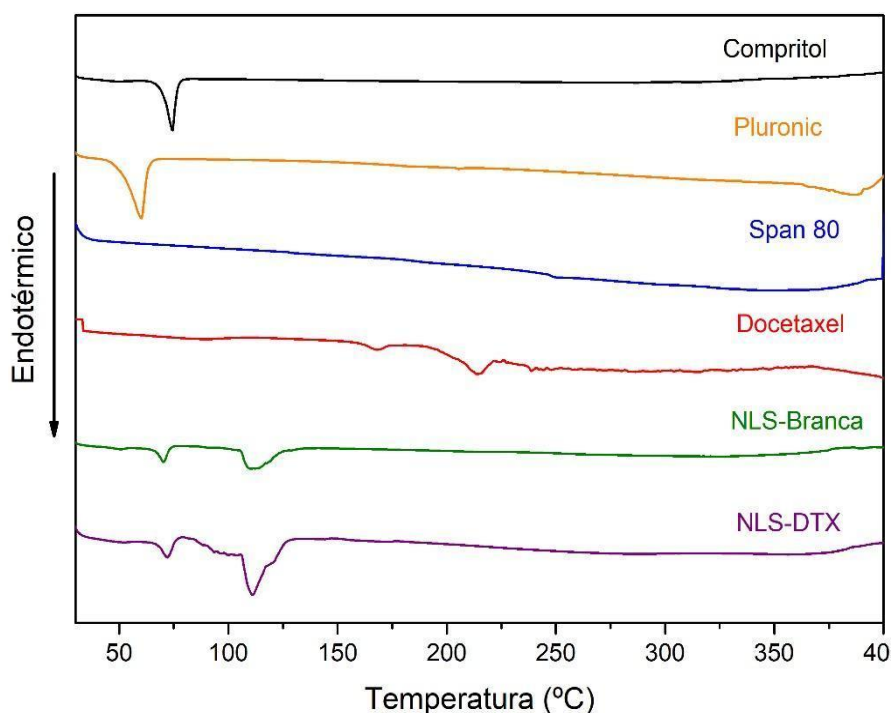
**Figura 30** – Espectros de Raman do docetaxel e das formulações NLS-Branca e NLS-DTX. As linhas sinalizam a região onde os picos de docetaxel aparecem na NLS-DTX.

### 6.1.5 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) é geralmente usada para obter informações sobre as propriedades físicas e energéticas de um composto ou formulação. O DSC mede a perda ou ganho de calor como resultado de alterações físicas ou químicas dentro de uma amostra em função da temperatura (KAUR *et al.*, 2015).

A Figura 31 contempla as curvas DSC do Compritol ATO 888, Pluronic F127, Span 80, Docetaxel, NLS-Branca e NLS-DTX. Os dados térmicos (ponto de fusão e  $\Delta H$ ) dos constituintes da nanopartícula lipídica sólida e do fármaco docetaxel estão apresentados na Tabela 5.





**Figura 31** – Termograma das formulações NLS-DTX e NLS-Branca; docetaxel e dos componentes das formulações: Compritol, Pluronic e Span 80.

**Tabela 5** – Calorimetria diferencial de varredura (DSC) dos constituintes das nanopartículas lipídicas sólidas e docetaxel.

Amostra	T <sub>pico</sub> /°C	Δ H (J/g)
Compritol	73.50	95.05
Pluronic	57.51	133.05
Span 80	129	34.60
Docetaxel	168.1	7.92

O polimorfismo lipídico ocorre devido à diferença nas possibilidades de empacotamento lateral de cadeias de ácidos graxos em uma organização particular de cadeias de hidrocarbonetos (SMALL, 1984). FREITAS & MÜLLER (1999), os lipídios

existem em diferentes estruturas tridimensionais: instável  $\alpha$ , metaestável  $\beta'$  e a modificação mais estável  $\beta$ . A forma adicional intermediária  $\beta_i$  existe entre  $\beta'$  e  $\beta$ . O ponto de fusão do Compritol 888 ATO está no intervalo de 69 a 74°C, de acordo com o polimorfismo usado, a forma polimórfica  $\beta$  mais estável tem o mais alto ponto de fusão em comparação as formas instáveis  $\alpha$  ou metaestável  $\beta'$  (ABURAHMA; BADR-ELDIN, 2014). Ao analisar a curva DSC do Compritol 888 ATO (Figura 31) observa-se um evento endotérmico em 73,50°C, correspondendo ao ponto de fusão do composto na forma mais estável,  $\beta$ . No estudo de Rahman e colaboradores (2010), também observaram o ponto de fusão do Compritol 888 ATO em 71,2°C, indicando a natureza cristalina  $\beta$ .

Ao analisar a curva DSC do Pluronic F127, observa-se um evento endotérmico em 57,51°C correspondente ao ponto de fusão do composto, resultado semelhante foi observado no trabalho de NEWA e colaboradores (2008) e KAROLEWICZ *et al.*, (2016) no qual os autores observaram esse evento em 57,29°C e 53,42°C, respectivamente. Span 80 a temperatura ambiente (temperatura inicial de análise) é líquido (FU *et al.*, 2015) não sendo possível visualizar na curva DSC o ponto de fusão.

Na Figura 31, a curva DSC do Docetaxel apresenta um evento endotérmico em 168,1 °C, correspondente ao ponto de fusão do fármaco (ZENG *et al.*, 2013). Esse pico não está presente na curva DSC da NLS-DTX. As curvas DSC da NLS-Branca e NLS-DTX tem perfis muito similares, com exceção de um pico endotérmico em 50,93°C presente no termograma da formulação sem DTX que pode ser atribuído a fusão do Pluronic F127 que não é observado na curva da nanopartícula contendo DTX.

O DSC da NLS-DTX mostrou que o pico de fusão do DTX não está presente na curva calorimétrica da formulação, evidenciando a ausência de fármaco cristalino na amostra. Este resultado sugere que a incorporação inibiu a cristalização do DTX durante

a formação da nanopartícula. Assim, pode-se supor que o fármaco está presente na nanopartícula em uma fase cristalina desordenada ou amorfa ou no estado de solução sólida.

No estudo realizado por FENG e colaboradores (2009), também não foi possível observar os picos referentes à fusão do DTX na curva de DSC da formulação de nanopartícula contendo o fármaco.

SANNA e colaboradores (2011), estudaram partículas poliméricas de policaprolactona e poli (ácido lático-co-ácido glicólico) contendo DTX para o tratamento do câncer de próstata. Os autores observaram que em todas as nanopartículas analisadas, as curvas de DSC mostraram que o pico de fusão do DTX desapareceu totalmente da curva calorimétrica, evidenciando a ausência de fármaco cristalino nas amostras.

O pico de fusão do DTX também não foi observado na curva da nanopartícula polimérica constituída de Pluronic F68 e caprolactona sintetizada por MEI e colaboradores (2009).

## **6.2 Testes *in vitro***

### **6.2.1 Teste de viabilidade das células 4T1 após 24 e 48 horas de tratamento com as NLS-DTX e DTX**

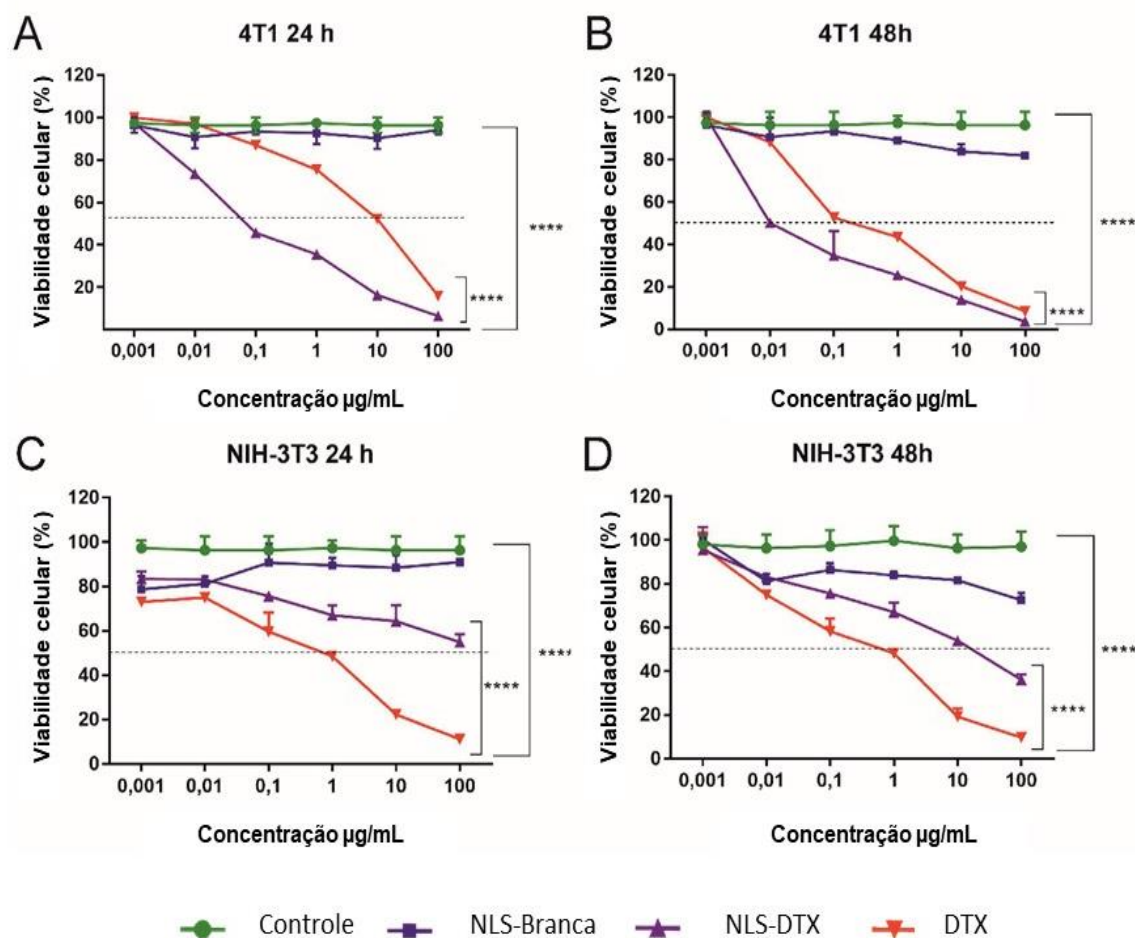
Para avaliar a citotoxicidade das NLS-DTX, o ensaio MTT foi realizado usando células 4T1 e NIH-3T3. Os resultados foram comparados com os de uma formulação de DTX disponível clinicamente, e a citotoxicidade das NLS-Branca também foi investigada. As células foram tratadas nas concentrações 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 e 100 µg/mL equivalentes de DTX por 24 h (Fig. 32 A; C) e 48 h (Fig. 32 B; D). A NLS-Branca

## Resultados e discussão

---

não reduziu significativamente a viabilidade celular. Pode-se inferir que a composição da NLS-Branca é biocompatível.

Os valores de  $IC_{50}$  das NLS-DTX em células 4T1 foi de 0,08  $\mu\text{g/mL}$  (24h) e 0,01  $\mu\text{g/mL}$  (48 h) e do DTX livre foi de 10  $\mu\text{g/mL}$  (24 h) e 0,3  $\mu\text{g/mL}$  (48 h), indicando que a citotoxicidade é tempo e dose dependente. NLS-DTX mostrou maior citotoxicidade contra células cancerígenas. O DTX livre foi tóxico para células NIH-3T3 não cancerígenas, mostrando que a NLS-DTX é significativamente seletivo para células cancerígenas. A NLS-DTX demonstrou um valor de  $IC_{50}$  significativamente menor ( $p < 0,0001$ ), e foi encontrado em concentração 100 vezes menor do que o DTX livre, indicando maior citotoxicidade e eficiência das nanopartículas. Assim, concluiu-se que a NLS-DTX é mais eficaz, uma vez que uma quantidade menor de fármaco utilizada resultou em efeitos comparáveis aos encontrados com o DTX livre. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores que mostraram que a citotoxicidade das nanopartículas à base de lipídios é maior que a dos fármacos livres (XU *et al.*, 2009; SANNA *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2011; ZHU *et al.*, 2015; QURESHI *et al.*, 2017;). O mecanismo de eficácia aprimorada da citotoxicidade da NLS-DTX pode ser devido à sua rápida absorção e alta permeabilidade, que permitem que as nanopartículas intracelulares se acumulem, mediadas por endocitose (LIU *et al.*, 2011; HAMMADI *et al.*, 2017;), como mostrado em nossos resultados de TEM (internalização) e captação celular.



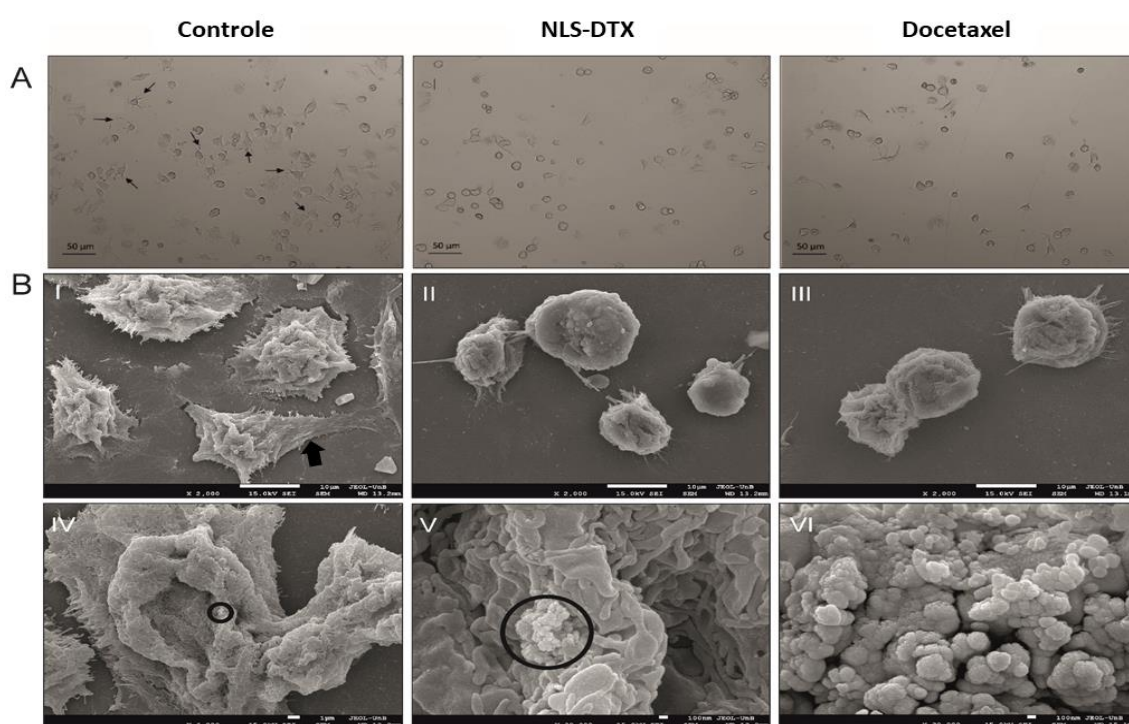
**Figura 32** - Viabilidade das células 4T1 (A e B) e NIH-3T3 (C e D) após 24 e 48 horas de tratamento com DTX livre, NLS-Branca e NLS-DTX a 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 e 100 µg/mL (concentrações equivalentes de DTX), avaliadas por ensaio de MTT. Os dados são expressos com média ± erro padrão da média (\*\*\*\* p < 0,0001).

### 6.2.2 Morfologia celular

Na análise das células por contraste de fase e microscopia eletrônica de varredura é possível observar que as células tratadas e não tratadas apresentam diferenças morfológicas (Figura 33). As células controle possuem uma superfície celular lisa com projeções citoplasmáticas características (Figura 33-B1). A morfologia de ambas as células, após exposição aos tratamentos DTX e NLS-DT, foi alterada. As projeções

## Resultados e discussão

citoplasmáticas diminuíram e o volume das células foi reduzido. Estudos anteriores mostraram resultados semelhantes (WANG *et al.*, 2016; HAMMADI *et al.*, 2017;). Além disso, foi possível observar aglomerados de NLS-DTX em células 4T1 (Figura 33- B V). Essas alterações morfológicas na superfície das células podem estar relacionadas à ruptura na dinâmica do citoesqueleto promovida pelo DTX (HERMENEAN & ARDELEAN, 2017).



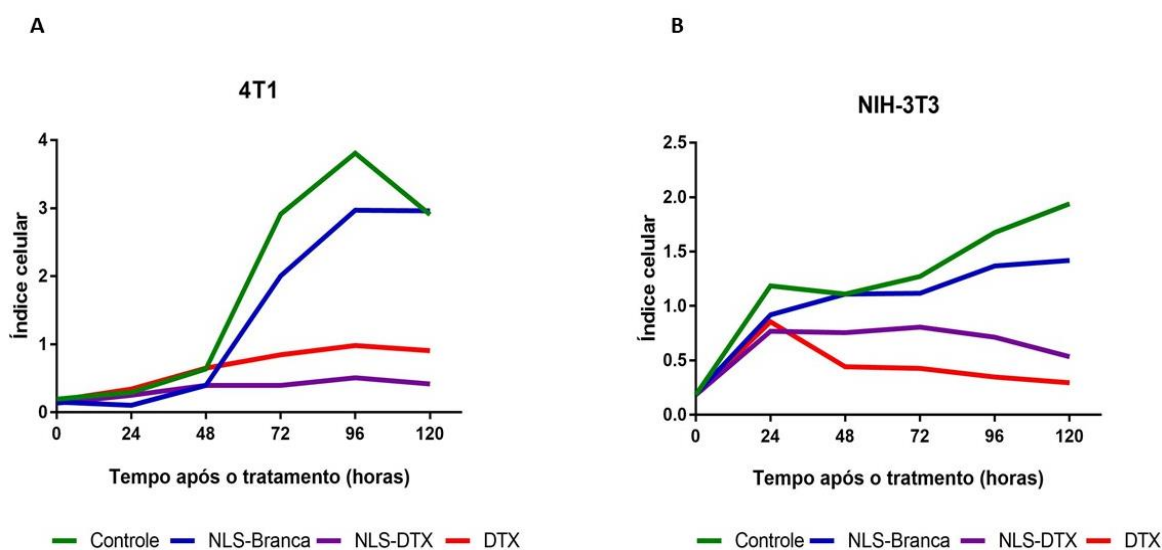
**Figura 33** - Morfologia das células de adenocarcinoma da mama murino (4T1). (A) Microscopia de luz (contraste de fase) – Células controle (sem tratamento), células tratadas com NLS-DTX ou DTX. As setas mostram as projeções citoplasmáticas nas células. As células foram tratadas com 10 μg/mL por 24 h. Objetiva: 10x. (B) Micrografias de Microscopia eletrônica de varredura (MEV). - (I) Controle (células não tratadas). Células tratadas com: (II) DTX; (III-V) NLS-DTX; (VI) aglomerado NLS-DTX (sem células). A região destacada com um círculo exhibe aglomerados de nanopartículas. As micrografias foram tiradas em 2.000x (I-III), 4.000x (IV) e 30.000 (V-VI).

### **6.2.3 Perfil de proliferação das células NIH-3T3 e 4T1 após tratamento com DTX, NLS-Branca, NLS-DTX em Tempo Real**

Para complementar os resultados de viabilidade celular, obtidos pela técnica de MTT, foi realizado o monitoramento do índice celular em tempo real com as células 4T1 e NIH-3T3.

Nas células 4T1 foi possível observar um aumento no índice celular no tempo de 48 horas. O tratamento que mais reduziu o índice celular foi a NLS-DTX, como pode ser observado na figura 34. O índice celular NLS-Branca se manteve próximo ao do grupo controle (Figura 34 A). As células do grupo controle começam a reduzir o índice celular a partir de 96 horas. Esses resultados corroboram como os dados do MTT relacionado a atividade do tratamento com NLS-DTX.

Nas células NIH-3T3 foi observado que antes de 24 horas de tratamento ocorreu uma redução no índice celular do DTX. A NLS-Branca teve comportamento similar ao controle (Figura 34 B). Após 120 horas de análise não foi possível observar morte devido à alta confluência celular.



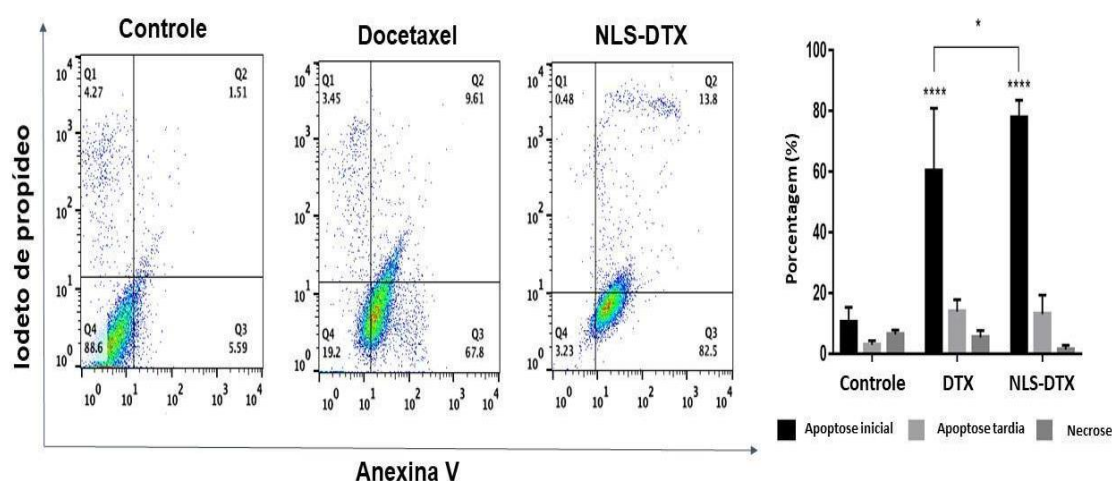
**Figura 34** - Índices de adesão celular em tempo real das células (A) 4T1 e (B) NIH3T3 ao longo de 120 horas de monitoramento. Avaliado por RTCA. As células foram tratadas com o valor do IC<sub>50</sub>. Grupos: Controle (meio de cultivo), NLS-Branca, NLS-DTX e DTX. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média.

#### 6.2.4 Morte celular

A apoptose é o principal mecanismo de morte celular em resposta ao docetaxel. A apoptose ocorre quando as células externalizam um lipídeo encontrado na superfície interna da membrana celular, a fosfatidilserina, indicada pela marcação com Anexina-V. Geralmente, células viáveis que possuem membranas intactas não interagem com iodeto de propídio (PI), enquanto as membranas das células mortas são permeáveis ao PI (SANNA *et al.*, 2011). É possível diferenciar células viáveis (negativas para a anexina V-FITC e iodeto de propídio), apoptose inicial (positiva para a anexina V-FITC e negativa para PI), apoptose tardia (positiva para a anexina V-FITC e PI) e necrose (positiva para PI). As células apoptóticas mostram alterações no nível morfológico e bioquímico, como



condensação citoplasmática nuclear e agregação de cromatina. É o tipo de morte celular programada na qual há a degradação dos componentes intracelulares sem seu extravasamento para o meio extracelular, uma vez que não há o rompimento da membrana celular e, portanto, se mantém a homeostase/equilíbrio do tecido. Por outro lado, a necrose mostra uma consequência passiva de lesão grave na célula com consequências fisiológicas muito diferentes da apoptose. Na necrose, a capacidade da célula de manter a homeostase é prejudicada. Todo o material que está dentro da célula é expulso para o meio extracelular pelo rompimento de sua membrana causando um desequilíbrio do tecido e das regiões adjacentes e levando a uma morte celular danosa para o tecido, uma vez que desencadeia o processo inflamatório devido a liberação do material intracelular (PATEL *et al.*, 2018). A apoptose inicial é representada pelas células que se acumulam no quadrante inferior direito do gráfico de pontos traçado entre a anexina V-FITC e o iodeto de propídio. Como mostrado na Figura 35, as taxas de apoptose inicial e tardia no grupo controle foram de 5,5% e 1,5%, respectivamente. As células em apoptose inicial na presença da NLS-DTX exibiram uma taxa significativamente mais alta de 82,5%, em comparação com células tratadas com DTX livre, (67,8%), o que pode ser atribuído à maior disponibilidade de DTX das NLS. Estes resultados são consistentes com os dados da análise do ciclo celular e sugerem que a NLS-DTX aumentou significativamente a porcentagem de apoptose dependente de DTX nas células 4T1 em comparação com o fármaco livre.



**Figura 35** - Gráfico representativo da distribuição de células apoptóticas após marcação dupla com anexina V-FITC (eixo horizontal) e iodeto de propídeo (eixo vertical). As células marcadas com anexina V-FITC e iodeto de propídeo mostram apoptose inicial (quadrante inferior direito) e apoptose tardia (quadrante superior direito). No lado direito, a porcentagem de células é apresentada. Grupos: células não tratadas, NLS-DTX e DTX. As células foram tratadas com 10  $\mu\text{g/mL}$  por 24 h. Os dados são apresentados como média - desvio padrão de três experimentos (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

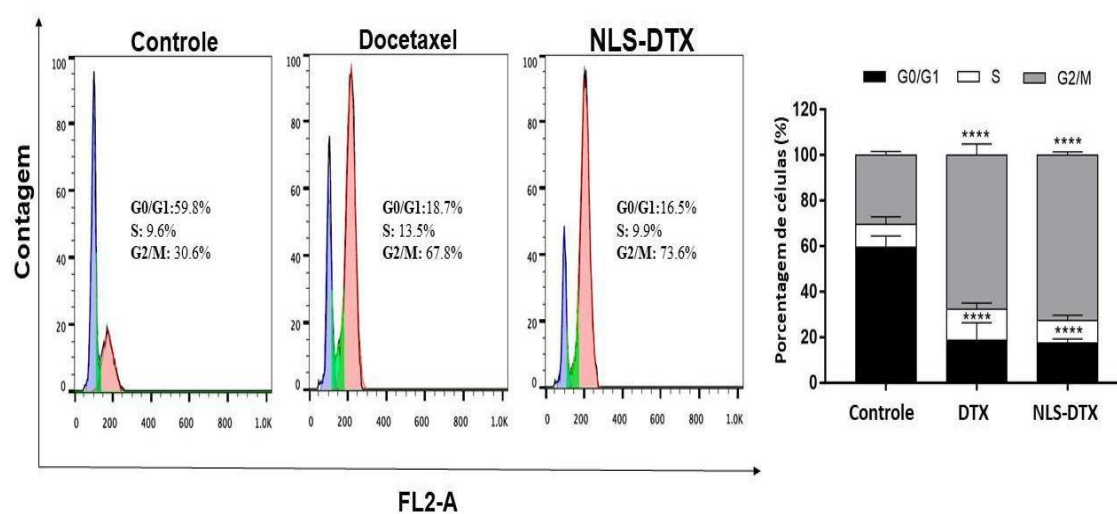
### 6.2.5 Ciclo celular

A desregulação do ciclo celular é uma das características das células cancerosas. Portanto, a indução da parada do ciclo celular pode ser uma estratégia boa e eficaz para controlar a proliferação aberrante de células cancerígenas (ZHAO *et al.*, 2018). Sabe-se que o docetaxel induz danos aos microtúbulos, o que resulta em parada prolongada em G2/M e subsequentemente apoptose (WANG *et al.*, 2015).

O conteúdo de DNA celular da população foi observado por meio da marcação com Iodeto de Propídeo (PI). Esse marcador é um intercalante de DNA, e com isso a

quantidade de marcação presente na célula está relacionada à quantidade de DNA que essa célula possui. Assim, em análise por citometria de fluxo, pode-se quantificar as populações que possuem 2N de DNA, populações em G0/G1; com 4N de DNA, populações em G2/M; e as intermediárias, que estão na fase S. Ainda, aquelas células cujo DNA está fragmentado apresentam uma quantificação de fluorescência abaixo do pico G0/G1, sendo então chamadas de pico sub-G1.

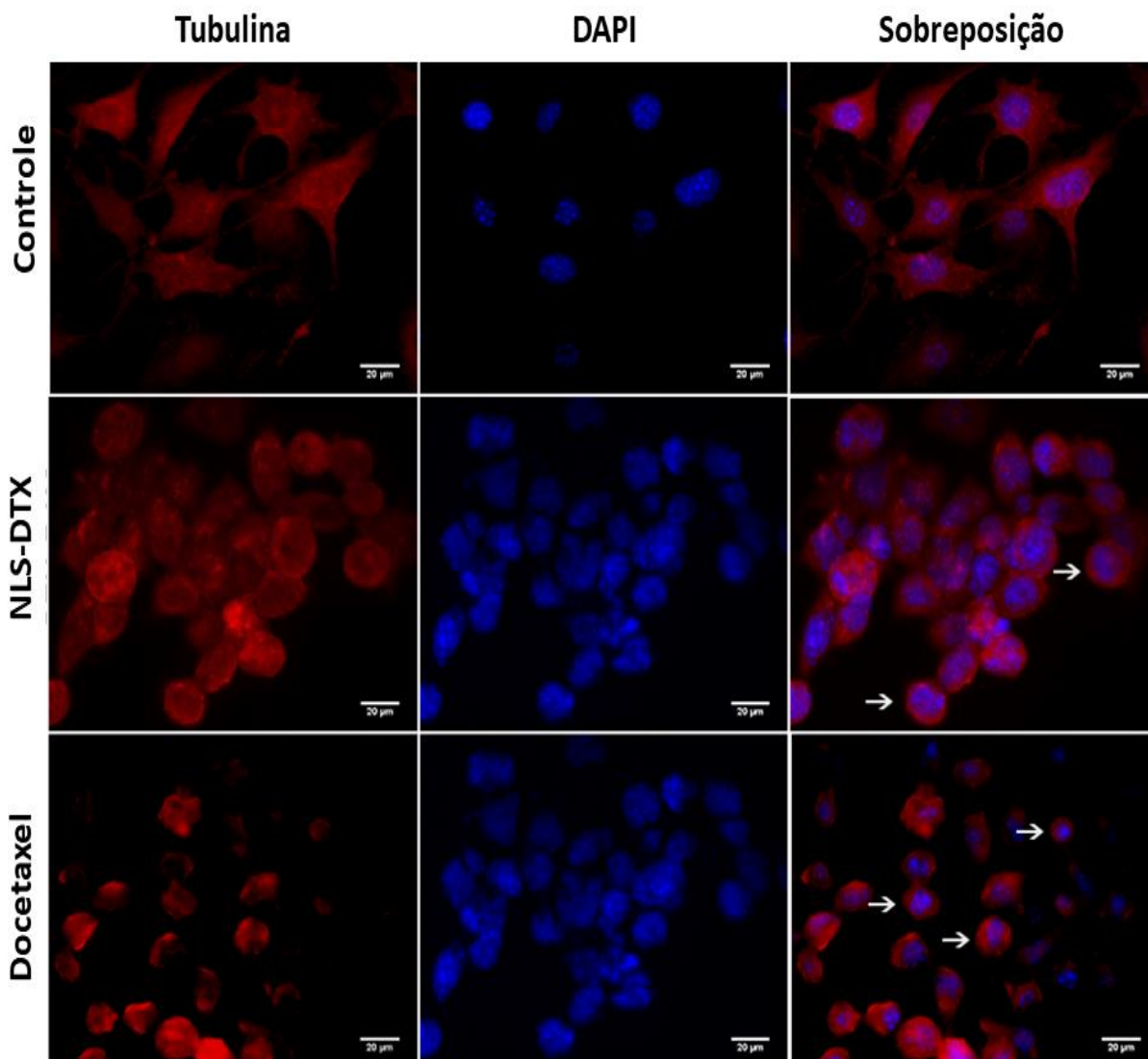
A análise do ciclo celular de células 4T1 expostas à NLS-DTX ou DTX é apresentada na Figura 36. Consistente com os dados da literatura (HERNÁNDEZ-VARGAS *et al.*, 2007; LUO *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2015), as células tratadas com NLS-DTX ou DTX resultaram em uma parada na fase de G2-M, com uma diminuição significativa na fase G0/G1 em comparação às células controle. O acúmulo na fase G2/M foi significativamente maior nas células tratadas com NLS-DTX (73,6%) do que nas células tratadas com DTX livre (67,8%), quando comparados ao grupo controle, sugerindo que DTX foi liberado no citosol, causando parada do ciclo celular na fase G2/M. Estes resultados são consistentes com os dados obtidos pela análise MTT e fornecem mais evidências para possíveis aplicações clínicas das NLS-DTX.



**Figura 36** - Perfis representativos de citometria de fluxo da distribuição da fase do ciclo celular de células 4T1. O primeiro pico indica conteúdo 2N de DNA com populações na fase G0/G1 (roxo); o segundo pico indica conteúdo de 4N de DNA na fase G2/M (rosa), e entre os dois picos está a fase S (verde). Grupos: Controle (células não tratadas), Células tratadas com: NLS-DTX e DTX. As células foram tratadas com 10  $\mu\text{g/mL}$  por 24 h. Os dados são apresentados como média - desvio padrão de três experimentos (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

### 6.2.6 Efeitos do DTX nos microtúbulos de células 4T1

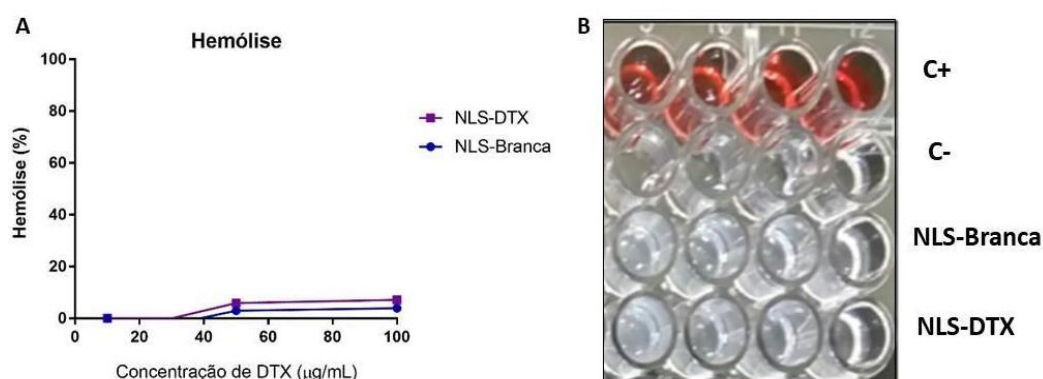
O DTX tem a capacidade de induzir um efeito citotóxico pela ligação à subunidade  $\beta$  tubulina (QIU *et al.*, 2017). Na Figura 37, as células não tratadas são mostradas com redes de microtúbulos organizados e extensos. No entanto, as células tratadas com DTX livre e NLS-DTX mostraram microtúbulos estabilizados e mais curtos, resultando em feixes de microtúbulos que se curvavam ao redor do citoplasma, sugerindo uma alteração na regulação da dinâmica dos microtúbulos provocada pelo DTX. Esses resultados mostram que o DTX liberado das NLS apresentou efeitos semelhantes aos do DTX livre em uma concentração relativamente baixa.



**Figura 37** - Ensaio de imunofluorescência de células 4T1 mostrando os efeitos causados após os tratamentos na organização dos microtúbulos. Os microtúbulos e a coloração nuclear são mostrados separadamente (Tubulina e DAPI, respectivamente) e combinados (sobreposição), para células 4T1 não tratadas ou tratadas com NLS-DTX ou DTX 10 µg/mL por 4 h. As setas mostram a desorganização de microtúbulos. (Objetiva 63X).

### **6.2.7 Hemólise**

Nanopartículas lipídicas sólidas são cada vez mais estudadas com intuito de serem utilizadas como carreadores de fármacos para administração intravenosa (LI, 2009). Devido a toxicidade já relatada do Span 80, um componente das nanopartículas, tornou-se necessário investigar a atividade hemolítica para avaliar a toxicidade *in vitro* e possíveis danos a membrana durante a aplicação das nanopartículas. Após o tratamento dos eritrócitos com as NLS-DTX não houve indução de hemólise significativa quando comparado com a NLS-Branca, indicando que não houve ruptura detectável nas membranas dos eritrócitos (Figura 38). As NLS-DTX induzem menos de 5% de hemólise. Já as NLS-Branca, a taxa de hemólise foi menor que 3%. Os tratamentos possuem um baixo potencial hemolítico o que sugere que os lipídeos, componentes das nanopartículas, podem reduzir a interação com componentes do sangue. Resultados parecidos foram encontrados por FANG e colaboradores (2014), onde encontraram hemólise menor que 4% após exposição a nanopartículas de hidrofonia contendo docetaxel.



**Figura 38** - Análise quantitativa da atividade hemolítica das NLS em eritrócitos. As células sanguíneas foram expostas com as NLS-DTX e NLS-Branca por duas horas. As diferentes concentrações foram avaliadas em quadruplicata por espectrofotometria utilizando a absorbância da hemoglobina. A) porcentagem de hemólise. B) Fotografia representativa do experimento da atividade hemolítica. Controle positivo (C+); Controle negativo (C-).

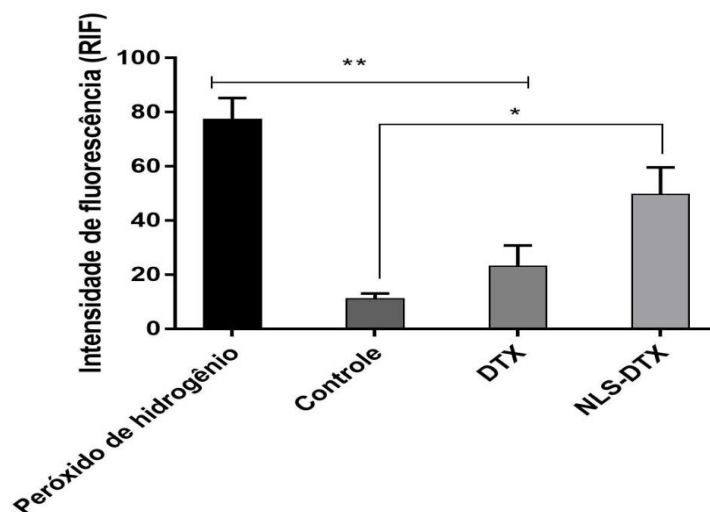
### 6.2.8 Espécies reativas de oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são um tipo específico de moléculas reativas que contém oxigênio, desempenham papéis importantes em vários processos celulares e são essenciais para a proliferação celular em níveis basais. Porém, concentrações altas, podem se tornar citotóxicas, o que geralmente causa necrose ou apoptose celular, o que é frequentemente utilizado para diversas aplicações terapêuticas (MINAI *et al.*, 2013). As EROS podem provocar injúria tecidual (KINNULA *et al.*, 1995) e, em altas concentrações, danificar organelas celulares, ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas (VALKO *et al.*, 2007).

As EROS foram investigadas após 4 horas de exposição aos tratamentos NLS-DTX e DTX. Foi utilizado peróxido de hidrogênio como controle positivo e este foi o que causou maior produção de EROS. No tratamento com NLS-DTX houve aumento

## Resultados e discussão

significativo na produção de EROs quando comparados ao grupo controle (\* $p < 0,05$ ) (Figura 39).



**Figura 39** - Produção de espécies reativas de oxigênio por células 4T1 após os tratamentos com NLS-DTX (nanopartículas lipídicas sólidas contendo docetaxel), DTX (docetaxel), peróxido de hidrogênio (controle positivo) e meio de cultivo (controle) por 4 horas. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ). Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's. Experimento realizado em triplicata.

Estudos recentes mostram que EROs induzidos por quimioterápicos, em células cancerígenas, podem influenciar na morte celular ou na resistência à medicamentos (H.-G. *et al.*, 2015). Tem sido relatado que a produção de EROs pode modular o efeito citotóxico dos taxanos nas células cancerígenas (KOSAKA *et al.*, 2017).



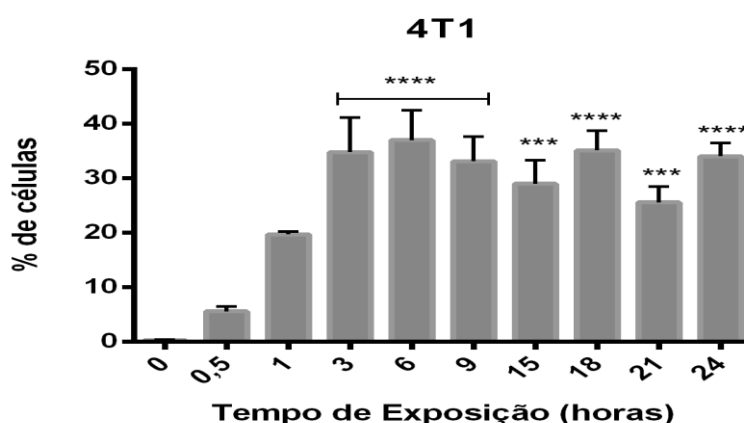
Mizumachi e seus colaboradores (2008), demonstraram que após o tratamento com o DTX em células HEp2 houve produção de EROs e que estes têm papel importante na morte celular, induzida pelo DTX.

## **6.2.9 ESTUDO DE INTERNALIZAÇÃO COM NLS-FTALO**

### **6.2.9.1 Internalização da NLS-FTALO na linhagem 4T1**

As NLS foram associadas ao cloreto de alumínio-ftalocianina que é uma substância que apresenta emissão espectral nas faixas de comprimento de onda 650-850 nm (vermelho visível). Como o fármaco DTX não possui fluorescência foi feita uma formulação com este composto para analisarmos a internalização das partículas. Estas foram obtidas da mesma forma, apenas adicionando ftalocianina ao preparo. A análise foi feita por citometria de fluxo, onde foi possível detectar a fluorescência do composto nas células que o internalizaram ou os que estão em sua superfície. As células foram tratadas com a formulação de NLS-FTALO (30  $\mu$ M de ftalocianina).

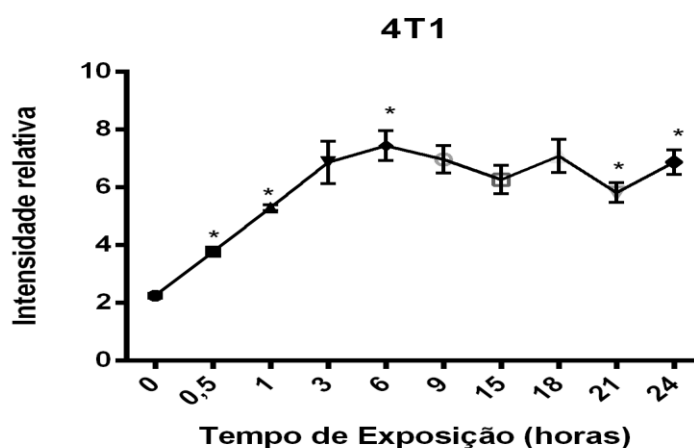
O resultado é o cálculo da porcentagem de células fluorescentes pelo tempo de exposição apresentada em cada evento (10.000 células). Nos tempos de 0,5 e 1 hora não houve diferença significativa na internalização quando comparado ao tempo zero. (Figura 40).



**Figura 40** - Porcentagem de células 4T1 que apresentaram fluorescência após incubação com NLS-FTALO. O tempo de exposição é referente as horas em que as células ficaram expostas ao tratamento com a NLS-FTALO. A análise foi feita por citometria de fluxo (comprimento de onda na faixa de 650-850 nm.) Os dados representam a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes em triplicata. \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ , comparados ao controle não tratado (Tempo 0).

A partir de 3 horas houve um maior percentual de células que internalizaram as NLS. Entre 9 e 15 horas houve um decaimento na quantidade de células que internalizaram ou uma saturação, onde as células podem ter parado de internalizar ou jogam as nanopartículas para fora, mas as 18 e 24 horas observa-se um aumento na internalização novamente. Provavelmente houve um fluxo de entrada e saída, talvez, das mesmas nanopartículas das células.

É possível calcular a média da intensidade relativa de fluorescência captada durante a leitura das amostras e este resultado está expresso na Figura 41, os tempos em que se observa uma maior concentração de nanopartículas internalizadas são 6h, 18h e 24h.

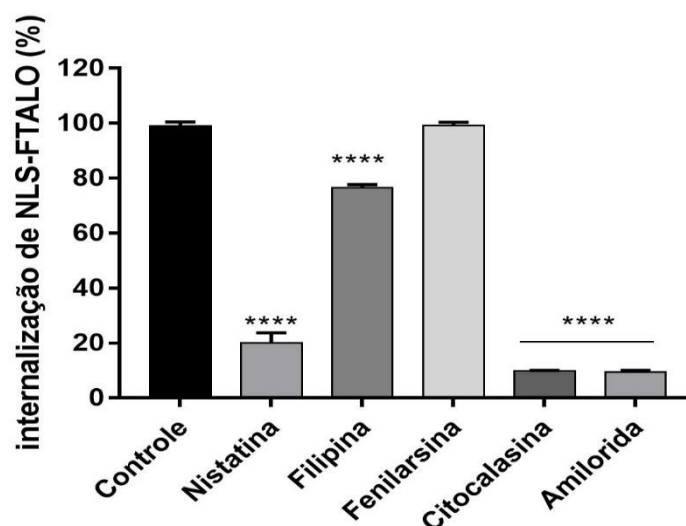


**Figura 41** - Média da intensidade relativa de fluorescência das células 4T1 após internalização da NLS-FTALO. O tempo de exposição é referente as horas em que as células ficaram expostas ao tratamento com a NLS-FTALO. A análise foi feita por citometria de fluxo (comprimento de onda na faixa de 650-850 nm.) Os dados representam a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes em triplicata. \* $p < 0,05$ , comparados ao controle não tratado (Tempo 0).

#### 6.2.9.2 Mecanismo de endocitose

O objetivo deste experimento foi analisar qual a via de endocitose é responsável pela internalização da NLS-FTALO nas células 4T1. Foi utilizado como controle positivo as células expostas a NLS-FTALO sem inibidores e como controle negativo as células que não foram expostas aos inibidores e nem a NLS-FTALO. É relatado na literatura que dependendo da concentração utilizada, os inibidores podem reduzir a viabilidade celular. Por isso, utilizamos as concentrações não tóxicas descritas previamente para células 4T1 por RODRIGUES (2018). Os resultados obtidos estão expostos na Figura 42. Foi observada diferença significativa da quantidade de NLS-FTALO internalizada quando as

células foram expostas ao inibidor nistatina, filipina, amilorida e citocalasina D (\*\*\*\* p <0,0001).



**Figura 42** - Internalização de NLS-FTALO por células 4T1 expostas a diferentes inibidores de endocitose. Células 4T1 expostas a NLS-FTALO por 30 minutos sem inibidores de endocitose foram utilizadas como controle positivo. Foram utilizados os seguintes inibidores: Nistatina, filipina, fenilarsina, citocalasina e amilarida. Experimento realizado em triplicata. ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's, (\*\*\*\* p <0,0001).

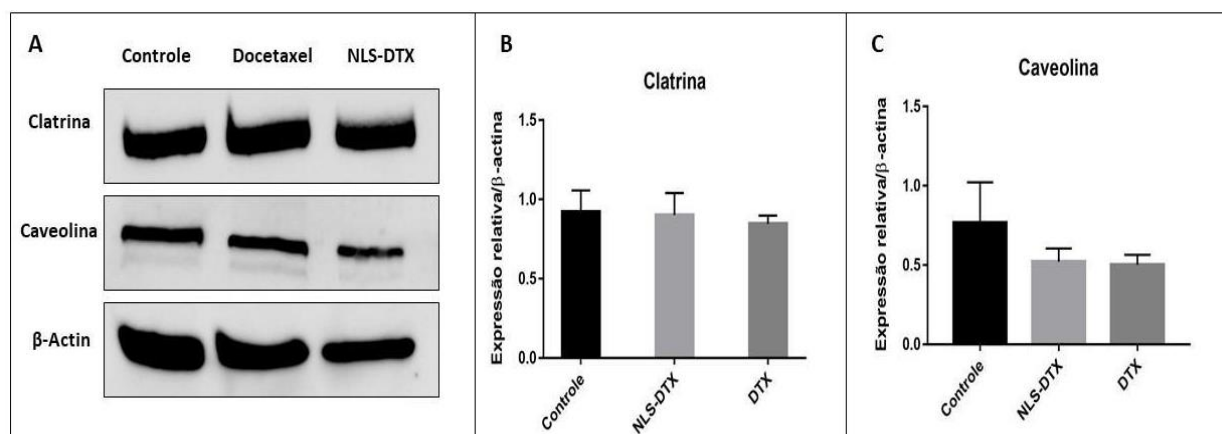
Os nossos resultados indicam que o mecanismo de internalização da NLS ocorreu prioritariamente pelas vias caveolina e macropinocitose. Os inibidores, filipina e nistatina reduziram significativamente, 23,6% e 79,8% respectivamente, a internalização da NLS-FTALO quando comparado ao controle positivo. Estes resultados sugerem que a internalização utilizada pelas células 4T1 pode envolver, a via das caveolinas. A nistatina e a filipina agem por meio da depleção do colesterol existente na membrana da célula que é fundamental para a formação das cavéolas (SANTOS *et al.*, 2014). Há relatos na

literatura de diversos nanomateriais internalizados pela via da caveolina. Essa via tem atraído grande atenção na nanomedicina por ter sido sugerida como via de escape à degradação lisossomal (FERREIRA *et al.*, 2014). Shi *et al.*, (2016), demonstraram que nanopartículas lipídicas sólidas contendo docetaxel (HACC-DTX-NLS) mostraram um aumento na internalização das partículas por endocitose mediada por caveolina.

Houve também inibição da macropinocitose pela amilorida e citocalasina D. A macropinocitose descreve uma forma de internalização de maior escala que frequentemente envolve projeções a partir da membrana que, subsequentemente, se fundem com a própria membrana plasmática. Este processo resulta na captação de fluidos e componentes extracelulares contidos no interior dessas projeções membranares que irão formar os macropinosomos que podem variar de 0,2 a 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro (SWANSON & WATTS, 1995). Esta é descrita como uma das principais vias para a internalização de nanopartículas. Vesículas foram observadas nos nossos resultados de microscopia eletrônica de transmissão, podendo ser de macropinocitose (Figura 44).

Também, a fim de compreender a via de endocitose envolvida na internalização das NLS-DTX, foram verificados por western blotting os níveis de expressão de clatrina e caveolina. Estas duas proteínas estão envolvidas em vias importantes de endocitose. Nos nossos resultados, pode-se observar que não houve diferença estatística entre o controle e as células tratadas em ambas as proteínas (Figura 43). O mesmo foi observado por CHAVES, *et al.*, (2017), quando comparou a expressão de clatrina e caveolina por western blotting após tratar células MCF-7, MDA-MB-231 e HNTMC com nanopartículas de maghemita associadas ao Citrato de Ródio II. Foi observada diferença da expressão das proteínas apenas quando comparado entre as células tumorais (MDA-MB-231 e MCF-7) e a célula controle (HNTMC).

Logo, estes resultados sugerem que as NLS-DTX não alteram a expressão das proteínas clatrina e caveolina.



**Figura 43** - Expressão relativa das proteínas clatrina e caveolina. (A) A expressão das proteínas foi avaliada por western blotting em células 4T1 após tratamento com as NLS-DTX e DTX por 4 horas. (B – C) os gráficos representam a expressão relativa normalizadas com base na expressão de  $\beta$ -actina (controle). Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

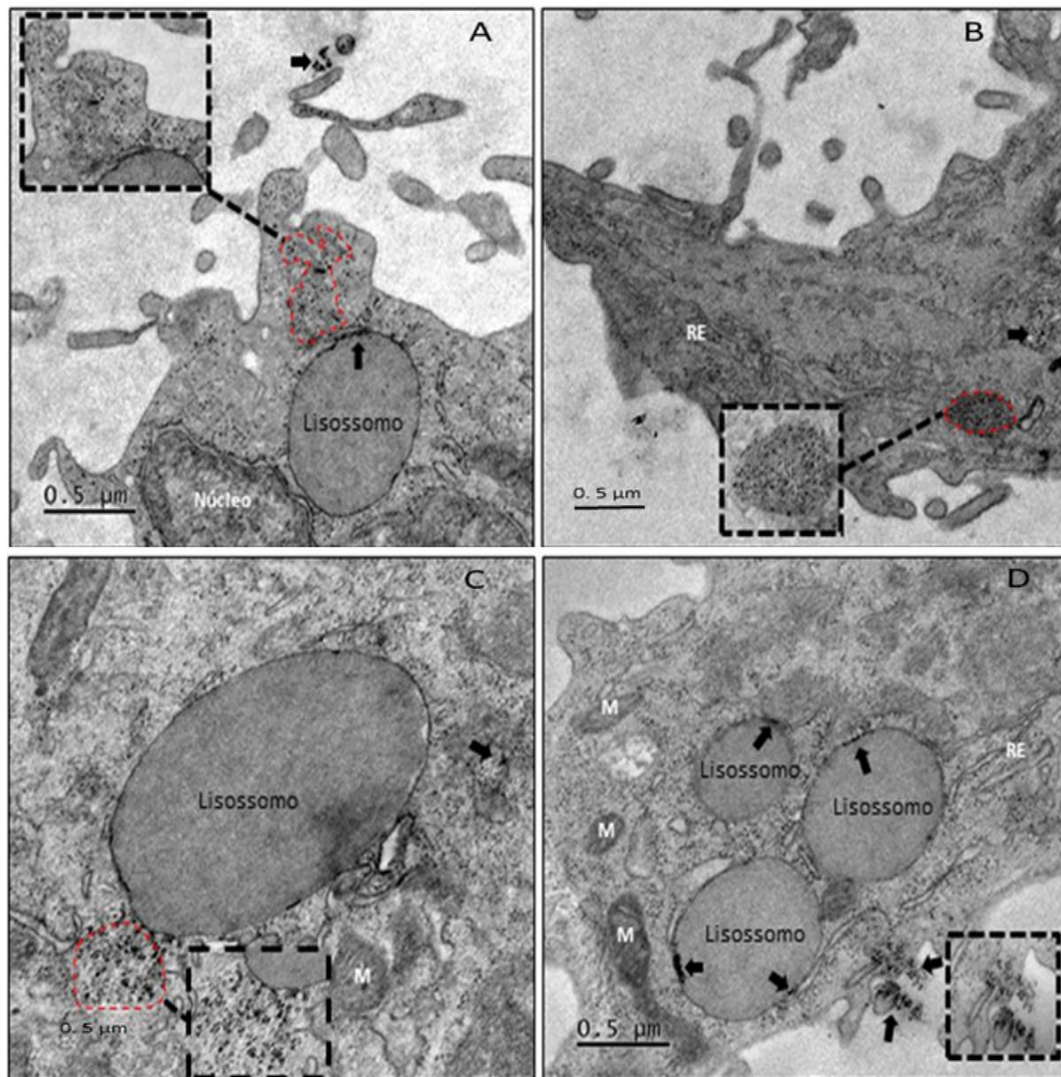
## 6.2.10 ESTUDO DE INTERNALIZAÇÃO COM NLS-DTX

### 6.2.10.1 Internalização de NLS-DTX por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A Microscopia Eletrônica de Transmissão foi utilizada para verificar as características da ultraestrutura celular e a internalização das NLS-DTX em células 4T1. Nanocarreadores à base de lipídios, como as NLS, têm sido amplamente utilizados como

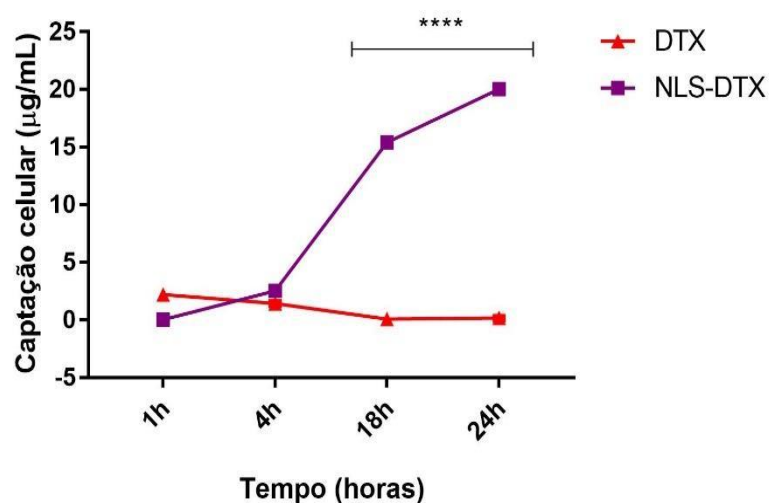
carreadores para aumentar a eficácia de quimioterápicos (WU *et al.*, 2018). Estudos anteriores demonstraram a internalização de nanopartículas lipídicas por endocitose em vários tipos de células (CHANG *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2018). Consistente com o mecanismo de internalização, identificados neste trabalho. As nanopartículas endocitadas foram acumuladas principalmente dentro de lisossomos e/ou endossomos no citosol da célula (Figura 44). Algumas das nanopartículas parecem ser digeridas dentro das vesículas. Observa-se que as nanopartículas estão dispostas em aglomerados e partículas individuais ainda podem ser reconhecidas (Figura 44). O núcleo pode ser identificado e as imagens indicam consistentemente que NLS-DTX não estava presente no núcleo.

Para avaliar a eficiência de internalização nas células 4T1, o acúmulo intracelular de DTX foi quantificado pelo método CLAE. A captação celular foi realizada com NLS-DTX em comparação ao DTX livre. Os resultados mostraram que a captação do DTX proveniente das NLS-DTX pela célula foi significativamente maior nos períodos de 4h, 18h e 24h do que o DTX livre. A captação de DTX nos nossos resultados mostrou ser tempo dependente, nas células tratadas com NLS-DTX. As células tratadas com DTX livre têm acúmulo mantido por até 4 horas e, então, a concentração de DTX reduz (Figura 45). MOSALLAEI e colaboradores (2013), mostraram que a captação de Taxotere (TXT) (nome comercial do docetaxel) encapsulados em nanopartículas lipídicas sólidas por células C-26 é maior quando comparado ao TXT livre. Esses achados sugerem que o uso de NLS-DTX pode permitir a diminuição da dose de DTX sem perda do efeito terapêutico, reduzindo assim os efeitos adversos.



**Figura 44** - Ultraestrutura de células 4T1 tratadas com 10 μg/mL de NLS-DTX por 24 horas. (A-C) NLS-DTX internalizada (linha tracejada); (C) aglomerado de NLS-DTX no citoplasma (linha tracejada); (D) internalização de NLS-DTX em lisossomos (setas). Linhas tracejadas, setas (em lisossomos) e setas indicam nanopartículas. RE: Retículo endoplasmático; M: Mitocôndria. Ampliação: 5.000x; 15.000x (linhas tracejadas pretas).





**Figura 45** - Estudos de captação celular *in vitro* de DTX em células 4T1. As células foram expostas a NLS-DTX ou DTX a 100 µg/mL por 1h, 4h, 18h e 24h. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

### 6.3 Testes *in vivo*

Após as avaliações *in vitro*, a eficácia antitumoral das NLS-DTX foi avaliada em modelo murino Balb/C.

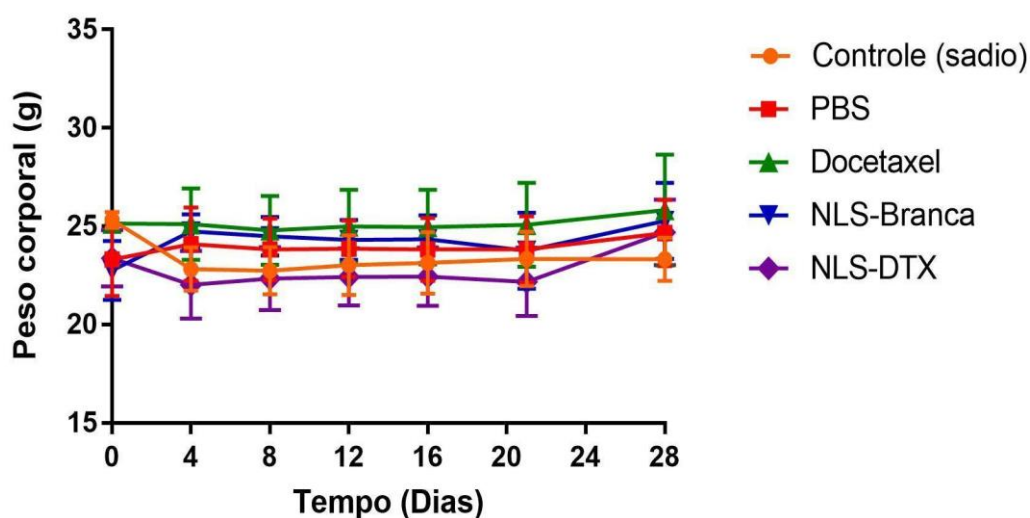
Experimentos com animais são importantes, pois contribuem para o desenvolvimento da ciência possibilitando a descoberta de medidas profiláticas, ajudando a elucidar questões sobre o desenvolvimento de tumores e o mecanismo de ação dos compostos utilizados. Os camundongos são um dos mais importantes animais experimentais, pois seu ciclo de vida é curto e possuem semelhanças fisiológicas com o ser humano (BRANCO & SILVEIRA, 2011). Camundongos da linhagem Balb/C /c são utilizados pela facilidade na administração de fármacos e na coleta de sangue (CHORILLI *et al.*, 2007).

As células da linhagem 4T1 foram escolhidas uma vez que são facilmente transplantáveis e por ser um dos modelos experimentais capazes de desenvolver metástases nos locais afetados pelo câncer de mama em humanos e por permitirem a comparação entre os estudos *in vivo* e *in vitro* (PULASKI & OSTRAND-ROSENBERG 2001).

Neste estudo, o modelo utilizado gerou tumor em 100% dos animais. A ocorrência de tumor foi evidenciada na região do inóculo das células 4T1 (flanco esquerdo dos camundongos), quatorze dias após o inóculo das células, já era possível observar visualmente a massa tumoral. Durante o tratamento dos camundongos com NLS-DTX e DTX foram realizadas cinco aplicações dos tratamentos por via intraperitoneal a cada dois dias. Não foram observadas alterações comportamentais e clínicas como diarreia, queda de pelos e atividade motora reduzida ao longo de todo o experimento, em todos os grupos estudados.

### **6.3.1 Peso corpóreo**

O acompanhamento da massa corporal do animal é um importante indicador de avaliação da toxicidade do tratamento utilizado (COSTA *et al.*, 2012). O peso dos animais foi registrado antes do dia de transplante de células tumorais, durante os tratamentos e no dia da eutanásia. Antes de dar início ao tratamento (dia 0), o peso dos animais era, em média,  $23 \pm 2,04$  g. Ao final do tratamento o peso dos animais se manteve. Não foram constatadas mudanças significativas no peso corpóreo dos animais ao longo dos tratamentos, mostrando que não houve influência dos mesmos no crescimento dos camundongos (Figura 46).



**Figura 46** - Peso corporal dos animais ao longo do experimento (28 dias). Os animais foram pesados antes do implante de células tumorais (dia 0), no decorrer dos tratamentos, e no dia da eutanásia. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Foram usados 6 animais por grupo. Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's.

### 6.3.2 Análise hematológica e bioquímica

Foram avaliados os perfis hematológicos e bioquímicos dos animais (Tabela 6). A toxicidade associada a terapias contra o câncer, podem resultar em um diagnóstico de anemia, risco de infecções, baixa contagem de leucócitos, entre outros (DJAZAYERI *et al.*, 2005). Neste estudo, não houve diferença estatística, nos parâmetros hematológicos. Houve um aumento dos leucócitos em animais do grupo PBS, e este aumento provavelmente foi em decorrência da existência do tumor ou por processos inflamatórios por conta da doença, mas este aumento não resultou em diferença estatisticamente significativa.

O aumento dos níveis plasmáticos de creatinina é um indicativo de sobrecarga renal, nefrotoxicidade e insuficiência renal aguda. O aumento da creatinina ocorre quando se faz uso de um composto que pode causar toxicidade renal, comprometendo a eficiência da filtração glomerular e a redução da excreção urinária da creatinina, causando aumento de creatinina no sangue (STEVEN & SCOTT, 2002). Neste estudo, os níveis de creatinina se mantiveram normais. Dessa forma pode-se sugerir que os tratamentos não causaram sobrecarga renal.

A enzima transaminase pirúvica é um indicador de lesão nas células hepáticas provocadas por drogas tóxicas ou por infecções (HARPER *et al.*, 1981). As transaminases podem ser encontradas nos tecidos, e no caso da transaminase pirúvica encontra-se predominantemente no fígado, coração e rim. Esta é considerada como um indicador de dano hepatocelular (AL-HABORI *et al.*, 2002). Alguns processos patológicos envolvendo o fígado podem causar aumento nas enzimas hepáticas e essas mudanças podem ser induzidas por agentes químicos, como fármacos (COSTA *et al.*, 2012). Neste estudo os resultados sugerem que os tratamentos utilizados podem não ser hepatotóxicos, uma vez que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Também não houve diferenças nos níveis de ureia neste estudo.

**Tabela 6** -- Parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos Balb/C fêmeas

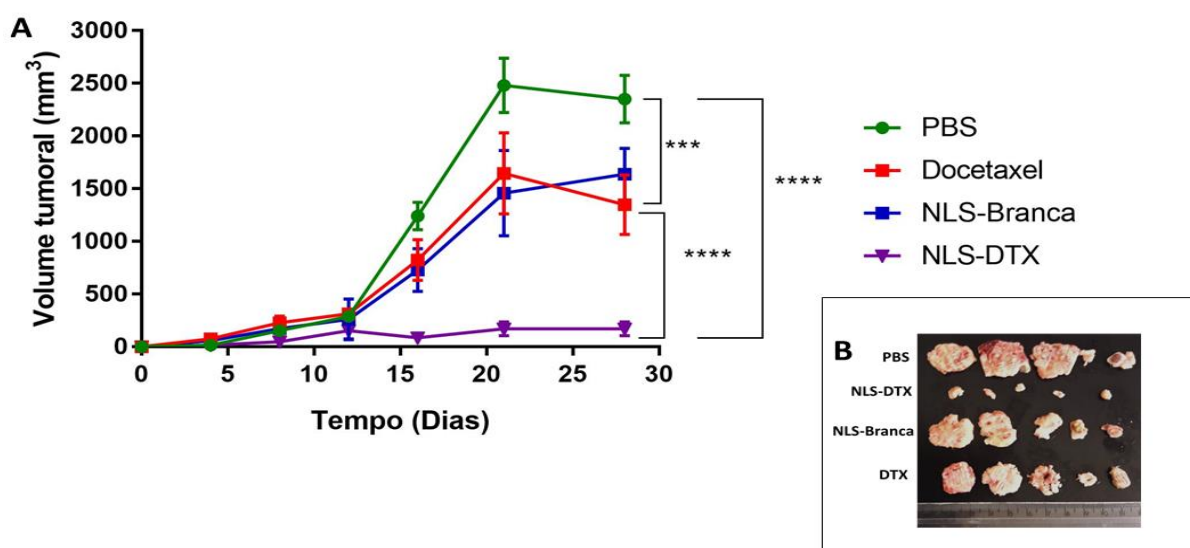
Parâmetros	Sadio	PBS	NLS-Branca	Docetaxel	NLS-DTX
RBC mm <sup>3</sup>	6.6±2.5	7,1±1.9	6,5±1.6	6,5±2.7	6,6±2.2
HGB g/dL	9.9±3.6	10,9±2.9	10,0±2.3	9,4±4.0	10,1±3.2
HCT (%)	24.2±9.2	26,6±7.3	24,2±6.1	24,3±10.4	24,8±8.5
VCM (fL)	36.9±0.4	37,7±0.5	37,4±0.2	37,6±0.2	37,4±0.5
HCM (pg)	15.2±0.5	15,5±0.6	15,6±0.8	14,6±0.3	15,2±0.1
CHCM (g/dL)	41.3±1.2	41,0±1.7	41,7±2.1	38,7±1	40,7±0.5
Leucócitos (x10 <sup>3</sup> µL)	38.6±2.5	50,5±10	44,9±37.6	44,4±14.9	49,5±3.4
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> µL)	237,8±203	272,7±216	234,8±179	281,6±218	231,7±284
ALT (U/I)	24±0.8	26.6±1.2	21±7	29.9±0.1	26.5±2.9
Creatinina (mg/dL)	0.3±0.3	0.6±0.2	0.4±0.1	0.5±0.2	0.2±0.2
Ureia (mg/dL)	41±3.2	48.7±5.2	43±0.2	42.7±5.2	49.3±2.4

**Legenda:** RBC: Glóbulos vermelhos; HGB Hemoglobinas; HCT Hematocrito; VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média, CHCM:,concentração média de hemoglobina corpuscular, ALT: transaminase pirúvica. Os valores são representados como média ± erro padrão.

### 6.3.3 Estudo da eficácia antitumoral das NLS-DTX

A eficiência terapêutica *in vivo* da NLS-DTX e DTX livre foi estudada em camundongos Balb /C portadores de tumor tratados com 10 mg/kg de DTX ou NLS-DTX em um total de cinco doses. A dose selecionada para ser usada neste trabalho teve base em trabalhos anteriores encontrados na literatura (ZENG *et al.*, 2013; KANG *et al.*, 2016). O tratamento com as NLS-DTX *in vivo* mostrou ser eficiente. Em consonância com os dados encontrados nos ensaios de citotoxicidade *in vitro*, observou-se no grupo tratado com NLS-DTX, *in vivo*, uma menor taxa de crescimento tumoral (Figura 47 A). A figura 47 B mostra a foto dos tumores retirados dos camundongos e a diferença visual do tamanho dos tumores. Os resultados do crescimento do volume tumoral mostraram que os tumores de camundongos dos grupos PBS, DTX e NLS-Branca cresceram rapidamente. O tratamento com docetaxel inibiu o crescimento do tumor cerca de 42,7% e da NLS-DTX em 92,7% no final do estudo, o que foi significativamente menor quando

comparado com o grupo PBS. Os nossos resultados corroboram com os achados na literatura. LIU e colaboradores (2011), mostraram a regressão tumoral de camundongos tratados com 10 mg/kg de docetaxel encapsulado em nanocarreador lipídico (NLC) sendo mais eficaz que a mesma dose em camundongos tratados com DTX livre.



**Figura 47** – (A) Efeito dos tratamentos sobre o volume do tumor 4T1 de camundongos tratado com DTX, NLS-DTX, NLS-Branca e grupo PBS (controle com tumor). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Foram usados 6 animais por grupo. \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  versus todos os outros tratamentos. Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's. (B) Foto dos tumores retirados dos camundongos.

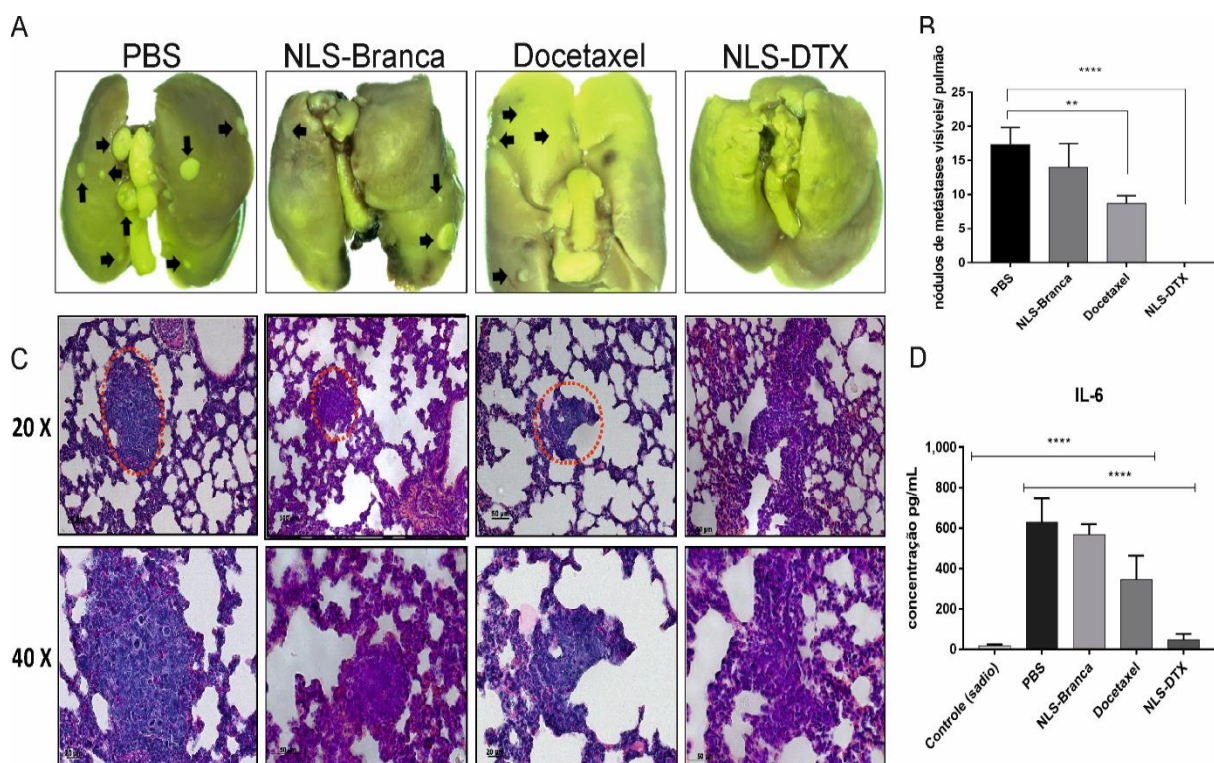
#### 6.3.4 Prevenção de metástases pulmonares e nível sérico de IL-6 em câncer de mama

A avaliação pré-clínica dos animais após a eutanásia revelou que os grupos com tumores, exceto o tratado com NLS-DTX, corresponderam a múltiplos nódulos metastáticos no pulmão (Figura 48). A metástase espontânea geralmente ocorre nos

estágios finais do câncer, e a metástase do câncer de mama 4T1 ocorre principalmente nos pulmões, compartilhando muitas características com o câncer de mama humano (LIANG *et al.*, 2017). Nos grupos PBS e NLS-Branca, foi possível visualizar muitos nódulos metastáticos nos pulmões (Figura 48 A). Após o tratamento com DTX, houve uma redução no número de nódulos metastáticos. Por outro lado, não foi possível observar nódulos de metástase, visivelmente, no grupo NLS-DTX, podendo sugerir que as NLS-DTX poderiam prevenir significativamente a metástase do câncer de mama no pulmão (Figura 48 B). A metástase foi ainda confirmada por histologia do pulmão. Como mostrado na Figura 48 C, muitos *loci* de metástases tumorais (círculo pontilhado vermelho) foram observados nos pulmões dos grupos PBS e NLS-Branca e um número moderado nos pulmões do grupo DTX, enquanto não foram observados nódulos de metástase nos pulmões do grupo NLS-DTX. Esses resultados sugerem que as NLS-DTX têm maior capacidade de inibir a metástase tumoral nos pulmões do que o docetaxel livre. A proliferação desregulada de células está correlacionada com a progressão do tumor, a evasão da resposta imune e o potencial metastático. Essas alterações estão associadas à alteração na produção de citocinas (SALGADO *et al.*, 2003). A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina que atua na regulação de tumores pró-inflamatórios e metastáticos e os altos níveis circulantes de IL-6 estão associados ao desenvolvimento, progressão e metástase do câncer. Além disso, um estudo anterior relatou que camundongos portadores de tumor de mama que expressam altos níveis de IL-6 apresentaram metástase espontânea de pulmão e fígado (OH *et al.*, 2013). Assim, avaliamos os níveis séricos de IL-6 em camundongos após o tratamento. Em nossos resultados, os níveis de IL-6 foram significativamente maiores nos grupos com presença de metástase nos pulmões (como mostrado nos resultados de H&E de metástase pulmonar), que são PBS, NLS-Branca e

## Resultados e discussão

DTX ( $628 \pm 3,4$ ;  $568 \pm 1,7$ ;  $345 \pm 6,6$  pg/ml; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ) quando comparados com o grupo controle saudável. Não houve diferença significativa entre o grupo controle saudável e o grupo tratado com NLS-DTX (Figura 48 D). Esses achados confirmam o importante papel dos níveis de IL-6 na invasão e metástase do câncer de mama. Em estudos realizados por SALGADO e colaboradores (2003), os níveis séricos elevados de IL-6 mostraram associação com menor taxa de sobrevivida em pacientes com câncer de mama avançado e, mostrou que em estágios avançados, altos níveis podem estimular o crescimento do tumor.



**Figura 48 - (A)** Foto dos pulmões fixados com Bouin evidenciando nódulos de metástase pulmonar. **(B)** Análise estatística do número de nódulos de metástase macroscópica nos pulmões. **(C)** Histologia dos pulmões. **(D)** Níveis séricos de IL-6 analisado por ELISA. A metástase pulmonar (círculo tracejado vermelho e setas pretas). Os dados representam valores médios  $\pm$  desvio padrão (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).



### **6.3.5 Análise imunohistoquímica de Bcl-2 e Ki-67**

É importante a identificação de marcadores que possam elucidar o comportamento do tumor e, especialmente em câncer de mama devido, à variabilidade na progressão clínica da doença (BAE *et al.*, 2013). A imunohistoquímica foi utilizada para verificar se os tratamentos utilizados causam alguma diferença na expressão das proteínas BCL-2 e Ki-67 nos grupos experimentais.

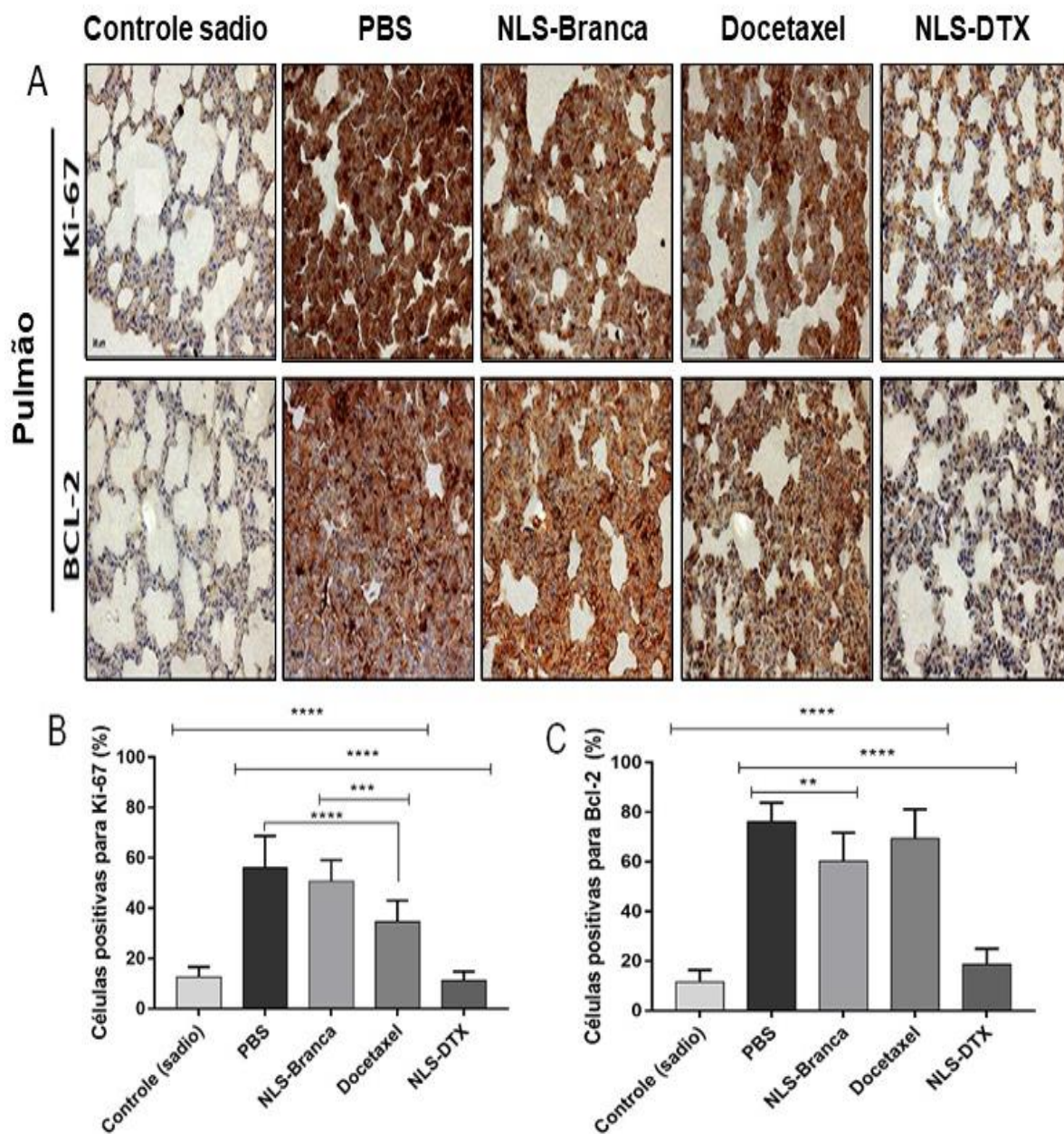
O Bcl-2, nas células tumorais, é um proto-oncogene relacionado à morte celular/apoptose programada. Estudos demonstraram que a superexpressão da proteína Bcl-2 aumenta a invasão e a migração no câncer de mama (DEL *et al.*, 1997; LI & WANG, 2006). Nesse contexto, com base nos resultados encontrados em relação à prevenção de metástases pelo tratamento com NLS-DTX, investigamos a expressão de Bcl-2 em pulmões e tecidos tumorais por imunohistoquímica (Figura 49). Foi observada forte marcação para Bcl-2 em grupos previamente identificados com metástase pulmonar, ou seja, os grupos PBS, NLS-Branca e DTX, quando comparados ao grupo NLS-DTX, que apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Figura 49 C; F) ( $p^{****}<0,0001$ ).

Também analisamos a expressão de Ki-67 para examinar a proliferação celular nos tumores e pulmões após tratamentos (Figuras 49 e 50). A análise revelou altos índices positivos dos grupos PBS, NLS-Branca e DTX. O tratamento NLS-DTX induz níveis

## *Resultados e discussão*

---

significativamente mais baixos (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ) de proliferação celular em comparação com o grupo PBS. Portanto, esses resultados sugerem que o tratamento com NLS-DTX induziu a redução da proliferação celular e isso está diretamente associado à redução do crescimento tumoral, como observado anteriormente nos resultados de eficácia.



**Figura 49** - Análise imunohistoquímica do pulmão. As células marcadas em marrom representam células positivas. (A) Imunohistoquímica do pulmão marcadas com Ki-67 e Bcl-2. (C) Quantificação da coloração com Ki-67 e (D) Bcl-2. Os dados representam valores médios  $\pm$  erro padrão (\*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001).

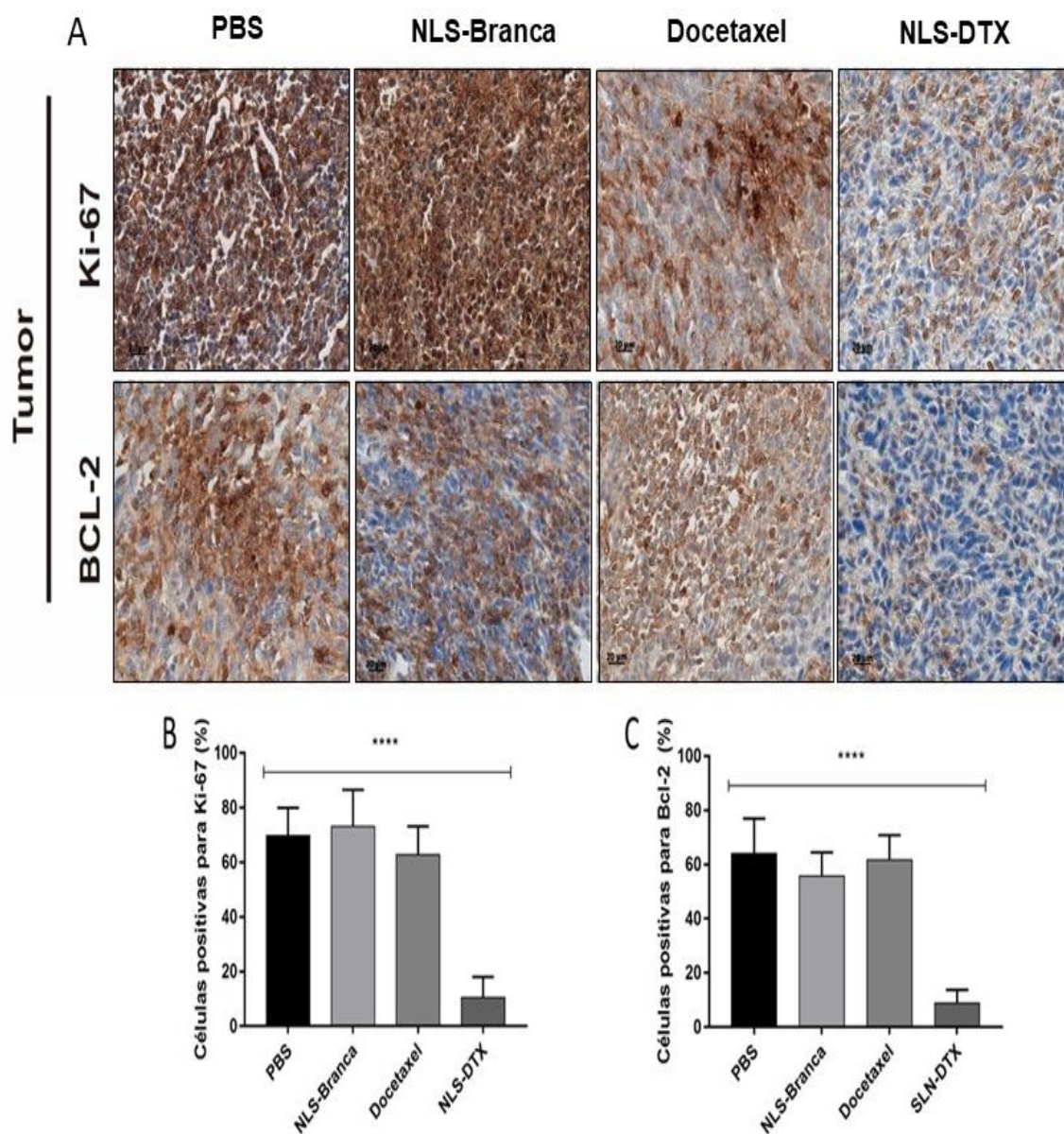
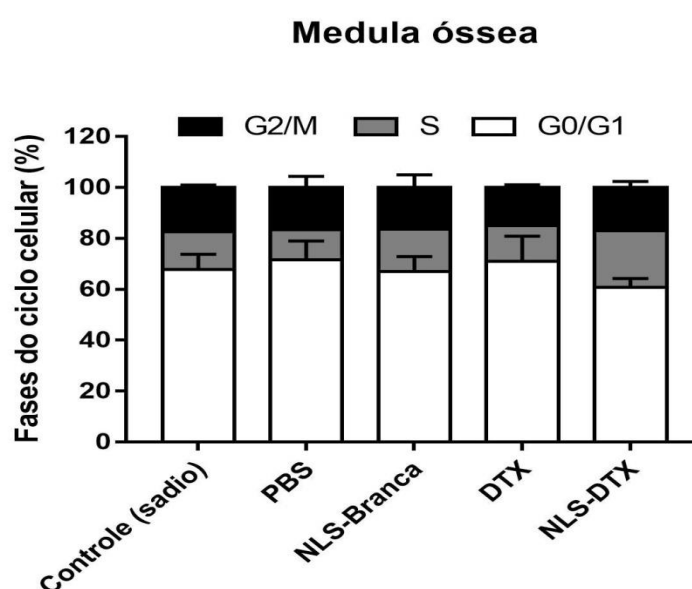


Figura 50 - Análise imunohistoquímica do tumor. As células marcadas em marrom representam células positivas. (A) Imunohistoquímica do tumor marcadas com Ki-67 e Bcl-2. (C) Quantificação da coloração com Ki-67 e (D) Bcl-2. Os dados representam valores médios  $\pm$  erro padrão (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

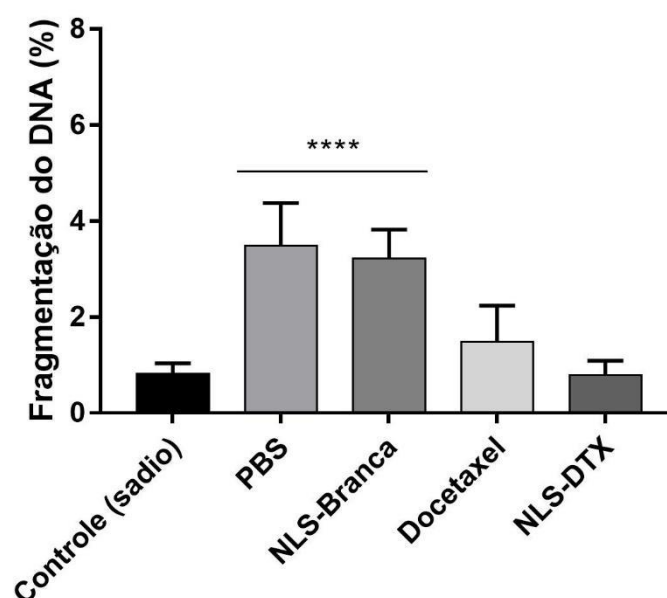
### 6.3.6 Análise do ciclo celular e fragmentação de DNA de células da medula óssea

Ao final dos tratamentos, foram avaliados o perfil de distribuição das células da medula óssea nas fases do ciclo celular e a fragmentação do DNA, para investigar o potencial genotóxico dos tratamentos utilizados. Na análise do ciclo celular não foram observadas diferenças significativas, entre os grupos experimentais, os animais que receberam os tratamentos não tiveram alterações no ciclo celular das células da medula óssea (Figura 51). Quimioterápicos interagem com o material genético das células causando danos, principalmente nas células em proliferação celular, sejam estas tumorais ou normais, incluindo também, as células da medula óssea (ESTEVANATO, 2012). Quando se avalia compostos como os quimioterápicos, é importante considerar a mielotoxicidade provocada por eles, já que as células da medula óssea apresentam altos índices mitóticos, estando então suscetíveis a compostos capazes de se ligar ao DNA.



**Figura 51** - Efeito dos tratamentos no ciclo de células da medula óssea de camundongos. A análise foi feita por meio de citômetro de fluxo e marcação com iodeto de propídio (PI). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n = 6).

Quanto à fragmentação do DNA nas células de medula óssea dos camundongos, os percentuais apresentados pelo grupo NLS-DTX foram baixos, próximos aos do grupo controle sadio. Foram observadas diferenças significativas (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ) nos grupos NLS-Branca e PBS quando comparados ao grupo controle sadio. Este aumento da fragmentação de DNA observado nos grupos dos animais portadores de tumor e que não receberam tratamento (PBS e NLS-Branca), pode ser devido ao aumento de radicais livres durante a progressão da doença que implica em uma indução maior de estímulos da medula óssea que tenta manter a homeostase do corpo (Figura 52). Normalmente, as células são expostas a agentes oxidantes, radicais livres de todos os tipos, logo, é normal que as células sofram fragmentação de DNA. Porém, mecanismos de reparo estão envolvidos neste processo, para manter a homeostase constantemente (TONINI, 2008).



**Figura 52** - Efeito dos tratamentos sobre a fragmentação do DNA em células da medula óssea de camundongos. A análise foi feita por meio de citômetro de fluxo e marcação com iodeto de propídio (PI). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ) (n = 6).

Os grupos que receberam tratamento (DTX e NLS-DTX) não apresentaram níveis elevados de fragmentação de DNA (Figura 52). Isso ocorre provavelmente porque as células da medula óssea são afetadas somente por radicais livres circulantes, quando estes estão com nível muito aumentado pela presença de uma patologia, como, por exemplo, o câncer de mama. Por isso, os animais que receberam tratamento provavelmente foram capazes de manter um equilíbrio entre os radicais livres e o sistema de reparo antioxidante.

### **6.3.7 Biodistribuição de NLS-DTX e DTX pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência.**

A biodistribuição foi realizada em camundongos portadores de tumor 4T1. Os animais receberam uma única dose de 10 mg/kg de docetaxel nos grupos DTX e NLS-DTX nos tempos de 6 horas e 24 horas. A concentração de docetaxel encontrada foi normalizada pelo peso dos órgãos (Figura 53). Não foram observados picos de interferências nas matrizes biológicas no tempo de retenção do docetaxel. Ao comparar os resultados, foi possível observar diferença significativa somente no baço nos tempos de 6 e 24 horas para o grupo DTX e para NLS-DTX 6 horas. Quase não foi detectado docetaxel no tumor e no sangue.

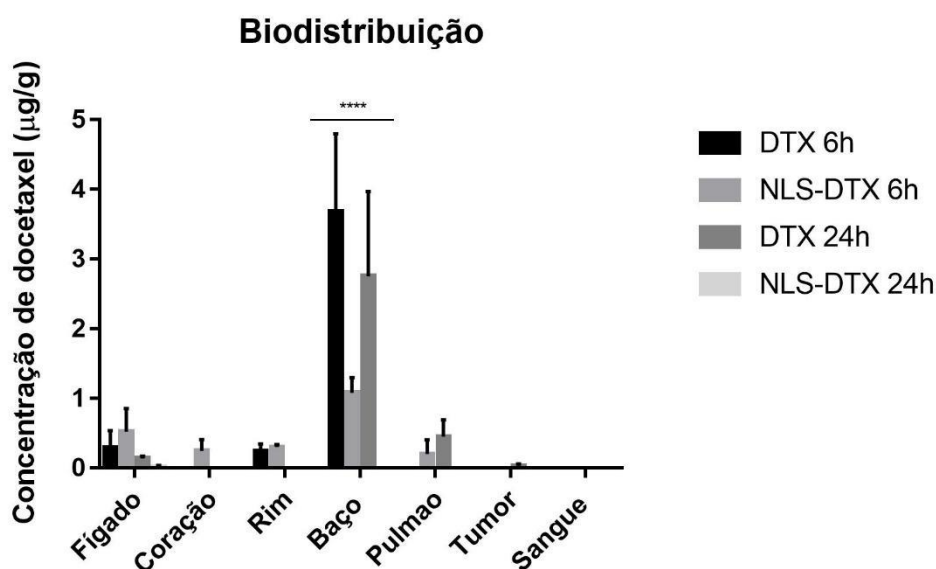
Nanopartículas podem circular no sangue por um certo tempo e, então, podem ser reconhecidas como matéria estranha e ser eliminadas rapidamente por células fagocíticas que são abundantes em órgãos, especialmente, como baço, fígado e pulmão (GAO *et al.*, 2011).

A dose total identificada nos órgãos analisados representou uma porcentagem muito baixa da dose inicialmente administrada. Desta forma, apesar da propriedade

## Resultados e discussão

analiticamente quantitativa da cromatografia líquida, a baixa recuperação da dose pode ser devido à distribuição do docetaxel para órgãos não analisados ou devido à baixa recuperação na extração, apesar do método ter sido validado previamente e apresentado recuperação adequada quando validado para cromatografia líquida de alta eficiência. Provavelmente, se estudarmos tempos menores do que os utilizados neste ensaio de biodistribuição pode-se conseguir uma melhor recuperação do DTX nos órgãos.

WANG e colaboradores (2011) observaram uma alta concentração de docetaxel principalmente no baço. Entretanto, também observaram concentrações significativas nos outros órgãos e no tumor. Provavelmente, esta diferença nos resultados encontrados neste trabalho foi a alta dose utilizada (60 mg/kg) e tempos menores (0.083 h até 8 horas). NAGUIBI e colaboradores (2014), também encontraram altas concentrações de docetaxel no tumor após 2 horas e houve uma diminuição após 12 horas.



**Figura 53** - Biodistribuição de docetaxel após administração de NLS-DTX e DTX livre em órgãos de camundongos Balb/C portadores de tumor 4T1 (n=5), nos tempos de 6h e 24h, detectados por CLAE (p\*\*\*\*<0,0001).



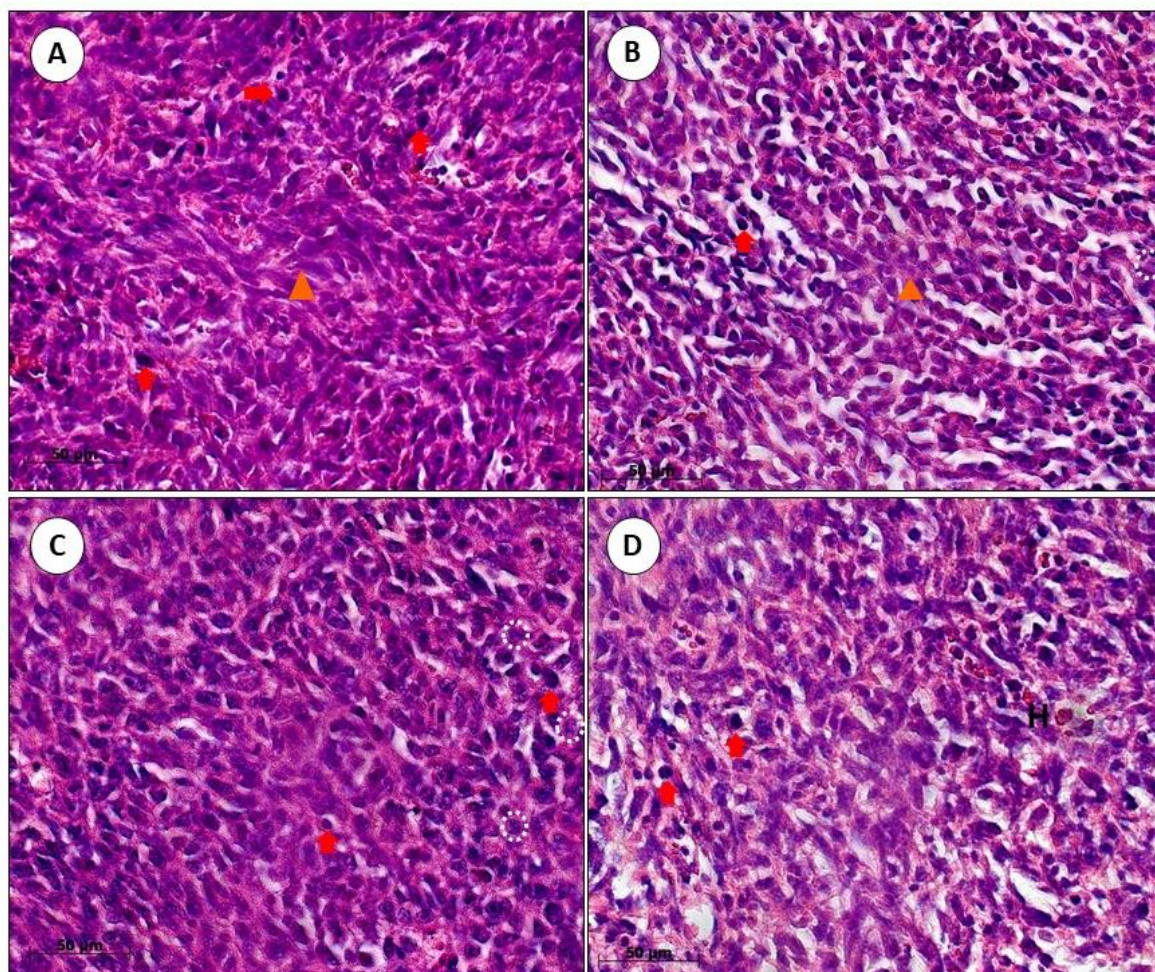
### **6.3.8 Histologia**

#### **6.3.8.1 Análise histológica do tumor**

A análise do tumor por histologia permitiu afirmar que todos os animais apresentaram implante tumoral adequado com células 4T1.

De modo geral, observou-se característica tumoral maligna com células pouco diferenciadas, pleomórficas e tecido desorganizado. Foram observadas células com figuras mitóticas e presença de infiltrado inflamatório. Também foram observadas células que apresentam alterações nucleares típicas de necrose como picnose, que são núcleos com a cromatina extremamente condensada e que conseqüentemente reduz o tamanho nuclear, cariorrexe que é a fragmentação do núcleo em segmentos que se dispersam pelo citoplasma e cariólise que é a digestão da cromatina resultando em núcleos pouco pigmentados. O aumento das figuras mitóticas deve-se a elevada proliferação tumoral (Figura 54).

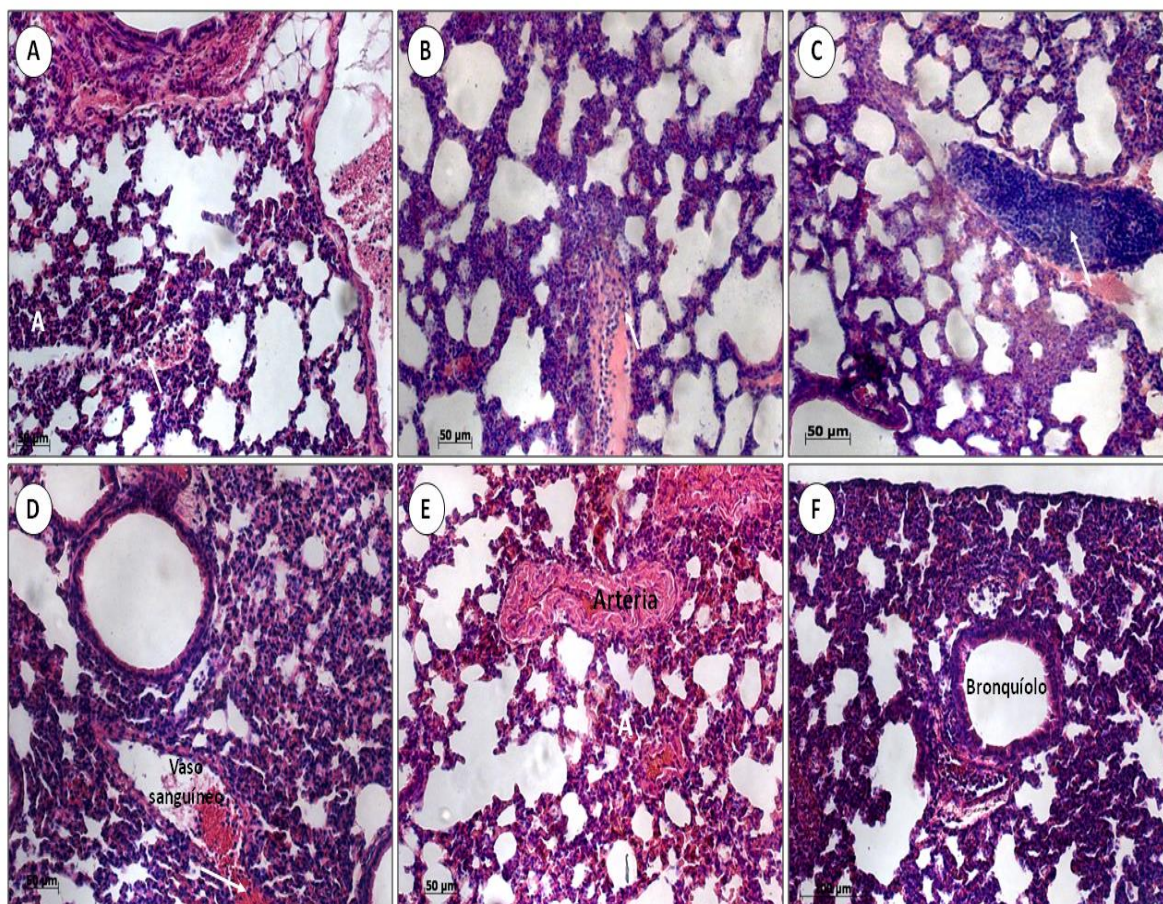
A morte celular por apoptose é desencadeada por excesso ou falta de estímulos de crescimento, proliferação e dano celular. A célula em apoptose tem característica como o tamanho celular reduzido, cromatina condensada e fragmentação do DNA que leva ao aparecimento de núcleos picnóticos, dilatação de organelas citoplasmáticas e formação de vacúolos autofágicos (BOZETO, 2011).



**Figura 54** - Fotomicrografias da histologia de carcinoma mamário de camundongos fêmeas Balb/C. Tratados com: (A) DTX); (B) NLS-Branca; (C) NLS-DTX e (D) PBS. Núcleo picnótico (seta vermelha), Cariorrexe (círculo tracejado), Cariólise (cabeça de seta). Os animais foram tratados com 10 mg/kg de DTX. Coloração H&E, (40x).

### **6.3.8.2 Análise histológica do pulmão**

A análise do pulmão mostrou preservação dos tecidos sem diferenças na estrutura dos alvéolos. É possível verificar estruturas como bronquíolos, saco alveolar e vasos sanguíneos (Figura 55). A presença de infiltrado inflamatório foi observada, no grupo NLS-Branca, próxima aos brônquios, bronquíolos e na parede dos vasos. Estes processos inflamatórios podem estar associados à presença do tumor. Portanto não é possível afirmar que os processos inflamatórios têm relação ou não com a presença das nanopartículas. Além disso, a presença de infiltrado inflamatório é um achado comum no tecido pulmonar, devido ao alto contato entre o parênquima pulmonar e o meio externo, que são recrutados para atacar e eliminar corpos estranhos do organismo que venham tentar entrar pelas vias respiratórias (KUEHNEL & WOLFGANG, 2019).



**Figura 55** - Fotomicrografias da histologia do pulmão de camundongos fêmeas Balb/C. (A) Grupo controle sadio. Grupos tratados com: (B) DTX; (C-D) NLS-Branca; (E) NLS-DTX e (F) PBS. Infiltrado inflamatório (seta branca). Os animais foram tratados com 10 mg/kg de DTX. Sigla A: Alvéolos. Coloração H&E, (20x).

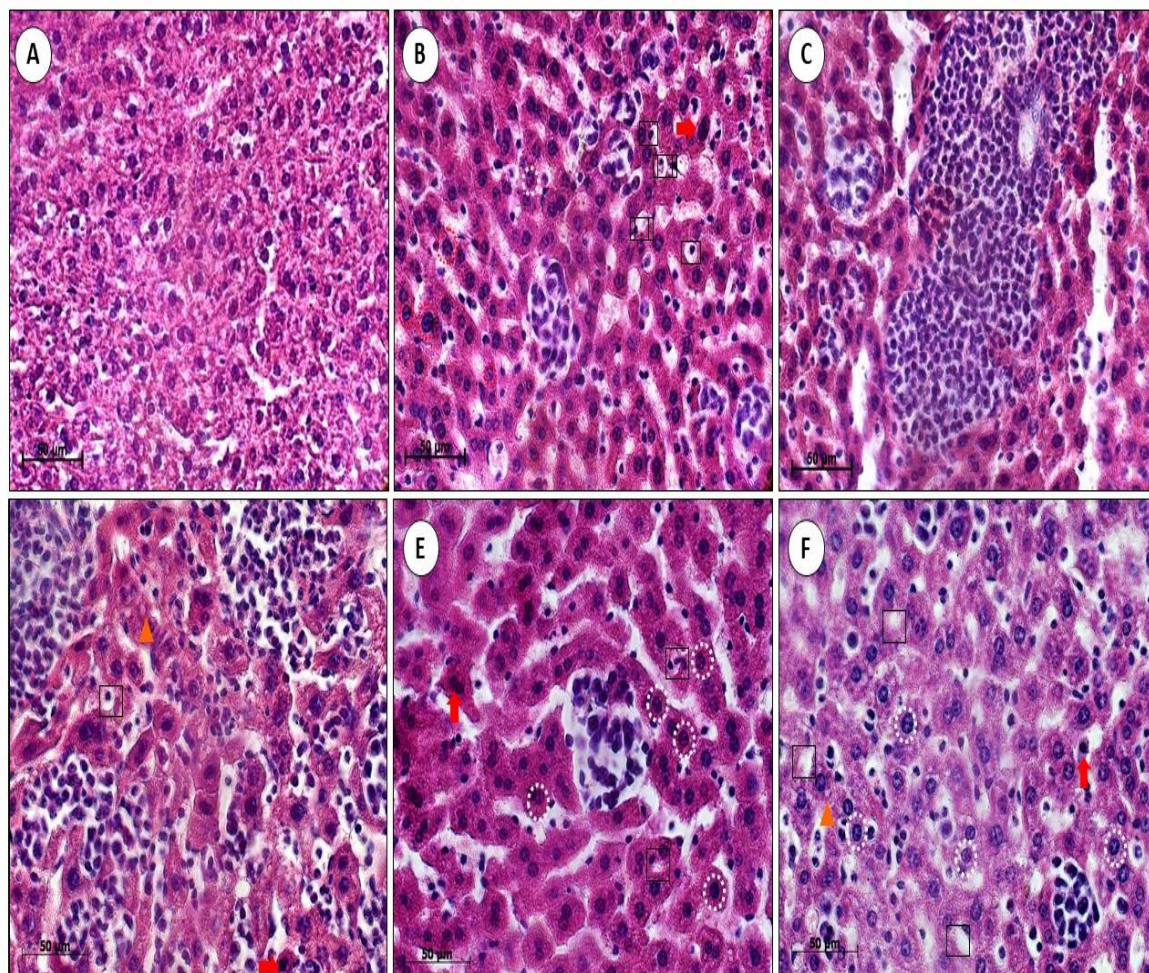
### 6.3.8.3 Análise histológica do fígado

O fígado dos animais do grupo controle sadio apresentou características histológicas normais. Pode-se observar a organização típica do fígado com estruturas justapostas umas às outras em estruturas conhecidas como lóbulo hepático que apresenta um formato hexagonal. Nos lóbulos observam-se cordões de hepatócitos dispostos

radialmente e separados por sinusóides hepáticos, com paredes revestidas de células endoteliais e células de Kupffer em seu interior (Figura 56-A).

Nos outros grupos, portadores de tumor de mama, pode-se observar a morfologia hepática alterada, com indício de processo inflamatório. Observam-se espaços entre o endotélio sinusoidal e o cordão de hepatócitos. Nestes espaços foram identificados leucócitos (em azul), principalmente mais próximos aos espaços porta e veias centro lobulares e em tecido conjuntivo interlobular. Estes foram vistos em todas as lâminas, menos no grupo controle. Também foram encontradas alterações como degeneração celular e núcleos picnóticos (Figura 56 B-F).

Possivelmente, as alterações morfológicas evidentes devem-se à presença do tumor e ou, por causa do uso do quimioterápico. Isto deve-se ao aumento dos níveis de radicais livres, que causam danos oxidativos lesando os componentes celulares, fazendo exceder os níveis toleráveis pelas células. Vale lembrar que as células possuem mecanismos citoprotetores que atuam para contrabalancear estes efeitos (MONGE-FUENTES, 2009). Quando comparamos estes dados com os resultados bioquímicos de enzimas de origem hepática, os quais são parâmetros utilizados como marcadores da função do fígado, já que o docetaxel é conhecido por ser metabolizado no fígado, concluiu-se que os resultados não mostraram um aumento a partir do valor de referência, indicando que não houve indício de comprometimento hepático. Dos parâmetros utilizados, não houve aumento dos índices que mostram cirrose, esteatose ou perda da função hepática, principalmente pelos valores normais para a transaminase pirúvica que é uma enzima hepática utilizada para detectar danos nos hepatócitos. Também não foi observada necrose ou fibrose nas lâminas analisadas.



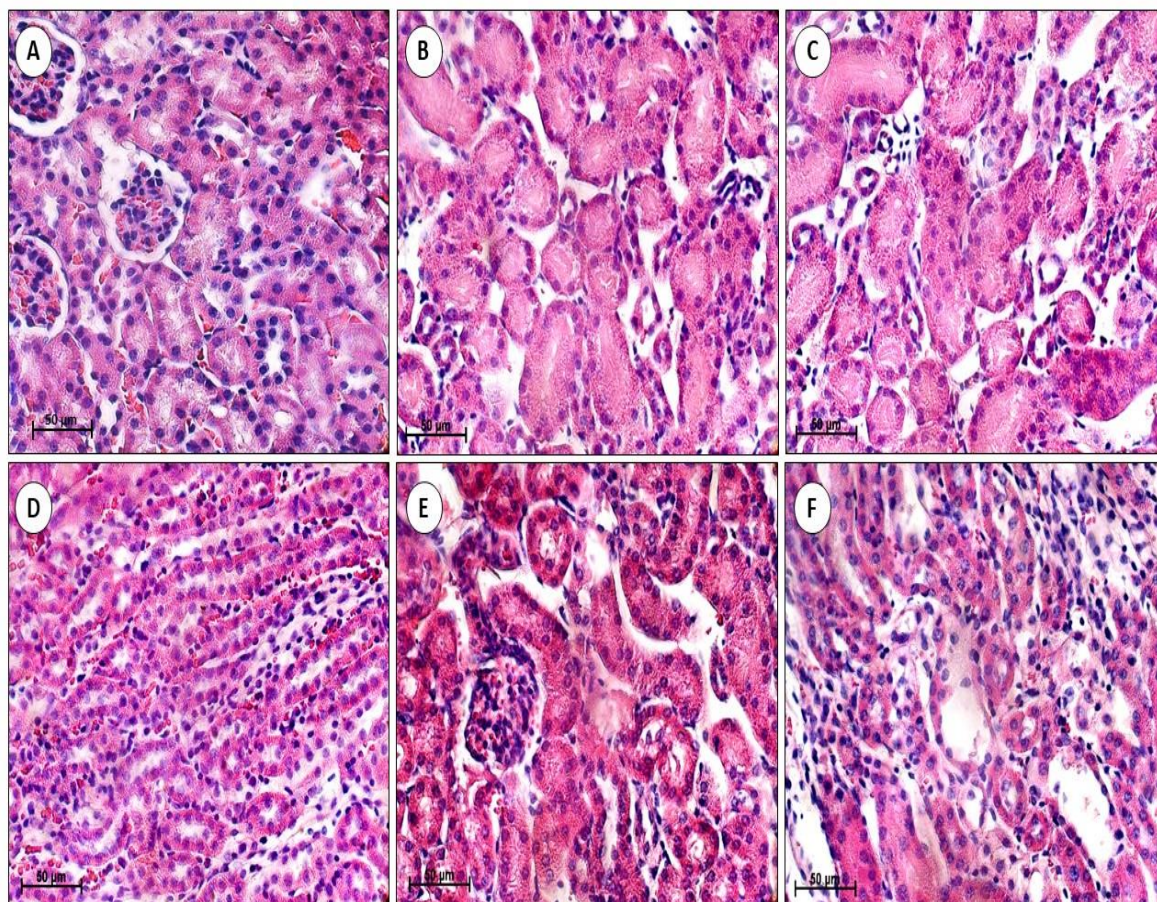
**Figura 56** - Fotomicrografias da histologia do fígado de camundongos fêmeas Balb/C. (A) Grupo controle sadio. Tratados com: (B) DTX; (C-D) NLS-Branca; (E) NLS-DTX e (F) PBS. Núcleo picnótico (seta vermelha), cariorrexe (círculo tracejado), cariólise, (cabeça de seta), célula fragmentada e com a liberação de corpos apoptóticos (quadrado). Os animais foram tratados com 10 mg/kg de DTX. Coloração H&E, (40x).

#### **6.3.8.4 Análise histológica do rim**

A histologia do rim dos camundongos mostrou nos grupos de portadores de tumor células menos justaposta e maiores quando comparadas ao tecido do grupo controle sadio (Figura 57). No rim temos a zona cortical e a medular. Na zona cortical, foi possível observar os túbulos contorcidos proximais e distais. Nos grupos NLS-Branca e PBS, principalmente, não é possível visualizar túbulos contorcidos proximais nitidamente (Figura 57 – C, D e F).

Estudos demonstraram que o metabolismo hepático e excreção biliar é uma das principais vias de eliminação do docetaxel em camundongos, ratos e humanos, sendo as fezes a principal via de excreção deste fármaco (SPARREBOOM *et al.*, 1998).

A depuração de substâncias estranhas no organismo é realizada pelos rins, por isso, a função renal é um parâmetro importante de toxicidade. A taxa de filtração glomerular é medida pela concentração de creatinina. A toxicidade renal é detectada pela redução na velocidade de filtração glomerular pelos rins, o que provoca uma redução da excreção de creatinina na urina, conseqüentemente um aumento do nível de creatinina no sangue. Dessa forma, é possível correlacionar o uso de tratamentos (por exemplo, quimioterápicos) para entender se estes causam nefrotoxicidade (BERNE, *et al.*, 2010). Portanto, mesmo com estas alterações morfológicas, os dados encontrados neste estudo demonstram que não houve nefrotoxicidade provocada pelos tratamentos utilizados, quando correlacionados aos dados bioquímicos.



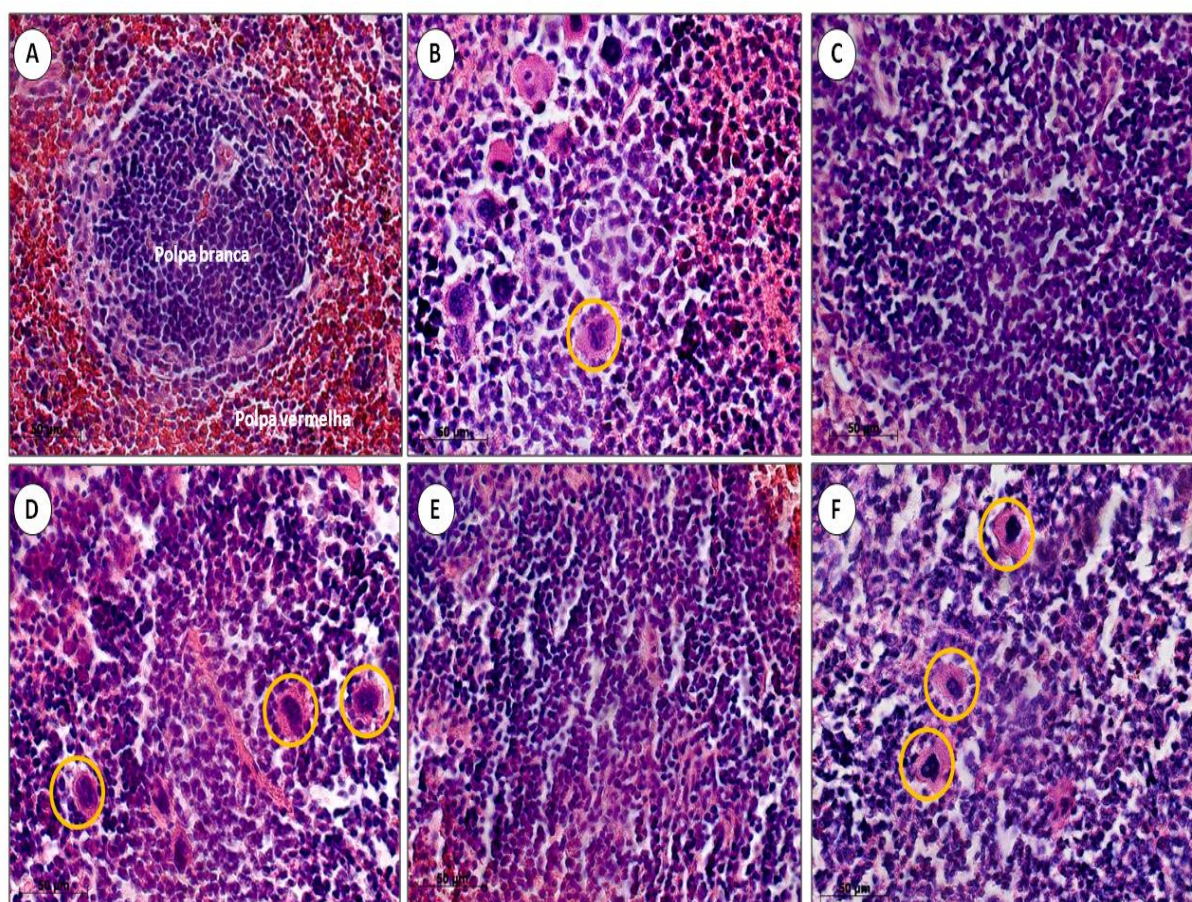
**Figura 57** - Fotomicrografias da histologia do rim de camundongos fêmeas Balb/C. (A) Grupo controle sadio. Grupos tratados com: (B) DTX; (C-D) NLS-Branca; (E) NLS-DTX e (F) PBS. Os animais foram tratados com 10 mg/kg de DTX. Coloração H&E, (40x).

#### 6.3.8.5 Análise histológica do baço

O parênquima do baço se divide em polpa branca que é constituída por nódulos linfáticos, e em polpa vermelha que corresponde a cordões esplênicos, com estruturas alongadas de tecido linfóide e seios esplênicos (capilares sinusóides). As funções do baço são a formação de linfócitos, a destruição de hemácias velhas, a defesa do organismo contra invasores e o armazenamento de sangue (KUEHNEL & WOLFGANG, 2019).



O baço dos animais revelou uma morfologia normal e íntegra, com uma cápsula de tecido conjuntivo envolvendo o órgão (Figura 58). No parênquima, arteríolas e áreas com nódulos linfáticos, que formam a polpa branca e as áreas em vermelho que são chamadas de polpa vermelha contendo cordões e trabéculas esplênicas. Também pode-se observar espalhados pelo tecido alguns megacariócitos que são células da medula óssea, responsáveis pela produção de plaquetas sanguíneas (Figura 58 B, D e F).



**Figura 58** - Fotomicrografias da histologia do baço de camundongos fêmeas Balb/C. (A) Grupo controle sadio. Tratados com: (B) DTX; (C-D) NLS-Branca; (E) NLS-DTX e (F) PBS. Megacariócito: círculo laranja. Os animais foram tratados com 10 mg/kg de DTX. Coloração H&E, (40x).

## 7. CONCLUSÕES

Diante do exposto, o objetivo geral deste estudo consistiu em desenvolver, caracterizar e avaliar os efeitos biológicos e a atividade terapêutica de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo docetaxel em carcinoma mamário *in vitro* e *in vivo*. Logo, pode-se concluir com os resultados que:

- As NLS são formulações estáveis;
- Houve uma taxa de encapsulação de 86% do fármaco nas NLS;
- As NLS não causaram hemólise significativa no sangue;
- A NLS-Branca não se mostrou tóxica nos testes *in vitro*;
- NLS-DTX foi 100 vezes mais tóxica do que o docetaxel livre contra célula 4T1 após 24 horas de tratamento;
- A NLS-DTX altera a morfologia celular (4T1 e NIH-3T3) assim como o DTX livre.
- Após os tratamentos com NLS-DTX e DTX houve alteração nos microtúbulos de células 4T1;
- Foi possível observar a internalização das NLS-DTX em células 4T1 e afirmar que as principais vias de internalização são por caveolina e macropinocitose;
- Foi possível observar mudanças morfológicas nas células tratadas com NLS-DTX e identificar nanopartículas na superfície das células por microscopia de varredura;
- O tratamento com NLS-DTX mostrou produzir mais EROS que o DTX;
- Os tratamentos induzem morte por apoptose e param o ciclo na fase G2/M;
- O tratamento *in vivo* com NLS-DTX reduziu significativamente o volume tumoral dos animais;
- O tratamento com NLS-DTX sugere prevenção de metástase no pulmão de camundongos;
- Foi observado um maior acúmulo de nanopartículas no baço dos camundongos em ambos os tratamentos utilizados;
- Os tratamentos não induziram danos às células da medula óssea dos camundongos

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o docetaxel associado as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS-DTX) mantém os efeitos citotóxicos contra o adenocarcinoma mamário 4T1 *in vitro* e *in vivo* de forma superior ao fármaco livre, além de prevenir metástase no pulmão dos animais. Estes resultados podem ser somados aos encontrados na literatura e assim contribuir para o desenvolvimento de estratégias de tratamentos para o câncer de mama. Nesse sentido, mais estudos devem ser realizados de modo a correlacionar e elucidar melhor os resultados desta pesquisa.

Os resultados apontam que é necessário repetir o estudo de biodistribuição *in vivo* com um tempo menor de tratamento. Assim, acredita-se que será possível entender melhor como as NLS se distribuem pelo corpo. Também, é importante investigar mais a possível prevenção de metástase *in vivo* pelas NLS e, também, avaliar a interação das nanopartículas com o sistema imune *in vitro* e *in vivo*. Novos estudos podem ser feitos testando diferentes vias de administração das NLS-DTX *in vivo*.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABURAHMA, M. H. & BADR-ELDIN, S. M. Compritol 888 ATO: a multifunctional lipid excipient in drug delivery systems and nanopharmaceuticals. **Exp. Opin. on Drug Delivery**, v. 11, n. 12, p. 1865–1883, 2014.

ALBANO, J. M., RIBEIRO, L. N., COUTO, V. M., BARBOSA, M., RODRIGUES, S., BREITKREITZ, M. C. Rational design of polymer-lipid nanoparticles for docetaxel delivery. **Colloids Surfaces B Biointerfaces**. 2019; 175:56–64.

AL-HABORI, M.; AL-AGHBARI, A.; AL-MAMARY, M.; BAKER, M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. **J Ethnopharmacol**. v. 83, n. 3, p. 209-17, 2002.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2016. **Cancer Facts & Figures**. p. 1–9, 2016.

AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. **Cancer Staging Handbook**. 7a. edição. v. 17, n. 6, p. 1471-4, 2010.

ANTON, N., BENOIT, J. P., SAULNIER, P., Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review, **Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 3, p. 185-99, 2008.

ANVISA, RDC No 166, de 24 de julho de 2017., **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2017.

## Referências

---

BAE, Young Kyung *et al*, Fibronectin expression in carcinoma cells correlates with tumor aggressiveness and poor clinical outcome in patients with invasive breast cancer, **Human Pathology**, v. 44, n. 10, p. 2028-37, 2013.

BALI, V.; ALI, M.; ALI, J. Study of surfactant combinations and development of a novel nanoemulsion for minimising variations in bioavailability of ezetimibe. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, p. 410–420, 2010.

BANERJEE, A., KUNWAR, A., MISHRA, B. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin. Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chem Biol Interact**, v. 174, n. 2, p. 134-139, 2008.

BERNE, R. M., LEVY, M. N., KOEPPEN, B. M. & STANTON, B. A. **Berne & Levy Physiology**, 6a ed., Elsevier, Rio de Janeiro, 2010.

BARROS, A. C. S. D; BARBOSA, E. M.; GEBRIM, L. H.; ANELLI, A.; FIQUEIRA. F, A.; DEL. G, A. Diagnóstico e tratamento do câncer de mama. Associação Médica Brasileira e **Conselho Federal de Medicina**. V. 1, p. 1-13, 2001.

BRANCO, C. & SILVEIRA., A. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos wister e camundongos Swiss do biotério professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 2, p. 209-14, 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Controle dos cânceres do colo do útero e da mama. 2. ed. – Brasília: Editora do **Ministério da Saúde**, 2013.

## Referências

---

BOSE, S., DU, Y., TAKHISTOV, P., MICHNIAK-KOHN, B. Formulation optimization and topical delivery of quercetin from solid lipid based nanosystems, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, n. 1, p. 56-66, 2013.

BOZETO, J. Efeito antitumoral, genotóxico e mutagênico de nitensidina A em camundongos nude Balb/C com implante tumoral xenográfico de células imortalizadas com HPV-16 (SiHa), **Dissertação**. Unesp, 2011.

CANTON, I.; BATTAGLIA, G. Endocytosis at the nanoscale. **Chem. Soc. Rev.**, v. 41, p. 2718-2739, 2012.

CARVER, L. A & SCHNITZER, J. E. Caveolae: Mining little caves for new cancer targets, **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 8, p. 571-81, 2003.

CHANG, D.K, LI, P.C, LU, R.M, JANE, W.N, WU, H.C. Peptide-Mediated Liposomal Doxorubicin Enhances Drug Delivery Efficiency and Therapeutic Efficacy in Animal Models. **PLoS ONE**. v. 8, n 12, 2013.

CHATTERJEE, S. J. & MCCAFFREY, L. Emerging role of cell polarity proteins in breast cancer progression and metastasis, **Breast Cancer: Targets and Therapy**, 2014.

CHAVES, N. L. Estudo da interação entre nanopartículas de maghemita associadas ao citrato de ródio e células de câncer de mama. Tese (Doutorado em Biologia Animal) **Universidade de Brasília**, Brasília, 2017.

CHEANG, M. C., VODUC, D., BAIDIK, C., LEUNG, S., MCKINNEY, S., CHIA, S. K., PEROU, C. M., NIELSEN, T. O. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers

*Referências*

---

has superior prognostic value than triple-negative phenotype. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 5, p. 800-9, 2008

CHENG, L., MICHAEL D., SWARTZ, HUI, Z. Hazard of Recurrence among Women after Primary Breast Cancer Treatment - A 10-Year Follow-up. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** v. 21, 2012.

CHEUK, I. W., SHIN, V. Y., KWONG, A. Breast Cancer Detection of Methylated Circulating DNA as Noninvasive Biomarkers for Breast Cancer Diagnosis. **J Breast Cancer.** V. 20, n. 1, p. 12-19, 2017.

CHO, J. B. C. Comparison of solid lipid nanoparticles for encapsulating paclitaxel or docetaxel, **J of Pharm Invest.** v. 45, p. 625–631, 2015.

CHORILLI, M., MICHELIN, D. C., SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: O camundongo, **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada.** v 28, n. 1, p. 11-23, 2007.

CIRQUEIRA, M. B; MOREIRA, M. A. R., Soares L. R, FREITAS, J. R. Subtipos moleculares do câncer de mama. **Femina**, v. 39, n. 10, p. 499-503, 2011.

COSTA, J. P. Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol, **Rev Cienc Farm Apl.** v. 33, n. 3, p. 421-8, 2012.

DEL BUFALO, D., BIROCCIO, A., LEONETTI, C., ZUPI, G., Bcl-2 overexpression enhances the metastatic potential of a human breast cancer line, **FASEB Journal**, v. 11, n. 12, p. 947-53, 1997.

*Referências*

---

DJAZAYERI, K., SZILVÁSSY, Z., PEITL, B., NÉMETH, J., NAGY, L., KISS, A., SZABÓ, B., BENKO, I. Accelerated recovery of 5-fluorouracil-damaged bone marrow after rosiglitazone treatment, **European Journal of Pharmacology**, v. 17, p. 122-9, 2005.

DOKTOROVOVA. S., SOUTO, E. B., SILVA, A. M. Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers – A systematic review of in vitro data, **Eur. J. Pharm. Biopharm**, v. 87, p.1-18, 2014.

DOU, J., ZHANG, H., LIU, X., ZHANG, MENGYU Z., GUANGXI. Preparation and evaluation in vitro and in vivo of docetaxel loaded mixed micelles for oral administration, **Colloids Surf B: Biointerfaces**. v. 1, n. 114, p. 20-7, 2014.

DOWSETT, M., SMITH, I., ROBERTSON, J., ROBISON, L., PINHEL, I., JOHNSON, L., SALTER, J., DUNBIER, A., ANDERSON, H., GHAZOU, Z., SKENE, T., EVANS, A., A'HERM, R., ISKENDER, A., WILCOX, M., BLISS, J. Endocrine therapy, new biologicals, and new study designs for presurgical studies in breast cancer, **J Nati Cancer Inst Mon**. v. 2011, n. 43, p. 120-3, 2011.

ESTELLA-HERMOSO M., ANDER, R., MOLLINEDO, M., BLANCO-PRIETO, F., MARÍA, J. Lipid nanoparticles for alkyl lysophospholipid edelfosine encapsulation: Development and *in vitro* characterization, **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v. 40, n. 2, p. 260-265, 2008.

ESTEVANATO, L. Nanocápsulas magnéticas de Selol para tratamento do câncer de mama experimental: avaliação *in vitro* e *in vivo*. **Universidade de Brasília**, Tese de Doutorado p. 134 p., 2012.



*Referências*

---

FANG, G., TANG, B., LIU, Z., GOU, J., ZHANG, Y., XU, H., TANG, X. Novel hydrophobin-coated docetaxel nanoparticles for intravenous delivery: In vitro characteristics and in vivo performance, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, n. September, p. 1–9, 2014.

FENG, L & MUMPER, R. J. A critical review of lipid-based nanoparticles for taxane delivery, **Cancer Lett.** v. 1, n. 2, p. 157-75, 2013.

FENG., S. S, MEI., L. ANITHA., P. GAN., C. W. ZHOU., W. Poly (lactide)-vitamin E. **Biomaterials.** V. 30, n.19, p. 3297-306, 2009.

FERREIRA, L. A. B. RADAIC, A., PUGLIESE, G. O., VALENTINI, M. B., OLIVEIRA, M. R., JESUS, B. M. Endocitose e tráfego intracelular de nanomateriais Endocytosis and intracellular trafficking of nanomaterials, **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, n. 2, 2014.

FIGUEROA, J. D., PFEIFFER, R. M., PATEL, D. A., LINVILLE, L., BRITON, L. A., GIERACH, G. L., YANG, X. R., PAPATHOMAS, D., VISSCHER, D., MIES, C., DEGNIM, A. C., ANDERSON, W. F., HEWITT, S., KHODR, Z. G., CLARE, S. E., STORMIOLO, A. M., SHERMAN, M. E. Terminal duct lobular unit involution of the normal breast: Implications for breast cancer etiology. **J Nati Cancer Inst.** V. 1, n. 10, 2014.

FILIPA, D. Avaliação da capacidade de transporte e entrega de material genético associada a diferentes nanossistemas de base polimérica, Dissertação de Mestrado. **Universidade de Coimbra**, 2016.

*Referências*

---

FILIFE, V., HAWE, A., JISKOOT, W. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates, **Pharmaceutical Research**. v. 27, n. 5, p. 796-810, 2010.

FREITAS, C., MÜLLER, R. H. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase. **Eur J Pharm Biopharm**. V. 47, n. 2, p. 125-32, 1999.

FU, X., KONG, W., ZHANG, Y., JIANG, L., WANG, J., LEI, J. Novel solid-solid phase change materials with biodegradable trihydroxy surfactants for thermal energy storage, **RSC Advances**, v. 5, n. 84, p. 68881–68889, 2015.

GAO, Y., YANG, R., ZANG, Z., CHEN, L., SUNZ, Z., LI, Y. Solid lipid nanoparticles reduce systemic toxicity of docetaxel: performance and mechanism in animal. **Nanotoxicology**. v, 5. n, 4. P, 636-649, 2011.

GESKE-MORITZ, M., Solid lipid nanoparticles as attractive drug vehicles: composition, properties and therapeutic strategies. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**. V. 1, p. 982-984, 2016.

HAMMADI, Nahidah Ibrahim et al, Formulation of a Sustained Release Docetaxel Loaded Cockle Shell-Derived Calcium Carbonate Nanoparticles against Breast Cancer, **Pharmaceutical Research**, v. 34, n. 6, p. 1193–1203, 2017.

HANNA, N., et al. Phase III study of cisplatin, etoposide, and concurrent chest radiation with or without consolidation docetaxel in patients with inoperable stage 3 non–small-

*Referências*

---

cell lung cancer: The Hoosier oncology group and U.S. **Oncology. J Clin Oncol**, v, 10. P 5755 – 5760, 2008.

HARPER, A. H., MARTIN, D. W. Harper's Review of Biochemistry. **Lange Medical**. V. 50, p. 688, 1981.

HELGASON, T., AWAD, T. S., KRISTBERGSSON, K., MCCLEMENTS, D. J., WEISS, J. Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN), *Journal of Colloid And Interface Science*, v. 334, n. 1, p. 75–81, 2009.

HERMENEAN, A. & ARDELEAN, A. Targeting the Cytoskeleton with Plant-Bioactive Compounds in Cancer Therapy. *Cytoskeleton - Structure, Dynamics, Function and Disease*. **Intech**, 2017.

HERNÁNDEZ-VARGAS, H.; PALACIOS, J.; MORENO-BUENO, G., Molecular profiling of docetaxel cytotoxicity in breast cancer cells: Uncoupling of aberrant mitosis and apoptosis, **Oncogene**, v. 3, n. 26, p. 2902-1, 2007.

HERSCHKOWITZ, J. I., SMININ, K., WEIGMAN, V. J., MIKAEKLIAN, I., USARY, J., HU, Z., RASMUESSEN, K. E., JONES, L. P., ASSEFNIA, S., CHANDRASSEKHRAN, S., BACKLUND, M. G., YIN, Y., KHRAMTOV, A. I., BASTEIN, R., QUACKENBUSH, J., GLAZER, R. I., BROWN., GREEN, J. E., KOPELOVICH, L., FURTH, P. A., PALAZZO, J. P., OLOPADE, O. I., BERNARD, P. S., CHURCHILL, G. A., VAN DYKE, T., PEROU, C. M. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biol.** v. 8, n. 5, 2007.

*Referências*

---

HILLAIREAU, H & COUVREUR, P. Nanocarriers' entry into the cell: Relevance to drug delivery, **Cell Mol Life Sci**, v. 66, n. 17, p. 2873–2896, 2009.

H.G., XU., ZHAI, Y. X., CHEN, J., LU, Y., WNAG, J. W., QUAN, C. S., ZHAO, R. X., XIAO, X., HE, Q., WERLE, K. D., KIM, H. G., LOPEZ, R., CUI, R., LIANG, J., LI, Y. L., XU, Z. X. LKB1 reduces ROS-mediated cell damage via activation of p38, **Oncogene**. v. 34, n. 29, p. 3848-59, 2015.

HU, F.Q.; JIANG, S.P.; DU, Y.Z.; YUAN, H.; YE, Y.Q., ZENG, S. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid c solvent diffusion method in an aqueous system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 45, n. p. 167-173, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estatísticas de câncer | **INCA** - Instituto Nacional de Câncer. 01/08/2019.

JAGDALE, S., PATIL, S., KUCHEKAR, B., CHABUKSWAR., A. Preparation and characterization of metformin hydrochloride - compritol 888 ATO solid dispersion. vol. 3, n. 3, p. 197, 2011.

JAIN, A., THAKUR, K., KUSH, P., JAIN, UK. Docetaxel loaded chitosan nanoparticles: formulation, characterization and cytotoxicity studies. **Int J Biol Macromol**. V. 69, p. 546-53, 2014.

JAIN, D. S., BAJAJ, A. N., ATHAWALE, R. B., SHIKHANDE, S. S., PANDEY, A., GOEL, P. N. Thermosensitive PLA based nanodispersion for targeting brain tumor via intranasal route, **Materials Science and Engineering C**. v. 63, p. 411-21, 2016.

*Referências*

---

KANG, J., PARK, J. H., LEE, H. J., JO, U. PARK, J. K., SEO, J. H. KIM, Y. H., KIM, I., PARK, K. H. Caveolin-1 modulates docetaxel-induced cell death in breast cancer cell subtypes through different mechanisms, **Cancer Research and Treatment**. v. 48, n. 2, p. 715-26, 2016.

KAROLEWICZ, B., GAJDA, M., PLUTA, J., GÓRNIAK, A. The effect of Pluronic F127 on the physicochemical properties and dissolution profile of lovastatin solid dispersions, **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 123, n. 3, p. 2283–2290, 2016.

KAUR S, NAUTYAK U, SINGH R, SINGH, S, DEVI A. Nanostructure Lipid Carrier (NLC): the new generation of lipid nanoparticles. **Asian Pacific J Heal Sci**. v. 2(2).p. 76–93, 2015.

KENNECKE, H. et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. **Journal of Clinical Oncology**. v. 10, n. 20, p. 327-7, 2010.

KINNULA, V. L.; CRAPO, J. D.; RAIVIO, K. O. Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. **Lab Invest**. V. 73, n. 1, p. 3-19, 1995.

KOSAKA, T., HONGO, H., MIYAZAKI, Y., NISHIMOTO, K., MIYAJIMA, A., OYA, M. Reactive oxygen species induction by cabazitaxel through inhibiting Sestrin-3 in castration resistant prostate cancer, **Oncotarget**. v. 8, n. 50, p. 87675-87683, 2017.

KUEHNEL & WOLFGANG. Color Atlas of Cytology, Histology, and Microscopic **Anatomy**, 4a. edição, 2019.

*Referências*

---

LEUNG, S., MIYAKE, H., ZELLWEGER, T., TOLCHER, A., GLEAVE, M. E. Synergistic chemosensitization and inhibition of progression to androgen independence by antisense Bcl-2 oligodeoxynucleotide and paclitaxel in LNCaP prostate tumor model. **Int J Cancer**. V. 15; p. 46-50, 2001.

LI, G. C. & WANG, Z. Y. Constitutive expression of RbAp46 induces epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells, **Anticancer Research**, v. 26, n. 5 A, p. 3555–3560, 2006.

LI, X., WANG, D., ZHANG, J., PAN, W. Preparation and Pharmacokinetics of docetaxel based on nanostructured lipid carries. **J Pharm Pharmacol**. v, 61, n. 11, p. 1485-92, 2009.

LIANG, S., ZANG, W., WANG, A. T., SU, H. T. ZHONG, H. J. Q, X. R. Treating metastatic triple negative breast cancer with CD44/neuropilin dual molecular targets of multifunctional nanoparticles, **Biomaterials**, v. 137, p. 23–36, 2017.

LIU, Z., LIU D., WANG, L., ZHANG, J., ZHANG, N. Docetaxel-loaded pluronic p123 polymeric micelles: in vitro and in vivo evaluation. **Int J Mol Sci**. v. 12, p. 1684-96, 2011.

LOISEAU, A., BOUDON, J., MIRJOLET, C., CRÉHANGE, G., MILLOT, N. Taxane-Grafted Metal-Oxide Nanoparticles as a New Theranostic Tool against Cancer: The Promising Example of Docetaxel-Functionalized Titanate Nanotubes on Prostate Tumors. **Adv Healthc Mater**. v. 6 (16) p.1–10, 2017.

*Referências*

---

LUO, Y., LING, Y., GUO, W., PANG, J., LIU, W., FANG, Y., WEN, X., WEI, K., GAO, X. Docetaxel loaded oleic acid-coated hydroxyapatite nanoparticles enhance the docetaxel-induced apoptosis through activation of caspase-2 in androgen independent prostate cancer cells, **Journal of Controlled Release**. v. 15, n. 2, p. 278-88, 2010.

MARTIN, A. C. B. M. Eficácia do [10]-gingerol contra metástases de câncer de mama: estudos in vitro e in vivo em camundongos. **Tese de doutorado**, 2015.

MEHNERT, W. & MÄDER, K. Solid nanoparticles: production, characterization and applications. **Adv Drug Deliv Rev**. v. 25, p. 165-96, 2001.

MEI, L., ZHANG, Y., TIAN, G., YANG, D., CHENG, H., SUN, H., TIAN, Y., LIU, K., HUANG, L. A novel docetaxel-loaded poly ( $\epsilon$ -caprolactone)/Pluronic F68 nanoparticle overcoming multidrug resistance for breast cancer treatment. **Nanoscale Research Letters**, v. 4, n. 12, p. 1530–1539, 2009.

MINAI, L., YEHESEKELY-HAYON., D., YELIN, D. High levels of reactive oxygen species in gold nanoparticle-targeted cancer cells following femtosecond pulse irradiation. **Scientific Reports**. v. 3, n. 2146, 2013.

MIZUMACHI, T., SUZUKI, S., NAITO, A., CARCEL-TRULLOLS, J., EVANS, T. T., SPRING, P. M., ORIDATE, N., FURUTA. Y., FRUKUDA, S., HIGUCHI, M. Increase mitochondrial DNA induces acquired docetaxel resistance in head and neck cancer cells. **Oncogene**. v. 27, n. 6, p. 831-8, 2007.

MONGE-FUENTES, V. Estudo da biodistribuição e biocompatibilidade de nanopartículas magnéticas à base de maguemita recobertas com DMSA em macacos-

## Referências

---

prego (Cebus spp.) juvenis mediante análise morfológica. Tese de doutorado.

**Universidade de Brasília.** p. 107, 2009.

MOSALLAEI, N., JAAFARI, M. R., HANAFI-BOJD. M. Y., GOLMOHAMMADZADEH, S. MALAEKEH-NIKOUEI, B. Docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles: preparation, characterization, *in vitro* and *in vivo* evaluation. **J Pharm Sci.** v. 102, n. 6, p. 1994-2004, 2013.

MÜLLER, R. H., MADER, K., GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug deliver – a review of state of the art. **Eur. J. Pharm, Biopharm.** v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000.

NAGUIB, Y. W., RODRIGUES, L., LI, X., HURSTING, S. D., WILLIAMS, R. O. Solid Lipid Nanoparticle Formulations of Docetaxel Prepared with High Melting Point Triglycerides: In Vitro and in Vivo Evaluation. **Mol. Pharmaceutics.** v. 11, p. 1239-1249, 2014.

NEWA, M., BHANDARI, K. H., LEE, D. X., SUNG, J. H., KIM, J. A., YOO, B. K., WOO, J. S., CHOI, H. G., YONG, C. S. Enhanced dissolution of ibuprofen using solid dispersion with polyethylene glycol 20000. **Drug Dev Ind Pharm.** V. 34, n. 10, p. 1013-21, 2008.

OLBRICH, C. & MÜLLER, R. H., Enzymatic degradation of SLN-effect of surfactant and surfactant mixtures, **International Journal of Pharmaceutics.** V. 25, n. 1, p. 31-9, 1999.



*Referências*

---

ONNAINTY, R. & GRANERO, G., Chitosan-based nanocomposites: Promising materials for drug delivery applications, **Elsevier Inc.** p. 375-407, 2019.

OH, K., LEE, O. Y., SHON, S. Y., NAM, O., RYU, P. M., SEO, M. W., LEE, D. S. A mutual activation loop between breast cancer cells and myeloid-derived suppressor cells facilitates spontaneous metastasis through IL-6 trans-signaling in a murine model. **Breast Cancer Res.** v. 15, n. 5, 2013.

OLIVEIRA, C. F & SILVA, T. S. D. A. Carcinoma invasivo da mama: do diagnóstico ao tratamento cirúrgico. In: **Manual de Ginecologia**, 2010.

ORTH, J. D & MCNIVEN, M. A. Rapid receptor internalization through circular dorsal ruffles, **Cancer Research.** v. 7, n. 5, p. 87-100, 2006.

PANARITI, A.; MISEROCCHI, G.; RIVOLTA, I. The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: Disrupting or enabling functions? Nanotechnology, **Science and Applications**, 2012.

PATEL, J., AMRUTIYA, J., BHATT, P., JAVIA, A., JAIN, M., MIRSA, A. Targeted delivery of monoclonal antibody conjugated docetaxel loaded PLGA nanoparticles into EGFR overexpressed lung tumour cells. **J Microencapsul.** v. 35, n. 2, p. 204–17, 2018.

PEROU, C. M., SORLIE, T., EISEN, M. B., RIJIN, M., JEFFREY, S. S., REES, C. A., POLLACK, J. R., ROSS, D. T., JOHNSEN, H., AKSLEN, L. A., FLUGE, O., PERGAMENSCHIKOV, A., WILLIAMS, C., ZHU, S. X., LONNING, P. E., BORRESEN-DALE, A. L., BROWN, P. O., BOTSTEIN, D. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature.** v. 406, p. 747-752, 2000.

*Referências*

---

PRAT, A. PARKER, J. S., KARGINOVA, O., FAN, C., LIVASY, C., HERSCHKOWITZ, J. I., HE, X., PEROU, M. C. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research**. v. 12, n. 5, 2010.

PRAT, A.; PEROU, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Molecular Oncology**. v. 5, n. 1, p. 5-23, 2011.

PAWAR, V. K., GUPTA, S., SINGH, Y., MEHER, J., SHARMA, K., SINGH, P., GUPTA, A., BORA, H. CHAURASIA, M., CHORASIA, M. K. Pluronic F-127 stabilised docetaxel nanocrystals improve apoptosis by mitochondrial depolarization in breast cancer cells: Pharmacokinetics and toxicity assessment, **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 11, n. 10, p. 1747–1763, 2015.

PENTENERO, M., Nanotechnology: a novel adjunctive aid to fight cancer. **Oral Diseases**. v. 23, p. 273-275, 2016.

POUDEL, I., AHIWALE, R., PAWAR, A., MAHADIK, K., BOTHIRAJA, C. Development of novel biotinylated chitosan-decorated docetaxel-loaded nanocochleates for breast cancer targeting, *Artificial Cells*, **Nanomedicine and Biotechnology**, v. 46, n. sup2, p. 229–240, 2018.

PULASKI, B. A & OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. **Current Protocols in Immunology**. v. 20, n. 20, 2001.

QIU, M., OUYANG, J., SUN, H., MENG, F., CHENG, R., ZHANG, J., CHENG, L., LAN, Q., DENG, C., ZHONG, Z. Biodegradable Micelles Based on Poly (ethylene

*Referências*

---

glycol)-b-polylipopeptide Copolymer: A Robust and Versatile Nanoplatfom for Anticancer Drug Delivery, **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 9, n. 33, p. 27587–27595, 2017.

QURESHI, O. S., KIM, H. S., ZEB, A., CHOI, J. S., KIM, H. S., KWON, J. E., KIM, M. S., KANG, J. H., RYOU, C., PARK, J. S., KIM, J. K. Sustained release docetaxel-incorporated lipid nanoparticles with improved pharmacokinetics for oral and parenteral administration, **Journal of Microencapsulation**, v. 34, n. 3, p. 250–261, 2017.

RAHMAN, Z., ZIDAN, A. S.; KHAN, M. A. Non-destructive methods of characterization of risperidone solid lipid nanoparticles, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, n. 1, p. 127–137, 2010.

RAKHA, E. A.; REIS-FILHO, J. S.; ELLIS, I. O. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**. v. 120, n. 2, p. 293-308, 2010.

ROSENBERG, S. A.; SPIESS, P.; LAFRENIERE, R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. **Science**. v. 9, n. 4770, p. 1318-21, 1986.

ROCHA, M., CHAVES, N., BÁO, S. Nanobiotechnology for Breast Cancer Treatment, **Intech**, v. i, n. p. 13, 2016.

RODRIGUES, M. C. Indução de morte celular imunogênica por terapia fotodinâmica mediada por cloreto de alumínio-ftalocianina incorporado a nanoemulsão em células de câncer de mama murino, Tese de Doutorado. **Universidade de Brasília**. p. 120, 2018.

*Referências*

---

ROSTAMI, E. Drug targeting using solid lipid nanoparticles. **Chem. Phys. Lipids.** v. 181, p. 56-61, 2014.

SAFARI, J & ZARNEGAR, Z. Advanced drug delivery systems: nanotechnology of health design A Review. **J. Saudi Chem. Soc.** v. 18, p. 85-99, 2014.

SALGADO, R., JUNIUS, S., BENOY, I., VAN D. P., VERMEULEN, P., VAN, M. E., HUGET, P., DIRIX, L. Y. Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer. **International Journal of Cancer**, v. 103, n. 5, p. 642–646, 2003.

SANNA V., ROGGIO, A. M., POSADINO, A. M., COSSU, A., MARCEDDU, S., MARIANI, A., Novel docetaxel-loaded nanoparticles based on poly(lactide-co-caprolactone) and poly(lactide-co-glycolide-co-caprolactone) for prostate cancer treatment: Formulation, characterization, and cytotoxicity studies. **Nanoscale Res Lett.** V.6(1). P. 1–9, 2011.

SANTOS, C., RODRIGUEZ, F., GARCIA, V., MORAVCIKOVA, D., BERKES, D., DAICH, A., LEVADE, T., BAUDOIN-DEHOUX, C., BALLEREAU, S., GÉNISSON, Y. Identification of novel CERT ligands as potential ceramide trafficking inhibitors, **ChemBioChem.** v. 24, n. 15, p. 2522-8, 2014.

SCATTOLIN, G. Efeito do Docetaxel e da Dexametasona nas Propriedades Mecânicas e na Histologia dos Pulmões. Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina, **Universidade de Brasília**, 2015.

*Referências*

---

SCULLY, O., BAY, B., YIP, G., YU, Y. Breast Cancer Metastasis, **Cancer genomics & proteomics**. v. 9, n. 5, p. 311-20, 2012.

SEMETE, B., BOOYSEN., L., KALOMBO, L., VENTER, J. D., KATATA, L., RAMALAPA, B., VERSCHOOR, J A., SWAI, H. In vivo uptake and acute immune response to orally administered chitosan and PEG coated PLGA nanoparticles, **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 249, n. 2, p. 158–165, 2010.

SENISKI, G. G. Análise do perfil de metilação do promotor do gene ADAM33 e sua correlação clínica com câncer de mama. Dissertação de mestrado. Departamento de Patologia. Centro de Ciências Biológicas. **Universidade Federal do Paraná**, 2008.

SHI, L., XIE, H., LU, J., CAO, Y., LIU, J. Y., ZHANG, X., ZHANG, H., CUI, H., CAO, R. Positively Charged Surface-Modified Solid Lipid Nanoparticles Promote the Intestinal Transport of Docetaxel through Multifunctional Mechanisms in Rats, **Molecular Pharmaceutics**, v. 13, n. 8, p. 2667–2676, 2016.

SMALL, D. M. J. Lateral chain packing in lipids and membranes. **Lipid Res.** v. 15, n. 25, p. 1490-500, 1984.

SOHAIL, M. F., REHMAN, M. WEBSTER, T. J. Advancements in the oral delivery of Docetaxel: challenges, current state-of-the-art and future trends. **Int J Nanomedicine**. v. 13, n. 3, p. 3145–3161, 2018.

SØRLIE, T., PEROU, C. M., TIBSHIRANI, R., AAS, T., GEISLER, S., JOHNSEN, H., HASTIE, T., EISEN, M. B., VAN DE RIJIN, M., JEFFREY, SS., THORSEN, T., QUIST, H., MATESE, J. C., BROWN, P. O., BOTSTEIN, D., LONNING, P. E.,

*Referências*

---

BORRESEN-DALE, A. L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proce Nat Acad Sci U S A**. v. 11, n. 98, p. 10869-74, 2001.

SPARREBOOM, A; VAN, T. O; NOOIJEN, W. J. Preclinical pharmacokinetics of paclitaxel and docetaxel. **Anticancer Drugs**. 9: 1-17,1998.

STEVEN, L. S & SCOTT, M. Urinary system. In: Fundamentals of veterinary clinical pathology. **Iowa State**. 2a. edição, p. 277-336, 2002.

SUNG, J. C., PULLIAM, B. L., EDWARDS, D. A. Nanoparticles for drug delivery to the lung. **Trends Biotechnol**. v 25, p. 563-70, 2007.

SWANSON, J. A. & WATTS, Colin, Macropinocytosis, **Trends in Cell Biology**. v. 5, n. 11, p. 424-8, 1995.

TONINI, C. L. Análise Temporal do número e genotoxicidade de células-tronco de medula óssea de camundongos ateroscleróticos. **Universidade Federal do Espírito Santo**. Dissertação, 2008.

TORCHILIN, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. **Elsevier**, Northeastern University, 2011.

TOSTA, F. V. Desenvolvimento de sistemas lipídicos nanoestruturados contendo paclitaxel: Estudos de permeação cutânea, **UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**, v. 8, n. 33, p. 44, 2014.

*Referências*

---

TOURET, N., PAROUTIS, P., TEREbizNIK, M., HARRISON, R. E., TROMBETTA, S., PYPAERT, M., CHOW, A., JIANG, A., SHAW, J., YIP, C., MOORE, H. P., VAN DER WELL, N., HOUBEN, D., PETERS, P. J., CHASTELLIER, C., MELLMAN, I., GRINSTEIN, S. Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation, **Cell**. v. 7, n. 1, p. 157-70, 2005.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T.D., MAZUR, M., TELSER, J.WAI, I., CHEUK, Y., SHIN, V. Y., KWONG. A. Breast Cancer Detection of Methylated Circulating DNA as Noninvasive Biomarkers for Breast. **Cancer Diagnosis**, v. 20, n. 1, p. 12–19, 2017.

VODUC, K. D., CHEANG, M. C., TYLDESLEY, S., GELMON, K., NIELSEN, T. O. KENNECKE, H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. **Journal of Clinical Oncology**. v. 1, n. 10, p. 1684-91, 2010.

XU, Z., CHEN, L., GU, W., GAO, Y., LIN, L., ZHANG, Z., XI, Y., LI, Y. The performance of docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles targeted to hepatocellular carcinoma. **Biomaterials**. v. 30, n. 2, p. 226-32, 2009.

WANG, H., LI, L., WANG, P., WANG, X., ZHANG, K., LIU, Q. Comparison of photodynamic treatment produced cell damage between human breast cancer cell MCF-7 and its multidrug resistance cell. **Photodiagnosis Photodyn Ther**. v.16, p. 1-8, 2016.

WANG, L., LIU, Z., LIU, D., LIU, C., JUAN, Z., ZHANG, N. Docetaxel-loaded-lipid-based-nanosuspensions (DTX-LNS): Preparation, pharmacokinetics, tissue distribution and antitumor activity, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 413, n. 1–2, p. 194–201, 2011.

*Referências*

---

WANG, T., ZHU, D., LIU, G., TAO, W., CAO, W., ZHANG, L., WANG, L., CHEN, H., MEI, L., HUANG, L., ZENG, X. DTX-loaded star-shaped TAPP-PLA-b-TPGS nanoparticles for cancer chemical and photodynamic combination therapy, **RSC Advances**. v. 5, p. 50617-50627, 2015.

WEIGEL, M. T & DOWSETT, M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: Prognosis and prediction. **Endocr Relat Cancer**. v. 23, n. 4, p. 245-62, 2010.

WHO. WHO Model List of Essential Medicines 20th List WHO Model List of Essential Medicines Explanatory notes. **World Health Organisation**, 2017.

WU, C., LAN, C., WU, K., WU, Y., JANE, W., HSIAO, M., WU, H. Hepatocellular carcinoma-targeted nanoparticles for cancer therapy, **International Journal of Oncology**, v. 52, n. 2, p. 389–401, 2018.

YAUN, Q., HAN, J., CONG, W., GE, YING., Ma, D., DAI, Z., LI, Y., BI, X. Docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles suppress breast cancer cells growth with reduced myelosuppression toxicity. **Internat J of Nanomedicine**. v. 4, n. 9, p. 4829–4846, 2014.

ZAPPONI, A. L B; MELO, E. C P. DISTRIBUIÇÃO DA MORTALIDADE POR CÂNCER DE MAMA E DE COLO DE ÚTERO SEGUNDO REGIÕES BRASILEIRAS. **Revista Enfermagem**, v. 18, n. 4, p. 628–631, 2010.

ZENG, X., ZHANG, Y., NYSTRÖM, A. M. Endocytic uptake and intracellular trafficking of bis-MPA-based hyperbranched copolymer micelles in breast cancer cells, **Biomacromolecules**. v. 13, n. 11, p. 3814-22, 2012.



*Referências*

---

ZENG, X., TAO, W., HUANG, L., TAN, C., FENG, S. Cholic acid-functionalized nanoparticles of star-shaped PLGA-vitamin E TPGS copolymer for docetaxel delivery to cervical cancer, **Biomaterials**. v. 34, n. 25, p. 6058-67, 2013.

ZHANG, P., CHEN, L., ZHANG, Z., LIN, L., LI, Y. Pharmacokinetics in rats and efficacy in murine ovarian cancer model for solid lipid nanoparticles loading docetaxel. **J Nanosci Nanotechnol**. v. 10, n. 11. p. 7541–7544, 2010.

ZHAO, X., QI, T., KONG, C., HAO, M., WANG, Y., LI, J., LIU, B., GAO, Y., JIANG, J. Photothermal exposure of polydopamine-coated branched Au–Ag nanoparticles induces cell cycle arrest, apoptosis, and autophagy in human bladder cancer cells, **International Journal of Nanomedicine**. v. 12, n. 13, p. 6413-6428, 2018.

ZHU, D., TAO, W., ZHANG, H., LIU, G., WANG, T., ZHANG, L., ZENG, X., MEI. Docetaxel (DTX) -loaded polydopamine-modified TPGS-PLA nanoparticles as a targeted drug delivery system for the treatment of liver cancer, **Acta Biomater**, v. 30, p. 144-15, 2016.