



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
CAMPUS DARCY RIBEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – IB

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA - PPGNANO**

TESE

**Combinação de paclitaxel e doxorrubicina lipossomal como estímulo
de linfócitos infiltrantes no controle da progressão da metástase de
câncer de mama murino**

Luiza Ianny de Lima

Brasília-DF

2020

LUIZA IANNY DE LIMA

Combinação de paclitaxel e doxorrubicina lipossomal como estímulo de linfócitos infiltrantes no controle da progressão da metástase de câncer de mama murino

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Doutor (a) em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. João Paulo F. Longo

Brasília-DF

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Biblioteca Central da Universidade de Brasília

CDU:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Combinação de paclitaxel e doxorrubicina lipossomal como estímulo de linfócitos infiltrantes no controle da progressão da metástase de câncer de mama murino

BANCA EXAMINADORA:

A presente Tese submetida à Comissão Examinadora abaixo foi defendida e aprovada pela banca examinadora abaixo

Brasília- (DF), 24 de abril de 2020.

João Paulo Figueiró Longo

*Membro titular interno ao programa PPGNano
Universidade de Brasília – UnB
(Presidente da banca examinadora)*

Rosangela Vieira de Andrade

*Membro Titular Externo
Universidade Católica de Brasília*

Laise Rodrigues de Andrade

*Membro titular externo ao programa
Universidade de Brasília – UnB*

Sacha Braun Chaves

*Membro titular interno ao programa PPGNano
Universidade de Brasília – UnB*

Jaqueline Rodrigues Silva

*Membro Suplente interno ao programa PPGNano
Universidade de Brasília – UnB*

PREFÁCIO

Este documento foi redigido em formato de artigo científico, sendo apresentado em forma de capítulo único.

DEDICATÓRIA

À Deus por conduzir um caminho brilhante em toda minha vida.

*Ao meu querido Pai por ter vivido o tempo certo de conduzir e apoiar minha carreira
profissional.*

AGRADECIMENTO

À Universidade de Brasília, que como Instituição de ensino, deu todo o suporte de estrutura como casa para realização da minha carreira profissional.

Ao programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia por compor quadro de professores que permitiu fornecer conhecimento suficiente para uma formação brilhante.

Ao meu querido orientador João Paulo F Longo pela confiança e ensinamento durante minha formação. Obrigada pela parceria durante esses 6 anos de trabalho. Sua educação, carisma me marcaram e me inspiram. Obrigada por abrir as portas para iniciar esse trabalho e por auxiliar diretamente em várias etapas do percurso, sempre com grande companheirismo e compreensão. Sem a sua ajuda não seria possível concluir essa jornada. Agradeço por cada conselho, por cada orientação, por cada momento agradável que foram compartilhados. Agradeço a Deus por ter me dado um orientador tão presente, tão gentil e tão humano como você é. JP, você é um exemplo de profissional e competência!

Ao professor Ricardo Bentes de Azevedo pela dedicação em formar profissionais de qualidade. Todos seus ensinamentos contribuíram para minha formação profissional.

Às Instituições de fomento como CAPES, CNPq, INCT/Nanotecnologia e FAPDF contribuição no auxílio nesse projeto.

A querida e atenciosa Monica de Oliveira e seu grupo de pesquisa UFMG, Faculdade de Farmácia. Pela ajuda no desenvolvimento desse projeto. Agradeço por toda a gentileza em todos os bons momentos de convivência e parceria. Sua contribuição foi essencial e valiosa para mim. Sem dúvida alguma, você é um grande modelo para a minha vida profissional.

Ao instituto CICBiotomaGUNE, San Sebastin-Espanha, por permitir uma experiência profissional nesse grande centro de pesquisa, em especial ao pesquisador Dr. Sergio Moya e toda sua equipe pelo auxílio com o experimento conduzido para realização da etapa do projeto.

Obrigada ao meu querido pai Vilemon (in memoria) pelo carinho e apoio. Um pai sempre presente. Aprendi muito com todas as suas loucuras. Sinto sua falta!

A minha grande mãe Alzair Lima, obrigada pelo apoio e pôr está ao meu lado sempre em todas minhas conquistas. Eu te amo!

Quero agradecer um cara bem especial, Rodrigo Alexandre que faz a cada dia minha vida ser mais completa. Obrigada pelo amor, apoio e por sonhar junto comigo nos meus projetos de vida. Tenho um orgulho imenso pelo cara que você se tornou e por conduzir tão bem nossa família. Agradeço por colocar no mundo meus queridos sobrinhos (Vilemon, Maria Lúcia e Rodrigo filho) que tornaram minha vida mais feliz.

Aos queridos Paulo e Maria da Consolação, família que acredita e sonha comigo durante toda minha trajetória profissional.

Em especial para minha querida amiga Raquel Faria, sua presença permeia cada experimento deste trabalho. Agradeço por cada momento feliz que tivemos dentro e fora do laboratório. Agradeço, enfim, por todos os ensinamentos concedidos que vão além dos muros da Universidade.

Agora um agradecimento especial a minhas queridas amigas: Catharina Borges, Ana Quitéria, Sherelyn Geus e Dálete Maia, que apoiaram e apoiam todas as minhas decisões. Que sempre me deram um abrigo e ajudaram a forma minha personalidade. Obrigada de coração pelo carinho e loucuras, anos bem vividos ao lado de vocês.

Eu não tenho ídolos.
Tenho admiração por trabalho,
dedicação e competência.

Ayrton Senna

RESUMO

Introdução: O ambiente tolerogênico imposto pela célula neoplásica é uma das estratégias adquirida para progressão do tumor. Essa condição impede que o reconhecimento de antígenos tumorais por células T citotóxicas que tem a função vigilância imunológica. Pesquisadores investem muitos esforços para compreender e contornar esse ambiente supressor, dentre esses, há uma nova visão acerca do uso dos quimioterápicos, exemplificando, como a doxorrubicina (Dox) e paclitaxel (Pacli), que podem induzir um subtipo específico de apoptose, denominado de morte celular imunogênica (MCI), desencadeando uma ativação da resposta imune através de padrões moleculares associados a dano celular (DAMP). *Objetivo:* Nesse presente trabalho avaliamos uma abordagem de quimio-imunoterapia no tratamento do câncer de mama metastático utilizando uma formulação farmacêutica que contem nanocarreadores lipossomais como veículo da combinação dos fármacos Pacli e Dox para desencadear ação contra células tumorais de mama metastáticas para região pulmonar com auxílio da ativação do sistema imune pelo aumento do infiltrado linfocítico. Além disso, avaliamos a redução da toxicidade sistêmica dos quimioterápicos carregados em nanosistema lipossomal. *Metodologia:* O nanosistema lipossomal (Lipo) foi idealizado para carrear simultaneamente, doxorrubicina e paclitaxel (Lipo-Pacli/Dox), dois quimioterápicos com farmacocinética e polaridades diferentes. Atividade antitumoral e a segurança *in vivo* foram realizados testes pré-clínicos em camundongos (Balb/c) submetidos a indução xenoenxerto com células tumorais de cancer de mama murino (4T1). O tratamento foi realizado em ciclos das dosagens da formulação Lipo-Pacli / Dox. Após período de tratamento de pré-tratamento realizamos imuno-histoquímica para analisar amostras de tecido embebidas em parafina quanto à presença de linfócitos infiltrantes de tumor CD3⁺ positivos. *Resultados:* Observamos que essa encapsulação dos quimioterápicos tem ganhos na redução da toxicidade sistêmica. É importante ressaltar que o tratamento com a combinação de Pacli / Dox coencapsulados em lipossomos aumentou a sobrevivência dos animais, sendo que este grupo de tratamento obteve 100% dos animais vivos durante período experimental (51 dias). O que não pôde ser visto com o tratamento com a combinação de Pacli / Dox na forma livre tendo uma redução de animais desse grupo restando apenas 40% até o final do período experimental. Evidência demonstrada pelo aumento significativo de linfócitos TIL presente nos locais metastáticos pulmonares. Interessante que essa infiltração linfocitária estivesse fortemente correlacionada com o comprometimento das metástases. *Conclusão:* Em conjunto, esses resultados indicam que, dentro dessa abordagem, Dox e Pacli poderiam atuar não apenas como drogas citotóxicas, mas também positivamente na modulação do sistema imunológico levando sucesso no tratamento oncológico para aplicação na clínica. Conseqüentemente, apresentando uma incidência significativamente menor de metástases na apresentação do que aqueles com baixo número de linfócitos infiltrantes de tumor.

Palavra-chave: nanomedicina, morte celular imunogênica, quimio-imuno, câncer de mama metastático, combinação doxorrubicina e paclitaxel.

ABSTRACT

Introduction: The tolerogenic environment imposed by the neoplastic cell is one of the acquired strategies for tumor progression. This condition prevents the recognition of tumor antigens by cytotoxic T cells that have the function of immune surveillance. Researchers invest a lot of efforts to understand and circumvent this suppressive environment, among them, there is a new vision about the use of chemotherapeutic drugs, exemplifying, such as doxorubicin (Dox) and paclitaxel (Pacli), which can induce a specific subtype of apoptosis, called immunogenic cell death (MCI), triggering an activation of the immune response through molecular patterns associated with cell damage (DAMP). **Objective:** In this work, we evaluated a chemo-immunotherapy approach in the treatment of metastatic breast cancer using a pharmaceutical formulation containing liposomal nanocarriers as a vehicle for combining the Pacli and Dox drugs to trigger action against metastatic breast tumor cells for the lung region with the aid of activation of the immune system by increasing the lymphocytic infiltrate. In addition, we evaluated the reduction in systemic toxicity of chemotherapeutic drugs carried on liposomal nanosystems. **Methodology:** The liposomal nanosystem (Lipo) was designed to carry, simultaneously, doxorubicin and paclitaxel (Lipo-Pacli / Dox), two chemotherapeutic drugs with different pharmacokinetics and polarities. Antitumor activity and in vivo safety, preclinical tests were performed on mice (Balb / c) subjected to xenograft induction with murine breast cancer tumor cells (4T1). The treatment was performed in cycles of dosages of the formulation Lipo-Pacli / Dox. After the pretreatment treatment period, we performed immunohistochemistry to analyze tissue samples embedded in paraffin for the presence of infiltrating lymphocytes of CD3⁺ tumor. **Results:** We observed that this encapsulation of chemotherapeutic drugs has gained in reducing systemic toxicity. It is important to highlight that the treatment with the combination of Pacli / Dox coencapsulated in liposomes increased the animals' survival, and this treatment group obtained 100% of the live animals during the experimental period (51 days). What could not be seen with the treatment with the combination of Pacli / Dox in the free form having a reduction of animals of this group remaining only 40% until the end of the experimental period? Evidence demonstrated by the significant increase in TIL lymphocytes present in the metastatic lung sites. It is interesting that this lymphocytic infiltration was strongly correlated with the impairment of metastases. **Conclusion:** Together, these results indicate that, within this approach, Dox and Pacli could act not only as cytotoxic drugs, but also positively in modulating the immune system leading to successful oncological treatment for application in the clinic. Consequently, presenting a significantly lower incidence of metastases at presentation than those with a low number of tumor-infiltrating lymphocytes.

Keyword: Nanomedicine, immunogenic cell death, chemo-immuno, metastatic breast cancer, combination of paclitaxel and doxorubicin.

LISTA DE FIGURAS

Lista de figuras da tese

<i>Figura 1. Esquema delineamento experimental da tese.....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 2 Esquema de desenvolvimento do estudo in vivo utilizando camundongos fêmeas da linhagem Balb/c.....</i>	<i>33</i>
<i>Figura 3 In vivo imageamento camundongos Balb / C.....</i>	<i>35</i>

Lista de figuras do capítulo único (artigo científico)

<i>Figure 1. In vivo experiments design and experimental data end points</i>	<i>46</i>
<i>Figure 2. Detection of calreticulin in the membrane of 4T1L cells</i>	<i>50</i>
<i>Figure 3. Liposome nanocarrier encapsulating of paclitaxel and doxorubicin</i>	<i>51</i>
<i>Figure 4. Biodistribution by in vivo imaging of the liposomal nanocarrier Lipo</i>	<i>53</i>
<i>Figure 5. Co-encapsulated paclitaxel and doxorubicin delivery improve drug safety</i>	<i>54</i>
<i>Figure 6. Effective tumor growth control and metastasis inhibition</i>	<i>57</i>
<i>Figure 7. Evaluation of pulmonary metastasis</i>	<i>59</i>
<i>Figure 8. Immunological phenotyping to demonstrate the effect of Lipo-Pacl/Dox treatment on the activation of lymphocytes in the lung region</i>	<i>60</i>

LISTA DE ABREVIACOES

4T1L	células de carcinoma mamário murino transformadas com Luciferase (ATCC [®] <i>breast cancer cell line</i>)
DMEM	meio de cultura de células (do ingls <i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>)
Lipo-DiR	lipossoma marcado por molécula fluorescente xenolight DiR
Lipo	nanocarreador lipossomal
Dox	doxorubicina
Pacli	paclitaxel
MCI	morte celular imunogênica
TILs	linfócitos infiltrantes de tumor (do ingls <i>tumor-infiltrating cytotoxic T cells</i>)
CTL	linfócito T citotóxico (do inglês <i>cytotoxic T lymphocytes</i>)
CD3 ⁺	marcao imunohistoquímica de linfócitos ativos
DAMP	padrão molecular associado a dano
CRT	calreticulina
CTLA-4	Proteína T-linfócito associado citotóxico 4 (do inglês <i>cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4</i>)
VEGF	Fator de crescimento epidermal vascular (do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i>)
TGF- b	Fator de transformao do crescimento (do inglês <i>transforming growth factor beta</i>)
PD-1	Proteína de morte celular programa 1 (do inglês <i>programmed cell death protein 1</i>)
nm	nanmetro
MET	Microscopia Eletrnica de Transmissão
μ l	microlitros
μ g	microgramas
μ M	micromolar

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
Lista de figuras da tese	11
Lista de figuras capítulo único (artigo)	11
LISTA DE ABREVIACÕES	12
1. REFERENCIAL TEÓRICO	14
1.1.Câncer e sua relação com sistema imune	14
1.2.Câncer de mama e células infiltrantes de tumor (TILs)	16
1.3.Abordagem dos quimioterápicos como ativadores do sistema imunológico	18
1.1.Efeitos adversos típicos dos quimioterápicos (Dox e Pacli)	20
1.2.Abordagem da nanomedicina como instrumento de entrega de fármacos	22
2. JUSTIFICATIVA.....	26
3. OBJETIVOS	28
3.1.Objetivo geral.....	28
3.2.Objetivo específico.....	28
4. METODOLOGIA	29
4.1 Delineamento	29
4.2. Obtenção e manutenção da linhagem celular de adenocarcinoma mamário murino – 4T129	
4.3. Confirmação de morte celular imunogênica (MCI) in vitro através da detecção da calreticulina (CRT).....	30
4.4. Obtenção e caracterização do nanocarreador lipossomal	31
4.5. Experimentação com animal	32
4.6. Modelo pré-clínico do cancer de mama metastático	33
4.7. Biodistribuição do nanocarreador lipossomal pela técnica de imageamento in vivo	33
4.8. Tratamento utilizando a quimioterapia com a combinação dos fármacos Pacli e Dox lipossomal contra câncer de mama metastático	35
4.9. Avaliação antitumoral	36
4.10. Avaliação antitumoral e antimetastática pela técnica de imageamento in vivo	36

4.11. Avaliação do volume alveolar por microtomografia computadorizada – CT	37
4.12. Avaliação da segurança e toxicidade sistêmica secundária.....	37
4.13. Imunohistoquímica para identificação de células CD3 ⁺	38
4.14. Hematopoiese extramedular no fígado.....	39
4.15. Método estatístico	39
5. CAPÍTULO ÚNICO (artigo científico)	40
6. CONCLUSÕES GERAIS	69
7. ANEXO 1. CERTIFICADO COMITÉ DE ETICA	70
8. HISTÓRICO CIENTÍFICO	71
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. *Câncer e sua relação com sistema imune*

Resumidamente, o sistema imune inato é composto pelas células que realizam a fagocitose como, monócitos, macrófagos e neutrófilos. Essa ação ocorre quando essas células englobam o patógeno, que é destruído no interior dos lisossomos (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Vale ressaltar que este tipo de defesa não são específicos e não têm memória. Já o sistema imune adaptativo é altamente específico para o agente infeccioso, memorizando-o e tornando-o cada vez mais eficiente a cada encontro com o patógeno. As células mais atuantes são os linfócitos que reconhecem especificamente o agente infeccioso tanto no interior das células como nos tecidos. Eles podem ser agrupados em duas categorias: os linfócitos T (células T) e os linfócitos B (células B) (DUNN et al., 2002).

Elementos da imunidade inata e adaptativa contribui na montagem da resposta imune contra tumores. Inicialmente o reconhecimento das células tumorais pelo sistema imune se dar através de antígenos tumor específico que são expressos exclusivamente pelas células tumorais ou antígenos associados a tumor, que são marcadores encontrados também em células normais, porém, nas células tumorais é quantitativamente maior (HANAHAN; WEINBERG, 2011). O sistema imune pode atuar como um duplo papel em relação as células neoplásicas. No qual o sistema imune pode suprimir e/ ou promover o desenvolvimento do câncer (TENG et al., 2015).

Do ponto de vista da promoção do crescimento do tumor as células neoplásicas têm a capacidade de adquirir mecanismos de escape a vigilância imunológica (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Seja, estimulando as células imune por meio de regulação

negativa, perda de antígenos tumorais e/ ou reduzindo moléculas apresentadoras de antígenos. Além de, estabelecer no microambiente tumoral células imunossupressoras que podem ser por via de produção fatores metabólicos e citocinas (exemplo, VEGF, TGF- β), indução de resistência imune adaptativa através receptores inibitórios (exemplo, CTLA-4, PD-1), indução e/ ou recrutamento de células T regulatória (Treg) e células supressoras derivadas de mielóide (do inglês: *myeloid-derived suppressor cells* - MDCs) que desempenham funções diversos e críticas na promoção de ambiente pró-tumoral (DENARDO; COUSSENS, 2007; TENG et al., 2015).

Um dos pontos principais da resposta imunitária ao câncer é que as células neoplásicas expressam antígenos que podem ser reconhecidos pela classe de células apresentadoras de antígenos (exemplo, dendrítica, macrófagos), consequentemente ativam as células que são defesa do organismo, como as células infiltrantes de tumor (do inglês *tumor-infiltrating lymphocytes* - TILs), marcadamente pelas células T citotóxicas (KRYSKO et al., 2012; SAVAS et al., 2016; HASHEMI et al., 2020). Os subconjuntos de TILs são reconhecidos por biomarcadores específicos expressos na superfície celular, CD3, uma proteína receptora das células T que após o reconhecimento de antígenos são ativadas (CD3⁺) (RYAN, 2010). Já o CD8, que é um co-receptor do receptor de células T, é expresso nos linfócitos T citotóxicos (CTL). As variações da quantidade dos subconjuntos dos TILs depende do tipo de tumor e sua ativação (SHURIN et al., 2013).

De fato, os TILs têm uma variação quanto aos níveis encontrados em diferentes tipos tumorais, várias observações pertinentes devem ser consideradas em relação as células neoplásicas e o tumor, como: tipo celular, a origem do tumor, localização, densidade e orientação funcional das células hematopoiéticas infiltração linfocítica está

associada a um bom resultado clínico em muitos tipos diferentes de tumores (TENG et al., 2015). Relatos que uma forte infiltração linfocítica está associada a um bom resultado clínico em muitos tipos diferentes de tumores (FRIDMAN et al., 2012), como exemplo câncer de mama, que é visto a presença de células imune organizadas e a geração de células B de memória dentro do tumor (SAVAS et al., 2016), altas densidades de TILs (CD3+), células T citotóxicas (CD8+) e CD45 (em todas as células hematopoiéticas diferenciadas, exceto eritrócitos e células plasmáticas), que estavam claramente associadas a uma sobrevida livre de doença mais longa (após ressecção cirúrgica do tumor primário) e/ ou sobrevida global (TENG et al., 2015).

1.2. Câncer de mama e células infiltrantes de tumor (TILs)

Um dos tipos de cânceres mais recorrentes em mulheres é o câncer de mama e se diferem dependendo da origem na mama, como carcinoma ductal *in situ* e invasivo. Depois da biópsia é possível definir qual tipo de celular expressão dos receptores hormonais [receptores de estrogênio (RE) e receptores de progesterona (RP)] e a superexpressão ou amplificação do fator de crescimento humano epidérmico receptor-2 (HER2). Como também não podem expressar esses tipos de receptores e são chamados de mama triplo negativo (do inglês *triple negative breast cancer* - TNBC) (ACS,2020), apresentam maior risco de recorrência no período de três anos e maiores taxas de mortalidade em cinco anos, quando comparados aos outros subgrupos (INCA, 2014).

No tecido mamário canceroso, principalmente no estroma adjacente, do ponto de vista imunológico pode ser visto uma quantidade elevada de infiltrados de células imunes, o que não são normalmente encontrados em mama sadia (Loi S, Drubay D, Adams S *et al*, 2019). Os TILs, do tipo Treg e T auxiliadora, são mais comumente encontrados nos cânceres de mama o que foi relatado em um estudo abrangente com

mulheres com câncer de mama positiva para linfonodos, foram vistos porcentagem TILs diferenciada para cada tipo de células de câncer de mama (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). As células do sistema imune, linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (CTLs) e células natural killer (NK), desempenham um papel crítico na restrição do desenvolvimento do tumor (Dunn and Schreiber, 2004). Entretanto, ação desses programas antitumorais possa ser barrados por outros subconjuntos de leucócitos que, em vez disso, promovem o desenvolvimento do tumor de mama, exemplo, tais como os linfócitos Treg. Que regulam negativamente todas as outras células do sistema, incluindo as apresentadoras de antígenos e as células linfocíticas com atividade citotóxica (Loi S, Drubay D, Adams S *et al*, 2019).

Como exemplo clínico, Savas e colaboradores (2016), mostraram que pacientes com diferentes tipos de câncer de mama apresentam uma correlação positiva entre a intensidade do infiltrado de linfócitos ativados e uma resposta terapêutica mais eficaz (SAVAS *et al.*, 2016). Portanto, o aumento na quantidade de células linfocíticas ativadas é um sinal de que o sistema imunológico possa estar atuando contra a proliferação das células tumorais (SAVAS *et al.*, 2016).

Em boa parte dos estudos correção do sistema imune e câncer é relatado no ambiente do tumor primário, normalmente pela facilidade de observação principalmente nos processos de cirurgia e biopsias (KROEMER *et al.*, 2013; SAVAS *et al.*, 2016). Quando se observa uma reação imune do paciente é visto uma diminuição da disseminação da metástase. Porém, quando as células tumorais estão estabelecidas em órgãos distantes, conseqüentemente teve o escape à vigilância imunológica, ainda não se tem uma resposta sobre atuação do sistema imune nessas regiões metastáticas. Acerca deste questionamento, alguns estudos começaram a investigação em regiões de

metástases, através de amostragens de locais metastáticos submetidos a cirurgia por razões curativas ou paliativas (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Como alternativas para reverter o ambiente tumoral tolerogênico, no trabalho de Obeid *et al.* 2007, relatou que diferentes tipos de quimioterápicos fármacos, incluindo a doxorubicina (Dox), podem induzir um subtipo específico de apoptose, denominado morte celular imunogênica (ICD), que pode desencadear uma resposta imunológica contra células tumorais.

1.3. Abordagem dos quimioterápicos como ativadores do sistema imunológico

Nas últimas décadas, foi identificado na literatura que alguns quimioterápicos, tais como a Dox, Pacli, apresentam algumas propriedades diferentes daquelas clássicas relacionadas a atividade citotóxica e imunossupressora. Entre estas, foi descrito que estes fármacos são capazes de induzir um tipo especial de morte celular programada, ou apoptose, que ativa o sistema imunológico. Esta forma especial de apoptose foi denominada de morte celular imunogênica (MCI), que se caracteriza pela expressão de alguns elementos imunoadjuvantes com capacidade de criar um ambiente de maior imunovigilância, auxiliando na erradicação das células tumorais (KROEMER *et al.*, 2013; POL *et al.*, 2015).

A atuação dos quimioterápicos nas células tumorais podem causar uma desorganização celular, principalmente na organela do reticulo endoplasmático (RE). Dentro do RE existem várias proteínas específicas que auxiliam no dobramento de novas proteínas, como por exemplo a calreticulina (CRT), GRP78/BiP e GRP94. Entretanto, quando RE sofre um estresse contínuo o principal evento é a translocação dessas proteínas para citosol e, em seguida, são expostas na membrana plasmática da

célula. E é por meio desta exposição que essas proteínas mudam de função, sendo denominadas agora de padrões moleculares associados a dano (DAMP) (Krysko *et al*, 2012).

E é nesse sentido que muitas pesquisas têm sido voltadas para o retículo endoplasmático, buscando meios de atingir a organela e, com isso, ativar o mecanismo de regulação da emissão de DAMP, bem como da atuação destes na MCI. De acordo com Garg e Agostinis (2014), a resposta antitumoral exercida pela De acordo com Koberlik *et al.* (2015), a emissão dos DAMPs os tornam imunomoduladores potentes em células em processo de estresse, dano ou morte (LI; LEE, 2006).

Lembrando que essa proteína está sempre presente no retículo endoplasmático normal, no entanto, o estresse dessa organela leva a translocação da CRT (OBEID *et al.*, 2007). Sendo vista neste momento como um leva à translocação da CRT, que passa a ser denominada de padrão molecular associado a dano (DAMP) um sinal imunogênico (GARG *et al.*, 2014). Os pesquisadores começaram uma intensiva investigação para entender como os quimioterápicos podem atuar no sistema imune, levando uma melhora na terapia contra o câncer. No trabalho de Obeid e coautores (2007), os autores descreveram que que a Dox, são capazes de induzir a MCI. Após a exposição da Dox as células tumorais (carcinoma de cólon murino-CT26) foi visto um aumento da translocação da CRT para superfície células neoplásicas que lançam um "sinal do tipo reconheça-me", que atrai a resposta imune contra estas células. Esse sinal fornece estímulo adicional para a maturação células dendríticas e a capacidade ativada da imunogenicidade (OBEID *et al.*, 2007).

A partir desses achados, Lu e coautores (2018) demonstraram uma abordagem quimio-imunoterápica contra o câncer de mama metastático. A aplicação terapêutica

envolve a coentrega de Dox e de um bloqueador ponto de verificação imune (IDO-1) associados em lipossomas. Como resultado, foi visto um aumento de linfócitos infiltrantes no microambiente tumoral e metástases distantes, correlacionando esse infiltrado linfocítico com a indução de MCI. Nesse mesmo trabalho, além de Dox, o Pacli também foi apresentado como um quimioterápico citotóxico convencional pode funcionar como forte indutor de MCI (LU et al., 2018).

1.1. Efeitos adversos típicos dos quimioterápicos (Dox e Pacli)

A quimioterapia antineoplásica tem sido uma das principais modalidades de tratamento no controle e cura do câncer em geral (MUSS, 2014). O sucesso da quimioterapia para muitas neoplasias se deve a utilização de fármacos, em que as células estão em processo de divisão ativa, esses fármacos interferindo principalmente na inibição da proliferação celular, consequentemente levando a morte destas células proliferativas (SWANSON; LIN, 1994; BISHOP; WEINBERG, 1996; MUSS, 2014).

A terapia com quimioterápicos é realizada por dosagens pela via sistêmica, durante ciclos estabelecidos através dos aspectos farmacológicos e cinéticos de cada fármaco (GALLUZZI et al., 2015). Entretanto, é observado que a utilização desses fármacos pode acarretar em toxicidade sistêmica elevada devido a biodistribuição destas moléculas para tecidos não alvo (MUSS, 2014). Na maioria das vezes provoca uma série de consequências físicas, emocionais e sociais, sendo essas mudanças requerem atenção. Falando em efeitos adversos os principais associados aos quimioterápicos como: vômito, náuseas, perda de apetite, cansaço, toxicidade em outros tecidos (BATIST et al., 2006; BINES et al., 2014). Além de, efeitos sistêmicos lesões às células precursoras hematopoiéticas e células epiteliais da mucosa gastrointestinal, devido à

característica proliferativa destes tecidos (LONGO et al., 2016; DOS SANTOS CÂMARA et al., 2017).

Por exemplo, a doxorrubicina (Dox), é um fármaco pertencente à família das antraciclinas, utilizada nos tratamentos oncológicos desde a década de 1960, sendo gerador de radicais livres (SINHA et al., 1987) e estresse oxidativo (SINGAL; ILISKOVIC, 1998). Ademais, a Dox tem a capacidade de se associar com a enzima DNA topoisomerase, comprometendo o seu funcionamento normal, levando a morte das células alvo (PORUMB; PETRESCU, 1986; LEHMANN et al., 2003). Apesar de ser efetiva no tratamento e controle de alguns tipos tumorais, este fármaco causa efeitos drásticos nas células do miocárdio do paciente (BATIST et al., 2006) podendo gerar também toxicidades na medula óssea e no fígado (WU et al., 2016).

Outro exemplo, o fármaco paclitaxel (Pacli) é usado protocolos terapêuticos como fármaco de segunda linha para o tratamento do câncer de mama, sendo este um forte inibidor mitótico, impedindo a reorganização normal da rede de microtúbulos das células (HORWITZ, 1994). Porém, pode causar efeitos tóxicos como: neuropatia periférica (grande limitador da dose desse fármaco) (PACE et al., 1997), mielossupressão e neutropenia (PACE et al., 1997; KAELIN, 2005).

Ambos os fármacos, Pacli e Dox, levam a preocupações quanto a sua utilização, devido a elevadas toxicidades sistêmica. Além disso, cada vez mais mulheres apresentam câncer de mama metastático refratário relacionado ao tratamento com esses fármacos (DEAN-COLOMB; ESTEVA, 2008). Ou seja, são relatados tipos de resistências tumorais ao uso destes compostos. O uso personalizado de agentes citotóxicos específicos para a quimioterapia do câncer de mama metastático continua sendo um desafio clínico, a decisão de administrar antraciclinas (como a Dox) e taxanos

(como o Pacli) nesses locais é atualmente baseada em características biológicas e clínicas associadas aos riscos de recorrência (BINES et al., 2014).

A quimioterapia com a combinação com dois ou mais fármacos é visto na clínica como uma estratégia para atingir diferentes sítios celulares alvo (VALERO; PEREZ; DIERAS, 2001). Regimes de tratamento utilizando combinação de quimioterápicos proporciona uma melhora na resposta na morte de células tumorais, dentro da faixa de toxicidade tolerada pelo paciente para cada fármaco, oferecendo uma ampla gama de ações nas diferentes populações celulares existentes no tumor (BINES et al., 2014; TAN et al., 2017).

Além disso, esta estratégia combinatória, objetiva impedir ou retardar o desenvolvimento de novas subpopulações tumorais e muitas vezes resistentes a estes compostos. Apesar destas vantagens, um dos riscos desta combinação é o aumento do nível de toxicidade, pode ser um efeito aditivo ou sinérgicos dos fármacos que pode culminar na interrupção do tratamento oncológico. Para evitar, ou mesmo minimizar este risco, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado a associar estes fármacos a sistemas nanocarreadores para otimizar a farmacodinâmica dos compostos carregados (TELES; MORALLES; COMINETTI, 2018; FRANCO et al., 2019; FRANCO; ROQUE; OLIVEIRA, 2019).

1.2. Abordagem da nanomedicina como instrumento de entrega de fármacos

Novas propriedades adquiridas dos materiais para a nanoescala tornaram o uso de nanomateriais cada vez mais popular na indústria farmacêutica e de saúde. A utilização de nanocarreadores de fármacos na área oncológica se justifica para corrigir alguns obstáculos de ordem farmacológica. Entre os principais, podemos citar: baixa

solubilidade de fármacos; meia-vida plasmática curta; alta toxicidade inespecífica; além do fato de que alguns fármacos são suscetíveis ao ataque enzimático etc. (JAIN; STYLIANOPOULOS, 2010; WOLFRAM; FERRARI, 2019).

Dentre os sistemas nanoestruturados utilizados em nanomedicina (Germain *et al.*, 2020), os lipossomas são os mais comuns nos medicamentos nanotecnológicos aprovados para uso clínico. Os lipossomas têm sido intensamente estudados no âmbito industrial e por pesquisadores desde sua descoberta na década de 1960 (BANGHAM; STANDISH; WATKINS, 1965). Conceitualmente, os lipossomas são vesículas lipídicas que tem na sua estrutura básica bicamadas compostas por fosfolipídios e um núcleo aquoso que se formam espontaneamente (DESHPANDE *et al.*, 2018).

Lipossoma é um tipo de nanocarreador que tem a capacidade de incorporar moléculas com diferentes polaridades e tamanhos, sendo que o destino dessas moléculas *in vivo* modulado por estes nanocarreadores (KLIBANOV *et al.*, 1990). O Doxil® (Janssen Biotech, Inc.- EUA) foi a primeira formulação medicamentosa desenvolvida com lipossomos nanométricos e aprovada para uso em 1995 pelo Food and Drug Administration (FDA) para tratamento de vários tipos de cânceres. A base desse medicamento é uma formulação composta por lipossomos que carregam a Dox. A composição lipídica é composta por fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), colesterol (CHOL) e 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[poli (etileno glicol)2000 (DSPE-PEG 2000). Essa formulação trouxe ganhos para a clínica médica, uma vez que aumentou o tempo de meia vida da Dox por apresentar diminuição na incidência de efeitos adversos, em especial os efeitos cardiotoxicos relacionados à Dox (ZHAO *et al.*, 2013).

Outra vantagem dos lipossomos é a capacidade de co-administrar combinações de medicamentos para melhorar a eficácia do tratamento. Outro exemplo, o medicamento Myocet[®] entra no mercado como uma formulação lipossomal que tem como princípios ativos a Dox e ciclofosfamida, sendo indicado para o tratamento de primeira linha do câncer de mama metastático, sendo também aplicado no tratamento de patologias autoimunes, ajudando o sistema imunológico no reconhecimento das células tumorais (MU; SPRANDO, 2010).

O medicamento clínico comercializado como Vyxeos[®], carrega uma combinação de quimioterápicos, citarabina e daunorrubicina (razão molar 5:1, respectivamente). Sua aplicação clínica é voltada para o tratamento de leucemia mieloide aguda (LMA) de alto risco. Sua ação terapêutica exibe aumento da atividade sinérgica tanto em culturas de células quanto em estudos com animais. Outro dado importante do Vyxeos está relacionado com sobrevida global, sendo relatado um aumento de 9,56 meses em comparação com 5,95 meses em pacientes tratados com uma combinação de citarabina livre e daunorrubicina (tratamento padrão) (PREMIUM, ; FADERL et al., 2019).

Em termos de experimentação pré-clínica, FRANCO e coautores (2019), relatou estudo utilizando camundongos Balb/c portadores de carcinoma mamário murino (4T1), DESCRIVER O NANOSISTEMA no qual demonstra que a adição de pequenas quantidades do fármaco Pacli combinado com Dox (proporção molar 1:10, respectivamente) é o suficiente para uma resposta na atividade do tratamento, comparando a forma livre de ambos os fármacos. Além disso, uma resposta interessante foi a diminuição da toxicidade cardíaca em comparação ao tratamento com a combinação livre do composto (FRANCO et al., 2019). Essa formulação serviu como base para presente trabalho.

Seguindo essa estratégia, consideramos como objetivo central desta Tese, a investigação da combinação de Pacli e Dox lipossomal para tratar câncer de mama metastático em modelo de camundongos (Balb/c), com o objetivo de avaliar capacidade de ativação da MCI por estes fármacos. Nesse sentido, a ideia é reverter parcialmente o ambiente metastático tolerogênico, pelo aumento do infiltrado linfocítico nas locais metástases pulmonares. Além disso, também observamos a capacidade do carreador lipossomal em reduzir os efeitos adversos típicos dos quimioterápicos Pacli e Dox no manejo de tumores de mama metastáticos.

2. JUSTIFICATIVA

Os quimioterápicos são indiscutivelmente excelentes agentes citotóxicos. Além disso, uma nova visão surgiu para esses compostos como indutores de MCI, criando uma propriedade adicional, alternativa a atividade citotóxica clássica. Esta ação da ativação do sistema imunológico auxilia na reversão do quadro tolerogênico encontrado em boa parte dos tumores, em especial nas regiões metastáticas (OBEID et al., 2007). Porém, a toxicidade sistêmica, relacionada a estes fármacos, ainda é reconhecida como um fator preocupante dessa terapia (BERNABEU et al., 2014).

Esforços para contornar essa problemática da quimioterapia fazem parte dos objetivos da nanomedicina, que é definida como uma área da ciência dedicada ao uso de nanocarreadores para aplicações biomédicas. Atualmente o emprego dessas nanoestruturas é aplicada para o diagnóstico e terapia oncológica (WOLFRAM; FERRARI, 2019). Os primeiros produtos de relevância no mercado são as formulações de Doxil[®] e Myocet[®] utilizando a tecnologia de produção de nanoestruturas lipossomais para entrega de fármacos em tratamentos oncológicos (BARENHOLZ, 2012; LUO et al., 2017).

O sucesso da aplicação dessas nanoestruturas foi baseado no princípio do Efeito de Permeabilidade e Retenção Aprimorada (EPR), onde os nanossistemas se acumulam passivamente em tecidos tumorais de modelos pré-clínicos (IYER et al., 2006). Entretanto, pesquisadores viram que essa teoria funcionava bem em estudos pré-clínicos (animais), porém sua aplicação é limitada a alguns tipos tumorais, quando são analisados estudos clínicos em humanos (PRABHAKAR et al., 2013). A partir disso, pesquisadores buscaram informações com intuito de reconhecer quais os aspectos ideias que norteiam a aplicação da nanomedicina na oncologia.

Com base em intensa pesquisa na literatura, pesquisadores entenderam que a abordagem da nanomedicina como tecnologia na oncologia é vista como: auxílio na liberação controlada de compostos ativos, passagem por barreiras biológicas, redução da toxicidade inespecífica (WOLFRAM; FERRARI, 2019), além de ativação do sistema imune através da MCI (OBEID et al., 2007).

Assim, desenvolvemos nossa pesquisa abordando a nanomedicina com desenvolvimento do sistema lipossomal com diferentes tipos de quimioterápicos, Pacli e Dox, como indutores de MCI no tratamento do câncer de mama metastático. A MCI foi avaliada através da correlação entre aumento do infiltrado linfocítico com controle da progressão da metástase. Também, foi avaliado se o carregamento dos quimioterápicos utilizando o sistema lipossomal reduz a toxicidade sistêmica causada pela administração de ambos os fármacos.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo geral*

Avaliar se a uma forma farmacêutica contem a combinação dos quimioterápicos paclitaxel e doxorrubicina lipossomal é capaz de aumentar o infiltrado linfocítico nas metástases pulmonares como resposta na ação antimetastática em um modelo de câncer de mama murino. Além de, avaliar possível diminuição da toxicidade sistêmica causa pelos fármacos.

3.2. *Objetivo específico*

- Avaliar a emissão de DAMP (CRT) associada a MCI pelo tratamento combinado de Pacli e Dox;
- Avaliar a redução da toxicidade sistêmica e segurança clínica durante e pós tratamento utilizando a combinação dos fármacos paclitaxel e doxorrubicina coencapsulados no sistema lipossomal;
- Avaliar a atividade antimetastática através do infiltrado linfocítico, pela marcação imohistoquímica dos linfocitos ativados (CD3⁺) na região da metástase pulmonar.

4. METODOLOGIA

4.1 Delineamento

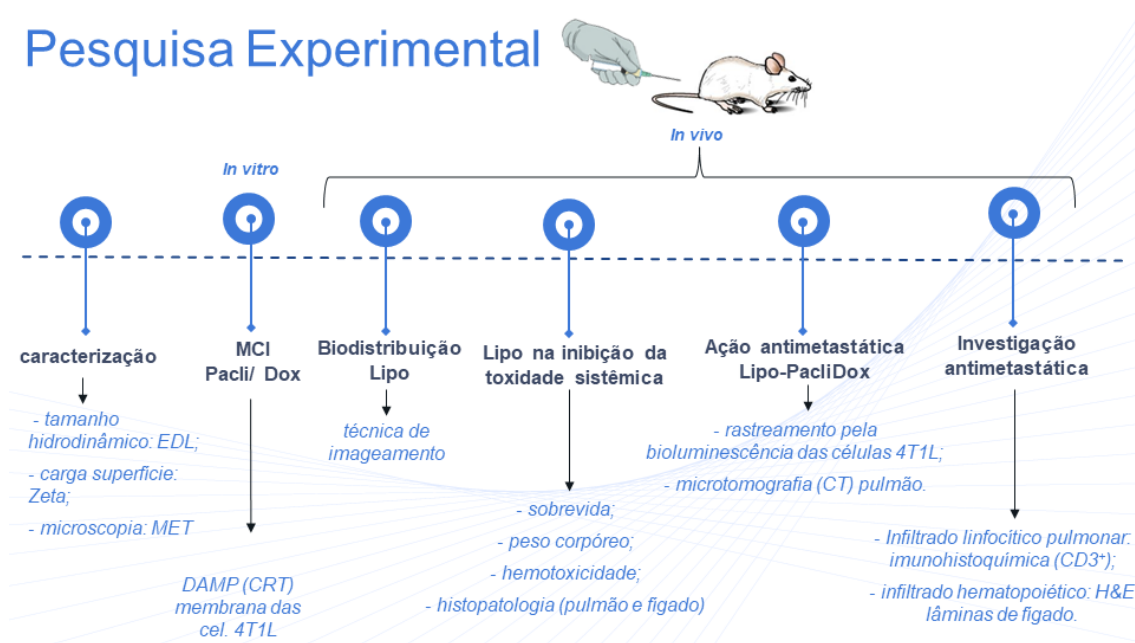


Figura 1. Esquema delineamento experimental da tese.

4.2. Obtenção e manutenção da linhagem celular de adenocarcinoma mamário murino – 4T1

Para o desenvolvimento do modelo tumoral *in vivo*, foi utilizado a linhagem celular de adenocarcinoma mamário murino 4T1 (ATCC – CRL-2539TM), estas foram modificadas segundo trabalho de CAMARA e colaboradores (2017), onde a transdução de luciferase (L) foi necessária para expressar bioluminescência na presença da luciferina no rastreamento *in vivo*. A modificação foi feita de acordo com o protocolo do fabricante com lentivírus da luciferase LentifactTM (GeneCopoeia, MD, EUA).

A linhagem celular 4T1L foi preservada em criotubo contendo meio de congelamento (5% de DMSO e 95% de soro fetal bovino - SFB), sendo devidamente

identificada e armazenada nitrogênio líquido. Alíquotas dessas suspensões celulares contendo 1×10^6 células por mL foram retiradas do tanque de nitrogênio líquido e descongeladas a 37°C . Estas células foram então cultivadas em meio de cultivo celular Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM), contendo 10 % e 1 % (v:v) de SFB e solução de antibiótico (100 unidades/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina), respectivamente, sendo mantidas em estufas a 37°C e 5 % de CO_2 até atingirem confluência de 75%, para serem utilizadas no procedimento do enxerto tumoral nos animais. Todos os reagentes para manutenção do cultivo celular foram adquiridos Gibco® Life Technologies (Carlsbad, EUA).

4.3. Confirmação de morte celular imunogênica (MCI) in vitro através da detecção da calreticulina (CRT)

A realização deste teste foi baseada no trabalho de LU e coautores (2018). Foi utilizado no total 5×10^5 de células/ poço de 4T1L em meio suplementado DMEM em uma placa de 24 poços. O meio de cultura foi reabastecido com os tratamentos Dox (5 μM), Pacli 5 μM e a combinação Pacli + Dox (5 / 5 μM , respectivamente) por 24 horas, após a exposição das células 4T1L aos tratamentos foi realizado uma lavagem das células com PBS e adicionado álcool 70% (0,5 mL) por 30 minutos. Foram utilizadas também células permeabilizadas com TritonX-100 0,1% por 15 minutos, um detergente químico que penetra nas células, a fim de avaliar a marcação interna da CRT. Após esse período as células foram fixadas e realizada a marcação imuno-histoquímica com anticorpo primário anti-CRT (ab2907, 1/75, Abcam, Cambridge, UK) incubado por 1 hora à 37°C , após esse período lavadas novamente e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG 488 (ab150077, 1/20, Abcam, Abcam, Cambridge, UK) por 30

minutos em temperatura ambiente. Toda essa etapa foi realizada ao abrigo da luz, sendo que, após esse período foi realizada a lavagem com PBS (2X).

A translocação da CRT para a superfície celular foi visualizada no microscópio de fluorescência EVOS® FLoid® (CA, USA) utilizando a objetiva (lente 40x). O núcleo das células também foi marcado utilizando o corante DAPI (Sigma-Aldrich, MO, USA) antes da visualização sob microscópio de fluorescência para melhor demarcação celular. As imagens foram tratadas utilizando os programas Photoshop CC2015 (Copyright© 2020, Adobe) e programa ImageJ-Java (National Institutes of Health, NIH – desenvolvido pelo grupo de pesquisa Research Services Branch-RSB). Os dados foram representados em gráficos utilizando o GraphPad Prism versão 7.00-Windows (GraphPad Software, La Jolla California, USA).

4.4. Obtenção e caracterização do nanocarreador lipossomal

O sistema lipossomal foi idealizado e desenvolvido pelo grupo de pesquisa da Dra. Mônica de Oliveira do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. Para produção do sistema lipossomal fusogênico de circulação prolongada (Lipo) foram utilizados os lipídios sintéticos: dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), colesterol hemisuccinato de colesterilo (CHEMS) e 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[poli (etileno glicol)2000 (DSPE₂₀₀₀-PEG), sendo a concentração lipídica total de 10 mmol L⁻¹. Durante o preparo são adicionados os fármacos Pacli e Dox molar 1:10, respectivamente. Toda forma de preparo e caracterização da suspensão coloidal dos lipossomas estão disponíveis nos trabalhos publicados pelo grupo de colaboração (FRANCO; ROQUE; OLIVEIRA, 2019; ROQUE et al., 2019) As amostras recebidas foram mantidas resfriadas (8°C geladeira) para futuras avaliações das

propriedades nanoscópicas e confirmação das características da suspensão coloidal de lipossomas.

O diâmetro das vesículas lipídicas e índice de polidispersidade (PI) foram determinadas pelo método espalhamento dinâmico da luz – EDL, utilizando equipamento Nanosizer ZS 90° (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) com ângulo de 90 graus em cubetas de poliestireno. Para a avaliação, amostras foram diluídas 10 vezes, 100 µL formulação lipossomal para 900 µL tampão solução tamponada HEPES (HBS). Os dados obtidos representam a média de três leituras de cada amostra, frequência da dispersão por intensidade de luz espalhada. O potencial Zeta (ζ) das vesículas também foi determinada pela técnica DLS associada à mobilidade eletroforética.

As características morfológicas do nanocarreador lipossômico foram avaliadas pelas imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET), obtidas através do aparelho JEM 1200EX II (Jeol, Tokyo, Japan), utilizando coloração negativa com ácido fosfotúngstico como agente de contraste. Esse teste foi realizado em colaboração com o Center for Cooperative Research in Biomaterials- CIC biomaGUNE - Soft Matter Nanotechnology Lab, Espanha-ES.

4.5. Experimentação com animal

Camundongos fêmeas Balb / c entre 6-8 semanas de vida, e aproximadamente, $24 \pm 1,6$ g, foram adquiridos do Centro de Bioterismo da Universidade Católica de Brasília – CBUCB. Os animais foram alojados em gaiolas de plástico, ambiente controlado com ciclo diário de 12 h de luz e 12 h de escuro e ventilação, livre acesso a água e alimentação. Todos os procedimentos com os animais foram realizados em

conformidade com o comitê de Ética de Pesquisa em Animais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília protocolo: UnB.DOC N° 66721/2016 (ANEXO 1).

4.6. Modelo pré-clínico do cancer de mama metastático

A realização desta etapa foi baseada no protocolo do trabalho de SOUSA (2015) e todos os testes realizados estão representados na *figura 2*.

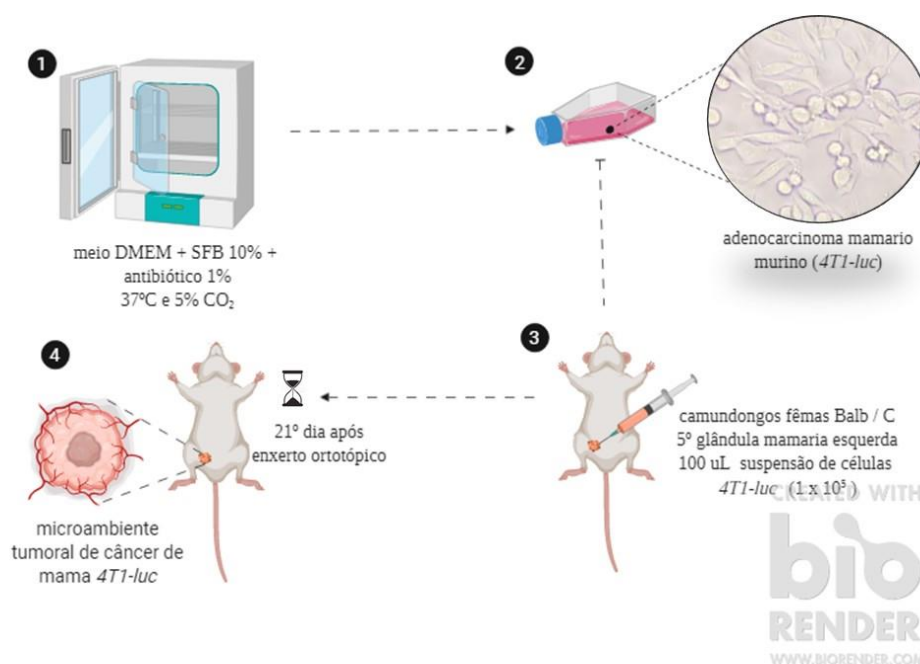


Figura 2 Esquema de desenvolvimento do estudo *in vivo* utilizando camundongos fêmeas da linhagem Balb/ c. As células foram mantidas em condições padrão até atingirem o crescimento confluência de 80%. (3) enxerto ortotópico com as células 4T1L viáveis na quinta glândula mamária direita no volume de 50µL (1x10⁵) de células por animal com PBS. (4) após 21 dias do enxerto tumoral, quando se observava macroscopicamente o tumor primário e disseminação da metástase foi iniciada experimentação.

4.7. Biodistribuição do nanocarreador lipossomal pela técnica de imageamento *in vivo*

Para a avaliação da biodistribuição *in vivo* do nanocarreador Lipo foi marcado com molécula fluorescente de cianina, sendo nome comercial xenolight DiR18 (7) 1,1'-Iodeto de dioctadecil-tetrametil indotricarbocianina. (MM: 1013,4 g) bocianina Iodeto. Para a marcação foi preparada uma diluição do corante DiR em etanol absoluto (solução de trabalho – ST), em seguida, 1% da ST acrescentada à solução de lipídios totais (10,08 mM) e 20 minutos sob agitação. O sistema marcado Lipo-DiR foi então armazenado sob refrigeração (4°C) até o procedimento experimental na *figura 3*.

Os animais foram submetidos a anestesia com isofurano 2% disperso em CO₂. O sistema Lipo-DiR foi injetado via intravenosa com volume final de 100 µL no grupo e como controle uma solução da mesma proporção do marcador DiR livre (1%) foi utilizada para comparar a biodistribuição da nanoformulação Lipo-DiR. Após a administração das soluções, os animais foram monitorados para o rastreamento do sinal da fluorescência da molécula DiR nos seguintes tempos: 0,3, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 144 e 288 horas.

As imagens foram adquiridas usando um comprimento de onda de excitação e emissão de 720 /780 nm, respectivamente. Foram utilizados os seguintes ajustes: tempo de exposição (1 s), aberturas (f/stop) 8 e binning médio 8, campo de visão (25 × 25 cm). Os dados quantitativos por eficiência da radiação totais (fótons/sec/cm²/Sr), sendo que foram escolhidas as respectivas regiões de interesse (ROI): região tumor primário, região tórax (pulmonar e coração), região das patas, região abdômen (fígado e trato gástrico) e região da cabeça. A autofluorescência e sinais de fundo indesejados foram eliminados por análise espectral e unmixing, usando os camundongos antes da aplicação da molécula DiR como controle do plano de fundo. Por fim, as imagens foram

processadas no software Living Image®, versão 4.5.2 (Caliper Life Sciences, Massachusetts, EUA).

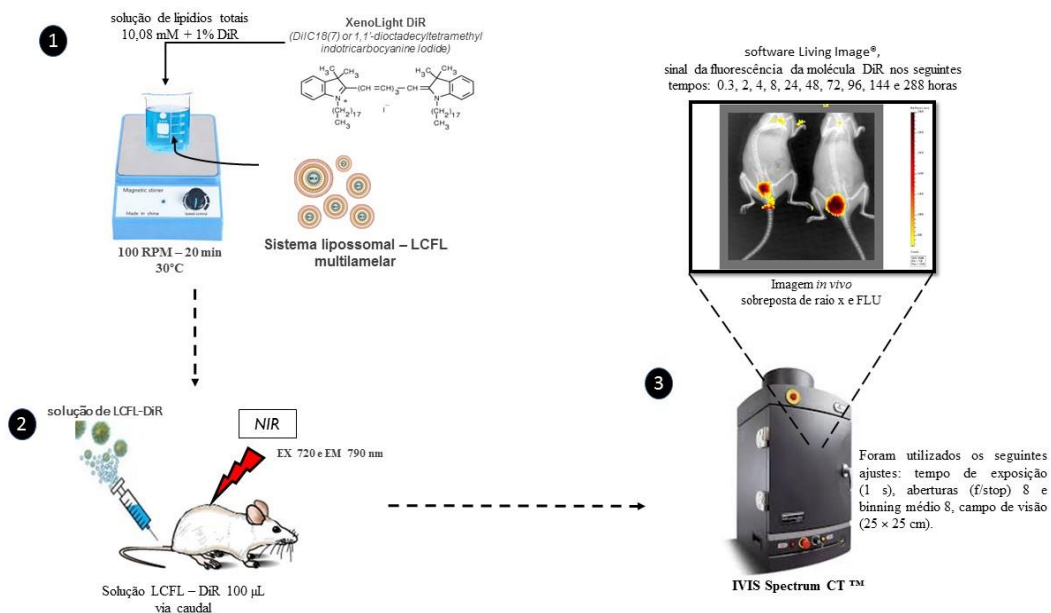


Figura 3 In vivo imageamento camundongos Balb / C. O procedimento inicial se dar pela solução de lipídios totais 10,08 mM e o acréscimo 1% da solução do marcador fluorescente DiR e incubado por 20 minutos sob agitação. Foram injetados via intravenosa 100 µL do sistema Lipo-DiR (n=4) e como controle uma solução da mesma proporção do marcador DiR livre (n=4). O sistema de imagem por fluorescência não invasiva IVIS Spectrum CT™ foi utilizado para acompanhar a progressão tumoral e metastática dos camundongos portadores câncer de mama metastático (4T1L). As imagens foram adquiridas usando filtro de excitação (720 nm) e emissão (780 nm). Autofluorescência e sinais de fundo indesejados foram eliminados por análise espectral e sem mistura, usando um camundongo controle sem tumor como pano de fundo.

4.8. Tratamento utilizando a quimioterapia com a combinação dos fármacos Pacli e Dox lipossomal contra câncer de mama metastático

Para o tratamento foi escolhida a via de administração endovenosa utilizando seringa de insulina (1 mL), o volume total administrado para todas os tratamentos (Lipo-PacliDox e Pacli/ Dox) as formulações foi de 100 µL, sendo realizados 4 ciclos

com intervalo de três dias (72 horas) entre os ciclos. Após 21º dia do enxerto com as células tumorais foi iniciado o tratamento *in vivo* com os diferentes grupos experimentais. A avaliação dos animais no período do tratamento no intervalo entre os ciclos e durante o período pós-tratamento foi avaliado semanalmente.

4.9. Avaliação antitumoral

A eficácia antitumoral foi avaliada pelo crescimento do volume tumoral (VT) com um paquímetro digital (200MM Pd 200 Vonder®). A medição foi realizada a cada três dias durante o tratamento (umas semana e dois dias) e semanalmente no período pós-tratamento (duas semanas). A equação utilizada: $VT = \frac{4\pi}{3} (D + d2 / 2)^3$, onde D (maior diâmetro do tumor) e d2 (menor profundidade do tumor) de acordo com trabalho de GANASSIN e colaboradores (2018).

4.10. Avaliação antitumoral e antimetastática pela técnica de imageamento *in vivo*

Foi utilizado a técnica de imageamento *in vivo* para rastreamento da bioluminescência das células transformadas 4T1L. As imagens não invasivas foram adquiridas após a administração via intraperitoneal de 100 µL de D-luciferina (sigma) na concentração de 150 mg/kg, mantendo os animais anestesiados com 2% isoflurano sob oxigênio e colocados na câmara de imagem. Para imagens 2D da bioluminescência feito o ajuste do filtro de emissão (modo *open*) para maximizar a sensibilidade e melhorar o limite de detecção.

Para imagem anatômica de referência, foi utilizado o raio x, permitindo a localização do sinal óptico. As imagens foram coletadas com 60 segundos de exposição, por um período de 20 minutos para detectarmos células 4T1L. O maior valor desta curva de emissão de bioluminescência foi escolhido, dados foram utilizados para

processar as imagens o programa Living Image 3.0 (Caliper Life Sciences, Alameda, CA).

4.11. Avaliação do volume alveolar por microtomografia computadorizada – CT

No período pós tratamento foi realizada avaliação da radiopacidade da região pulmonar pela CT. Os animais foram anestesiados com isoflurano (2,5%) e posicionados no aparelho Albira Si (Bruker, Billerica, EUA) para captura das imagens. Os parâmetros utilizados foram: resolução dose baixa (200 μ A), voltagem baixa (35 μ A) CT *quality (standard)*.

As imagens obtidas foram analisadas utilizando o software PMOD 3.307 (PMOD Technologies LLC, Albira software Suíte) e tratadas de acordo com a análise desejada. O perfil de radiopacidade pulmonar foi avaliado através da delimitação da região pulmonar em todos os planos da imagem utilizando a face interna da caixa torácica como referência, selecionamos a faixa da unidade Hounsfield (HU), sendo faixa de -1000 / 0 áreas saudáveis e a faixa de 1 / 500 possíveis alterações no tecido pulmonar. Os dados gerados foram do volume pulmonar em área alveolar / mm^3 .

4.12. Avaliação da segurança e toxicidade sistêmica secundária

Foram realizadas avaliações ao longo do período experimental a verificação do peso corpóreo (balança semi-analítica, OHAUS®220), taxa de sobrevivência e aspectos clínicos (pelagem dos animais, presença de reflexos e movimentação). No 51º que marca o final do período experimental antes da eutanásia foi coletado o sangue dos animais para teste de hemotoxicidade. Os animais foram mantidos sob anestesia e retirado aproximadamente 200 μ L de sangue total, transferidos para um tubo com anticoagulante EDTA (Minicollect®), centrifugado (2500 \times g) por 10 min sob temperatura 4°C. Através do

equipamento hematímetro (Sysmex, Co., Kobe, Japan) foi realizado a contagem de células totais de leucócitos (brancas), hematócrito (porcentagem de células vermelhas no sangue) e plaquetas. Os resultados foram expressos em média aritmética \pm erro padrão.

Após o fim do estudo (51º dia) os animais foram eutanasiados por superdosagem de propofol (60mg/kg) e os órgãos (pulmão, fígado e baço) foram excisados para uma avaliação macroscópica e quanto ao peso dos órgãos. O pulmão e fígado foram fixados em formalina a 10%, embebidos em parafina e cortados em seções seriadas de 4 μ m, montadas em lâminas de vidro. Realizamos a coloração com os corantes hematoxilina - eosina (H&E) para visualização das células com possíveis alterações nos tecidos. As lâminas de tecido de interesse foram digitalizadas com um scanner de lâminas microscópio EVOS® FLoid® e analisadas com o ImageJ-Java (National Institutes of Health, NIH – desenvolvido pelo grupo de pesquisa Research Services Branch-RSB).

4.13. Imunohistoquímica para identificação de células CD3⁺

Para visualizar ativação da resposta imune no infiltrado linfocitário no tecido metastático foi realizada uma análise imunohistoquímica do corte histológico de pulmão com anticorpo células CD3⁺ na membrana do LT liga ao TCR (receptor de células T) que liga ao antígeno associado a MHC da APC (leva a ativação dos linfócitos T). Os pulmões foram fixados em formalina a 10%, embebidos em parafina e cortados em seções de 4 μ m, que foram montadas em lâminas de vidro. A realização dessa etapa foi conduzida pelo Laboratório de Patologia e Prevenção de Câncer LTDA – Lâmina, conduzindo a marcação das lâminas de acordo com protocolo da empresa, anticorpo para marcação dos linfócitos T ativados (colocar como no artigo), após marcação as

lâminas foram avaliadas pelo patologista da empresa. Para a aquisição das imagens, foi utilizado um microscópio EVOS[®] FLoid[®], capturando imagens na lente 40x.

4.14. Hematopoíese extramedular no fígado

Para avaliação do infiltrado hematopoiético no fígado, esses foram fixados no mesmo protocolo descrito acima no subitem 4.12. Realizamos a coloração com os corantes hematoxilina-eosina para visualização das células linhagem mieloide. Para aquisição das imagens foi empregado utilização do microscópio EVOS[®] FLoid[®], captura das imagens na objetiva de 40x vezes.

4.15. Método estatístico

Foram testadas para distribuição normal com o teste de Shapiro-Wilk. Para resultados significativos o teste estatístico teste t e ANOVA usados para realizar as comparações entre os grupos de tratamentos. Foi considerado o valor de confiabilidade de 95%, sendo o $p < 0,05$ estatisticamente significativo. A representação gráfica dos resultados foi realizada usando o software GraphPad versão 7.0.

5. CAPÍTULO ÚNICO (*artigo científico*)

Artigo publicado na revista científica Nanomedicine

Endereço da publicação:

<https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/nnm-2020-0201>



Combined paclitaxel-doxorubicin liposomal results in positive prognosis with infiltrating lymphocytes in lung metastasis

Luiza Lanny de Lima¹, Raquel Santos Faria¹, Marina Santiago Franco² , Marjorie Coimbra Roque², Thyago Jose Arruda Pacheco¹, Mosar Correa Rodrigues¹, Luis Alexandre Muehlmann^{1,3}, Sergio Enrique Moya⁴ , Ricardo Bentes Azevedo¹ , Mônica Cristina Oliveira² & João Paulo Figueiró Longo^{*1} 

¹Department of Genetics & Morphology, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasília /DF 70910 900, Brazil

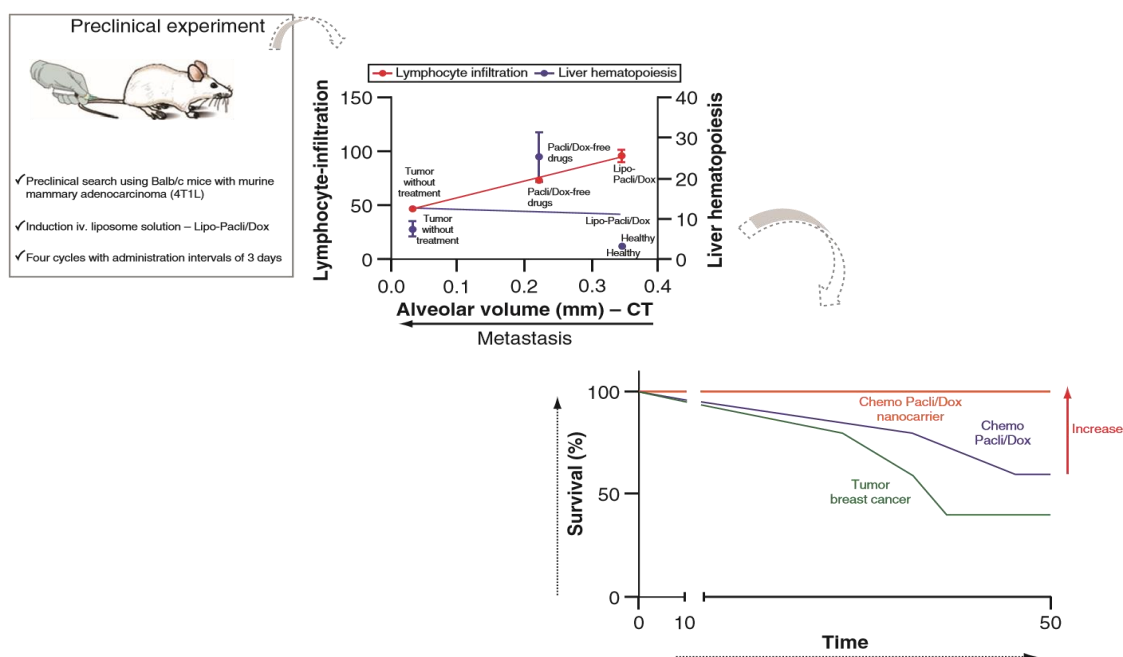
²Department of Pharmaceutical Products, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270 901, Brazil

³Laboratory of Nanoscience & Immunology, Faculty of Ceilandia, University of Brasilia, Brasília /DF 72220 900, Brazil ⁴Soft Matter Nanotechnology Group, CIC biomaGUNE, Paseo Miramón 182, 20014, Donostia-San Sebastián, Spain

*Author for correspondence: Tel.: +34 943 005 321; jplongo82@gmail.com

Aim: To investigate the effect of liposomes containing the classical cytotoxic drugs paclitaxel and doxorubicin (Lipo-Pacl/Dox), against a metastatic breast cancer model. We also investigated if Lipo-Pacl/Dox was capable of reverting the tolerogenic environment of metastatic lesions. **Materials & methods:** Immunogenic cell death induction by the Pacli/Dox combination was assessed *in vitro*. Antitumor activity and *in vivo* safety of Lipo-Pacl/Dox were evaluated using a 4T1 breast cancer mouse model. **Results:** LipoPacli/Dox, with a size of 189 nm and zeta potential of -5.01 mV, promoted immune system activation and partially controlled the progression of pulmonary metastasis. **Conclusion:** Lipo-Pacl/Dox was useful to control both primary tumor and lung metastasis in breast cancer (4T1) mice model. Additionally, LipoPacli/Dox acts as an immunological modulator for this metastatic breast cancer model.

Graphical abstract:



One of the most important events during tumorigenesis is the development of the capacity of the malignant cells to evade the immune system. Hanahan and Weinberg defined this ability as a hallmark of cancer in 2011 [1]. Since then, several papers have described the different immunological mechanisms underlying tumor evasion of the immune system [2,3]. Among the most common tumor strategies used to suppress the immune system are a reduction in antigen presentation and a reduction in tumor infiltrating lymphocytes (TILs) [4]. These conditions create a tolerogenic tumor environment, which reduces the immunological opponents that could stop tumor progression.

Researchers have invested intense efforts in understanding this condition and reversing this suppressive environment, with an aim to improve cancer therapy. Obeid et al. [5] affirmed that different types of chemotherapeutic drugs, including doxorubicin (Dox), can induce a specific subtype of apoptosis, called immunogenic cell death (ICD), which can trigger an immune response against tumor cells. The authors found a strong correlation between the presence of calreticulin (CRT), a membrane protein translocated from stressed endoplasmic reticulum, and tumor growth impairment after malignant cell transplantation to mice models. It is particularly interesting to note that this protein is constitutively present in normal endoplasmic reticulum, being translocated to the cell membrane only during ICD. The presence of calreticulin on the plasma membrane of cells acts as an 'eat-me' signal to immune cells. It thus can change the tumor profile from tolerogenic to immunogenic [6].

Based on these findings, some cytotoxic compounds can be used not only for their cytotoxic profiles but also for their ICD-inducing ability. As an example, Dox is a classical cytotoxic drug for breast cancer, and recently some authors have shown the ability of this drug to increase the availability (number) of TILs in tumors or metastatic tissues [7,8]. Furthermore, these authors showed that this lymphocyte infiltration is strongly correlated with ICD induction. Indeed, patients diagnosed with breast tumor survive longer when they have large amounts of TILs in tumors or metastatic tissues [4].

Using the idea of triggering ICD through Dox, Lu and co-authors [9] developed a liposomal nanocarrier to deliver Dox and indoximod, which inhibits the IDO-1 pathway, intravenously to the tumor and metastatic tissues, as ICD inducers. The treatment resulted in ICD induction and positive immunological modulation, decreasing tumor proliferation and gaining control of metastasis proliferation. Additionally,

the authors showed that besides Dox, paclitaxel (Pacli), another conventional cytotoxic chemotherapeutical drug, also works as an ICD inducer.

Following this strategy, our research group has developed nano-carriers for the co-encapsulation of different chemotherapeutical drugs, especially Pacli and Dox [10,11]. In this article, a nano-sized liposome carrying Pacli and Dox (Lipo-Pacli/Dox) has been used to treat a strongly tolerogenic and metastatic breast cancer in an orthotopic 4T1-breast cancer mice model [10,11]. We used two ICD inducers, Dox and Pacli, in the same liposome nano-carrier to boost the control of metastasis as well as of primary tumor growth. Our aim here is to investigate, if Lipo-Pacli/Dox is capable of partially reversing the tolerogenic environment of a highly metastatic 4T1-breast cancer mouse model.

One important novelty of this article was to use two classical cytotoxic drugs, Pacli and Dox, as ICD inducers. To our knowledge, this approach has not been used in the literature and aims to use these drugs not only as cytotoxic agents but as inducers of an immunological response that could improve the overall response against tumor progression. This approach aims to modify the cytotoxic approach to an innovative, immunogenic approach, which could be significantly more effective in eliminating the primary tumors and occasional metastatic foci.

Materials & methods

Obtaining & maintaining 4T1L cell cultures

Immortalized 4T1 cells from a murine mammary adenocarcinoma (ATCC – CRL-2539™) were modified to express firefly luciferase (L) as described by dos Santos Câmara et al. [12]. The 4T1 cell line expressing L (4T1L) was cultured in DMEM containing 10 and 1% (v: v) fetal bovine serum (FBS; Life Technologies, CA, USA™) and antibiotic solution (100 unit's /ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin), respectively. Cells were maintained at 37°C and 5% CO₂ and trypsinized with 0.125% trypsin.

In vitro ICD induction

The experimental procedure for ICD induction was based on that of Lu et al. [9]. 4T1L cells were treated for 24 h, with free Dox (5 µM), free Pacli (5 µM), combined Pacli/Dox (5/5 µM), used as ICD inducers. Docetaxel (DTX) (5 µM), used as inducer drug control.

Two experimental controls were used for this *in vitro* experiment. For the first control, cells were stressed with hydrogen peroxide (9 mM for 30 min), and permeabilized with Triton ×100 (0.1%) for 15 min, so that the detection of CRT could be carried out in the endoplasmic reticulum, where this molecule is expressed in normal situations. Triton ×100 (0.1%) was used for 15 min to permeabilize the cells to anti-CRT antibodies to access internal cell regions. The second control was prepared with 4T1L cells treated with phosphate-buffered saline (PBS). After treatments, the cells were washed twice with PBS and fixed with 70% ethanol for 30 min. At the end of the fixation time, cells were exposed to primary anti-CRT antibodies (ab2907, 1/75; Abcam, Cambridge, UK) for 1 h in an incubator at 37° C. The respective primary antibodies and the secondary anti-IgG 488 antibody (ab150077, 1/20, Abcam) were added for 30 min at room temperature. This entire step was performed in the dark. After 30 min, cells were washed twice with PBS. An EVOSR FLoidR (CA, USA) microscope was used to visualize CRT translocation to the cell surface, (40 × objective lens). We also stained the cell nucleus with DAPI (Sigma-Aldrich, MO, USA) before visualization under a fluorescent microscope for better cell demarcation. The images obtained were treated using Photoshop CC2015 (Adobe) and image processing software ImageJ (NIH). Data were represented with GraphPad Prism version 7.00 for Windows (GraphPad Software, CA, USA).

Liposomal nanocarrier synthesis & physicochemical characterization

The liposomal dispersion used in this study was prepared according to previous publications by our research group [10,13]. The long-circulating fusogenic liposome transporter (Lipo) [13] is composed of synthetic lipids: 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N(amino[polyethyleneglycol])-2000 (DSPE-PEG2000) and cholesteryl hemisuccinate (CHEMS) at 5.7:3.8:0.5 molar ratio, respectively and total lipid concentration of 10 mmol/l. These lipids were supplied by Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). The liposome was designed to co-encapsulate the Pacli and Dox drugs at the 1:10 molar ratio, respectively. Samples were transported under refrigeration and kept refrigerated (8°C) in the laboratory.

Average size, polydispersity index and zeta potential of liposomes were characterized by dynamic light scattering and electrophoretic measurements, using a Nanosizer ZS 90 (Malvern Instruments Ltd,

Worcestershire, UK). For these measurements samples were diluted tenfold in HEPES-buffered solution. The data obtained represent the average of three readings from each sample. Data are represented by frequency of scattering by scattered light intensity. The morphological characteristics of the liposomal nanocarrier were evaluated from transmission electron microscopy images obtained with a JEM 1200EX II (Jeol, Tokyo, Japan) apparatus using phosphotungstic acid negative staining as a contrast agent. A minimum of 100 liposome images were measured using ImageJ software. The measurements values were plotted in a XY graph and the gaussian distribution was calculated. The peak of this gaussian distribution was considered the median size value for the liposomes.

Orthotopic metastatic breast cancer preclinical model

For tumor-bearing mice preparation, female Balb/c mice (aged 6–8 weeks) were obtained from the Reproductive Center at Brasília Catholic University. Animals were housed in plastic cages, in a controlled environment with a daily cycle of 12 h light and 12 h dark and ventilation, and free access to water and food. A total of 48 experimental mice were used in the present study. All animal procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the University of Brasilia (UnB. DOC N° 66721/2016).

To perform the tumor cell transplant, an insulin syringe (0.3cc short needle, 8 mm long and 0.30 mm caliber) was used to apply 50 μ l containing 4T1L (1×10^5) cells suspended in DMEM culture medium to the mouse's fifth mammary gland right papilla. The entire procedure was based on the protocol of Sousa et al. [14]. Twenty-one days after the tumor graft, we started the treatment protocol.

In vivo assessment of the liposome localization in tumor tissues

The biodistribution of the liposomal nanocarrier was studied using in vivo imaging fluorescence techniques. Liposomes were stained with a near-infrared fluorescent probe, XenoLight DiR - DiIC18 (7) or 1,1-dioctadecyltetramethyl indotricarbocyanine iodide, and detected in an in vivo imaging system IVIS LuminaR XR Series III (Caliper Life Sciences, MA, USA). For liposome staining, a DiR solution was prepared in absolute ethanol 10 mg/ml (working solution), and then 1% of this solution was mixed with the liposome formulation (10.08 mM lipid concentration). The Lipo-DiR system was injected intravenously via tail vein (final volume 100 μ l) in 4T1L tumor-bearing mice (n = 4). As a control (n = 4), a free marker solution DiR was used, with 1% of the working solution in 100 μ l of PBS and injected in 4T1L

tumor-bearing mice. Following the administration of samples, mice were anesthetized with isoflurane (2.5%), and the fluorescence signal in the animal was detected (excitation 720 nm; emission 790 nm). Fluorescence images were captured at the following times post injection: 0.3, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 144 and 288 h (Supplementary Figure 1). Animals were anesthetized for each image capture. The following equipment adjustments were used: exposure time (1 s), apertures (f/stop) 8 and average binning 8, a field of view (25 × 25 cm). Quantitative data by total radiance efficiency (photons/s/cm²/Sr) and the respective regions of interest were chosen: primary tumor region, thorax region (lung and heart), paws region, abdomen region (liver and gastric tract) and head region. Spectral analysis and unmixing techniques were performed to avoid autofluorescence and unwanted background signal detection (Supplementary Figure 2). Finally, images were processed using Living ImageR software, version 4.5.2 (Caliper Life Sciences).

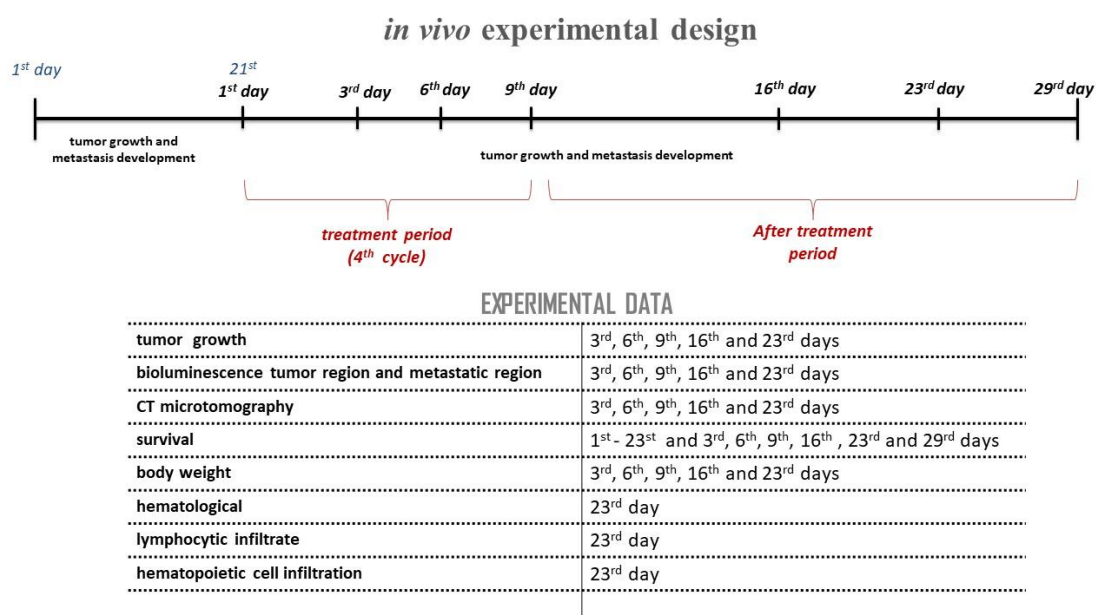


Figure 1. *In vivo* experiments design and experimental data end points. CT: Computed tomography.

Tumor-bearing mice chemotherapy treatments

On the 21st day after 4T1L tumor cell inoculation, we began the *in vivo* treatment. The treatment was administered in four cycles, every 3 days. A schematic view of this therapeutic protocol is presented in Figure 1. Samples were administered intravenously, and the volume administered was 100 μ l via the tail vein. The groups of animals were: treated with Lipo-Pacl/Dox (n = 5) and treated with free Pacli/Dox (n

= 5) at the concentrations of 0.57 and 3.64 mg/kg of Pacli and Dox (n = 5), respectively. As a positive control (n = 5), animals with tumors and without treatment were considered, receiving only PBS (100 μ l). Data obtained from healthy animals, without tumor and without treatment, were used for comparison with other treatments.

Treatment safety evaluation using Lipo-Pacli/Dox

We carried out a general assessment of the health and welfare of the animals, during and after treatment. If there were any signs of loss of mobility or apathy during the experiments, the animals would be removed from the study. Using these parameters, no animals were removed from the experimental protocol. The final experimental design end point was the detection of metastatic lesions in the tumor-bearing mice without treatment. The metastatic lesions were detected by both bioluminescence (Figure 6F) and computed microtomography images (Figure 7A).

This involved an assessment of the general appearance and level of activity of the animal, the interaction with the environment, including the construction of nests and their behavior to companions in the cage. The practical exam allows observable abnormalities, hydration status and body condition to be assessed. Throughout the experimental period, we evaluated body weight variation (OHAUS® 220, Barueri, Brazil), as well as possible signs of obvious pain, such as isolation, self-cleaning of the coat, loss of coat in the whisker region, redness in the ears. We also monitored animal survival after different treatments. After the treatment period (23rd day), animals were anesthetized by propofol overdose (60 mg/kg), at which time an aliquot of blood was collected for testing. After that, animals were euthanized and then the heart, liver, spleen and lungs were excised for future analysis. We carried out the weighing of these organs and made a photographic record as a way to evaluate possible changes (Supplementary Figure 3).

Approximately 200 μ l of whole blood was taken by heart puncture from the animals under anesthesia, and this blood was transferred to an EDTA anticoagulant tube (Greiner MinicollectR, Americana, Brazil), then centrifuged (2500 \times g) for 10 min at 4°C. For specific blood cell counts, such as white blood cells, hematocrit and platelets, we used a hematimeter (Sysmex, Co., Kobe, Japan). For histopathological analysis, liver and lung were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin and cut into 4 μ m sections,

mounted on glass slides and stained with hematoxylin-eosin. Slides were digitized with a slide scanner under an EVOS FLoid microscope and analyzed with image processing software ImageJ.

Antitumoral activity evaluation using Lipo-Pacl/Dox

Antitumor efficacy was assessed by tumor volume growth (VT) measured with a digital caliper (200MM Pd 200 Vonder®). Measurements were performed every 3 days during treatment and on a weekly basis in the post-treatment period. The values of the largest and smaller tumor diameters (D and d2) were collected and used to evaluate VT through the following equation: $VT = 4\pi/3 (D + d2/2)^3$, according to Ganassin et al. [15].

Antitumor & pulmonary antimetastatic assessments using bioluminescence

We used the in vivo bioluminescence imaging technique to evaluate tumor and lung metastasis growth. Images were acquired using IVIS LuminaR XR Series III (Caliper Life Sciences) after intraperitoneal administration of 100 μ l D-luciferin (Sigma) at a concentration of 150 mg/kg. After luciferin administration, animals were kept under isoflurane anesthesia and 20 bioluminescent images were collected every 20 min. For each bioluminescent analysis (five analysis, as described in Figure 1), mice were anesthetized and received the same luciferin injection, as described previously. For image collection, the open emission filter captured photos for 60 s for each image capture. For the anatomical reference image, an x-ray was used, allowing the location of the optical signal. The highest bioluminescence measurement in these 20 min was used as the bioluminescent data for each region of interest (tumor or lung region). All images were processed using the Living Image 3.0 software (Caliper Life Sciences, CA, USA).

Evaluation lung by microtomography

Measurement of alveolar space is a form of assessment indicating that possible changes may be occurring in this tissue. This was measured using computed tomography (CT). Mice were kept under isoflurane anesthesia (2.5%) and placed on the microtomography CT (Bruker, Billerica, EUA) bed to capture images. The parameters used were CT signal resolution, low dose (200 μ A), low voltage (35 μ A) CT quality (standard) and alveolar volume. Images obtained were analyzed using PMOD 3.307 software (PMOD Technologies LLC, Albira software Suite). The alveolar volume profile was assessed by delimiting

the pulmonary region in all image planes using the inner face of the rib cage as a reference. We selected the Hounsfield unit (HU) range, which was -1000/0 healthy area. The generated data were presented in alveolar volume/mm³.

Immunohistochemistry

For immunohistochemical analysis, tissue sections (10 µm) were processed for antigen retrieval (Sodium Citrate Buffer 0.21 g/l citric acid, pH 6) for 5 min at 100°C. To block endogenous peroxidases activity, slides were exposed to 3% (v:v) hydrogen peroxide for 30 min at room temperature. Non-specific binding sites were blocked using 3% (w:v) dry milk for 30 min at room temperature. The primary anti-CD3 antibody (Abcam ab135372) was diluted in a solution containing 3% (w:v) albumin bovine serum/PBS and was incubated with tissue sections for 12 h at 4°C. Subsequently, the sections were incubated with the biotinylated secondary antibody and avidin-biotin peroxidase complex according to the manufacturer's instructions. Diaminobenzidine was used as the chromogen, and tissue sections were counterstained with Mayer's hematoxylin [16].

Extramedullary hematopoiesis in the liver

For the evaluation of hematopoietic infiltrates in the liver, these organs were fixed with the same standard protocol as described above. We used hematoxylin-eosin stains for visualization of myeloid lineage cells. For the acquisition of the images, an EVOS FLoid microscope was used, capturing images in the 40× lens.

Statistical analysis

The graphical representation of the results was performed using GraphPad version 7.0 software. To verify the normal distribution of data we used the Shapiro–Wilk test. For significant results, t-test and ANOVA were used for comparisons between treatment groups. A statistically significant value of $p < 0.05$ was considered.

Results

Combined Pacli & Dox induce ICD

The initial question of this study was whether the combination of Pacli and Dox could induce ICD. As shown in Figure 2A1, calreticulin (CRT, green staining) was detected in the cytoplasm of permeabilized

and stressed (Triton $\times 100$ and hydrogen peroxide treatment) control cells. Furthermore, CRT was not detected in 4T1L cells not stressed (Figure 2A2), or treated with Doxorubicin (Figure 2A3), which is a weak ICD inducer. On the other hand, CRT was detected at cell membrane when 4T1L were treated with Dox, Pacli and Pacli/Dox as presented in Figure 2A4–A6, respectively. Cell nuclei and CRT were detected by DAPI (blue).

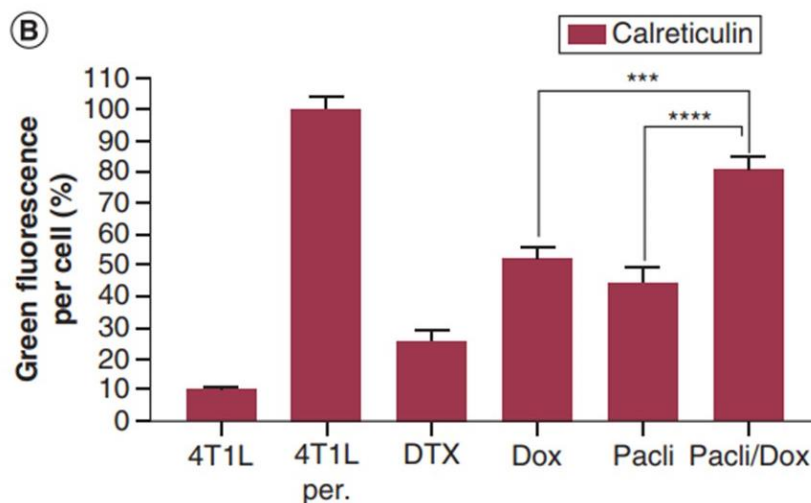
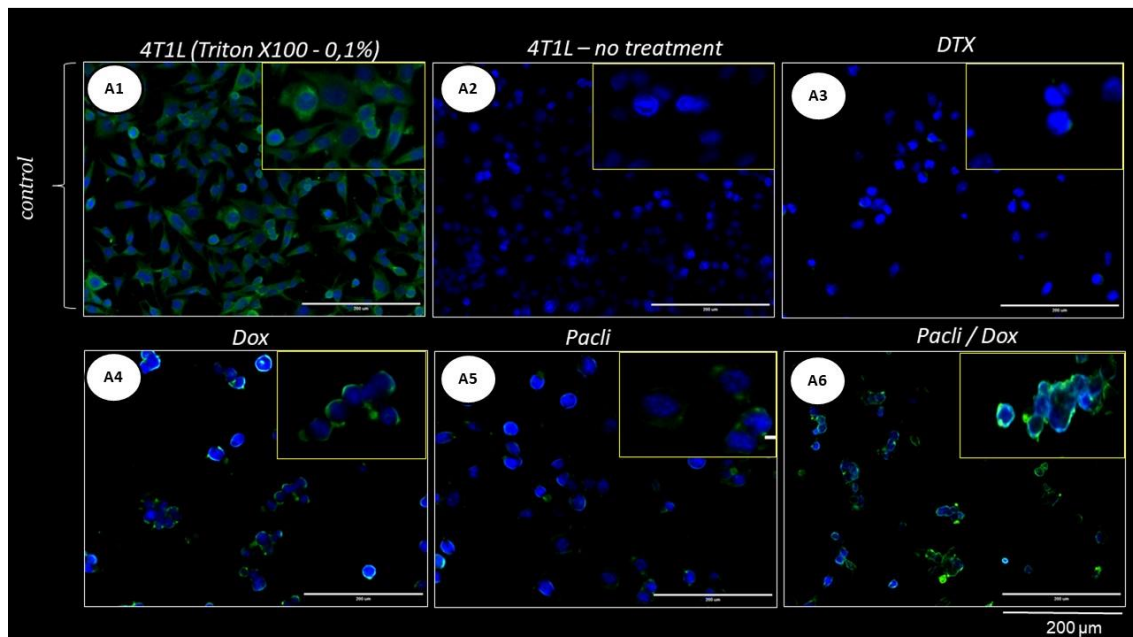


Figure 2. Detection of calreticulin in the membrane of 4T1L cells. (A1–6) Confocal microscopy images showing the appearance of the immunogenic cell death marker, calreticulin (CRT), on the surface of 4T1L cells exposed to different treatments. **(A1)** The control 4T1L cell line stressed with hydrogen peroxide and permeabilized with Triton 100 (0.1%); **(A2)** second control line of 4T1 cells that were not permeabilized and not subjected to any treatment; **(A3)** cells treated with DTX; **(A4)** cells exposed to Dox; **(A5)** cells exposed to Pacli and; **(A6)** cells exposed to Pacli/Dox. Cell nuclei and CRT were detected by DAPI (blue) and Alexa Fluor® 647- (green) conjugated anti-CRT antibody staining, respectively. **(B)** Graphical quantification of the fluorescence signal (%) in the cells exposed to different experimental treatments. ***p < 0.001; ****p < 0.0001. Dox: Doxorubicin; DTX: Docetaxel; Pacli: Paclitaxel.

In Figure 1B, the fluorescence quantification digital caliper shows that both Dox and Pacli increased CRT expression, and the increase was more significant when Pacli and Dox were combined. Cells treated with DTX, a non-ICD drug inducer, had a CRT detection similar to the control cells without treatment. Furthermore, as a second control, cells treated with hydrogen peroxide (positive CRT induction) and permeabilized with Triton \times 100 showed intense CRT fluorescence in the cytoplasm, but no fluorescence in cell membrane, as detected in ICD.

Characterization of the liposomal nanocarrier for the co-delivery of Pacli & Dox

Details of liposome characterization can be viewed in articles by our research group [10,11]. In Figure 3A, transmission electron microscopy images of the liposomes show that they have an atypical spherical and multilamellar appearance. The liposome's hydrodynamic diameter was 236.6 nm, as measured by dynamic light scattering, while the size measured (peak of the Gaussian distribution) in the electron microscopy images was 189 nm (Figure 3C). The formulation had a Polydispersity Index of 0.3 and a zeta potential (pH 6.8) of -5.01 mV. Furthermore, vesicle diameter with or without carried drugs had a similar size value, measurements showed results with less than 10% of difference.

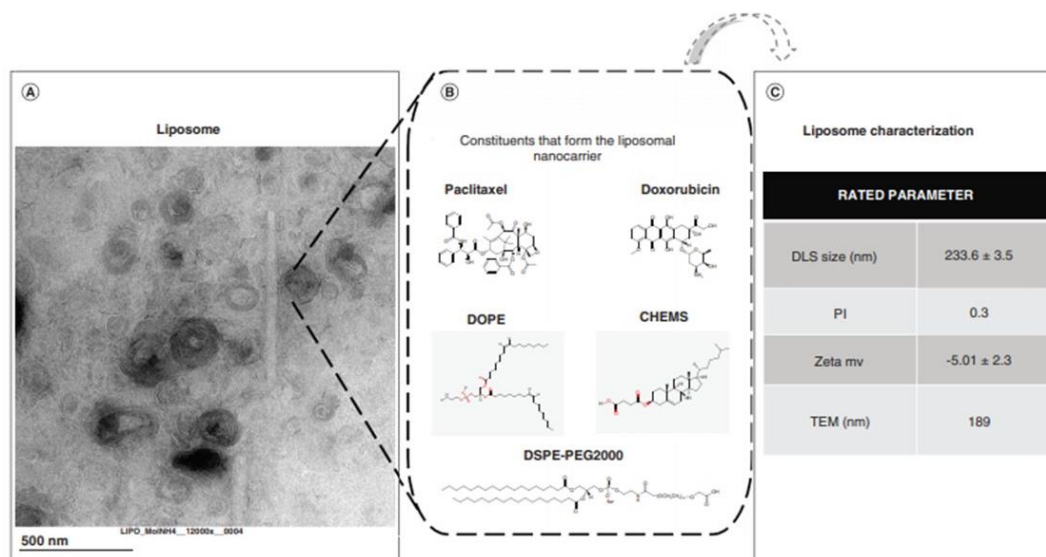


figure 3. Liposome nanocarrier encapsulating of paclitaxel and doxorubicin. (A) TEM image showing the morphology of the lipid vesicles with multilamellar bilayers of the liposomes. Scale bar = 500 nm. (B) Scheme of liposome composition: DOPE, CHEMS and DSPE2000-PEG total lipid concentration of 10 mmol L⁻¹. (C) Physicochemical data of the liposome formulation DLS; PI. The results are expressed as mean \pm standard deviation of triplicate readings. CHEMS: cholesteryl hemisuccinate cholesterol; DLS: Dynamic light scattering, DOPE: dioleylphosphatidylethanolamine; DSPE2000-PEG: 1,2 distearoyl-sn-glycero-3 phosphoethanolamine-N-(poly [ethylene glycol]) 2000; PI: Polydispersity index; TEM: Transmission electron microscopy.

Liposomal nanocarrier accumulates in the tumor tissues

Liposome biodistribution was traced by in vivo imaging fluorescence techniques (Supplementary Figure 1). As a control for these imaging experiments, we performed some preliminary tests to verify the possible interference of auto-fluorescence and light reflection signals (Supplementary Figure 2). With these experimental controls, we minimized these interferences. A real-time image of tumor bioluminescence and the liposome fluorescence signals indicates that these two signals were co-localized (Figure 4A1 and A2). This image shows that the liposomes fluorescent signals are detected in the same anatomical position that tumor bioluminescent tissues.

In addition to this qualitative evidence, a real-time image of the animals can be seen in Supplementary Figure 1. The DiR fluorescent signal was assessed in different regions of the animals. In Figure 4B, we present the fluorescent quantification of mice treated with liposome labeled with DiR or the free DiR sample. All data from Lipo-DiR had higher fluorescence over time in comparison with DiR free samples. To facilitate the interpretation of these graphs, we calculated the area under the curve (AUC) from each curve and produced a ratio between Lipo-DiR/free DiR samples. The AUC ratio is presented in Figure 4C, and it is noted that the AUC of Lipo-DiR is almost four-times the AUC of free DiR. These data confirm that the liposome is a useful tool to target tumor tissues. The ratio was significantly higher for tumor, thorax and abdominal regions, in comparison with paws and head regions.

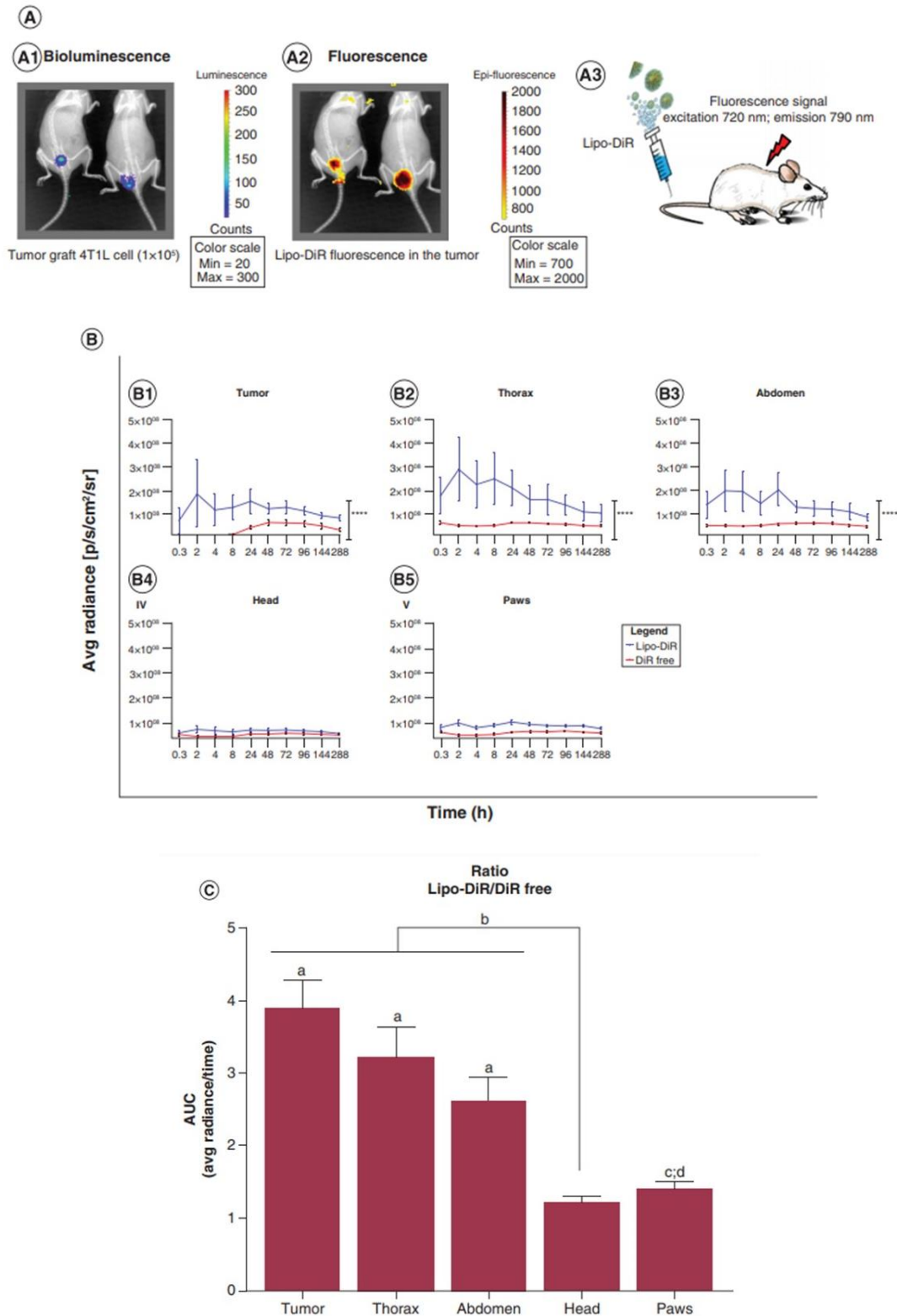


Figure 4. Biodistribution by *in vivo* imaging of the liposomal nanocarrier Lipo. (A1) Co-localization of the quantification of the 4T1L cell's bioluminescence; (A2) co-localization of the quantification of the fluorescent liposome (Lipo-DiR). (A3) A schematic view of DiR infrared fluorescence obtained by IVIS Lumina equipment. Created using www.mindthegraph.com (B) Lipo-DiR (blue lines) quantification in comparison with free DiR (red lines) in the tumor (B1); thorax (B2); abdomen (B3); head (B4) and; paws (B5). All regions and times were statistically different between the two groups ($p < 0.0001$). (C) The AUC ratio between Lipo-DiR versus DiR of all regions analyzed. Equal letters indicate no statistical difference between these two groups, while different letters represent the statistical differences ($p < 0.05$). All data presented as mean \pm standard deviation. AUC: Area under the curve.

Lipo-Pacl/Dox reduces drug toxicity

Mice treated with Lipo-Pacl/Dox presented a behavior pattern similar to the healthy control animals, including group behavior with no signs of aggression, clean coat and routine behavior within the standards of healthy animals. Mice treated with free Pacl/Dox demonstrated apathy, with slower movements and curved posture. There were signs of isolation behavior and alteration in hair, which took on a dirty appearance.

For bodyweight measurements (Figure 5A), it was observed that during the treatment period the animals in the free Pacl/Dox treated group underwent significant weight loss. There was a statistical difference between the group of healthy animals ($p < 0.01$) on days 6 and 9, as well as a difference with the group of tumor animals without treatment ($p < 0.01$) on the 9th day. It was also observed that the free Pacl/Dox group had an increase in body weight after the treatment period, which may be related to the development and increase of the primary tumor size. For the treatment group receiving co-encapsulated Lipo-Pacl/Dox there was a moderate loss of body weight, with no statistical difference in any of the groups evaluated.

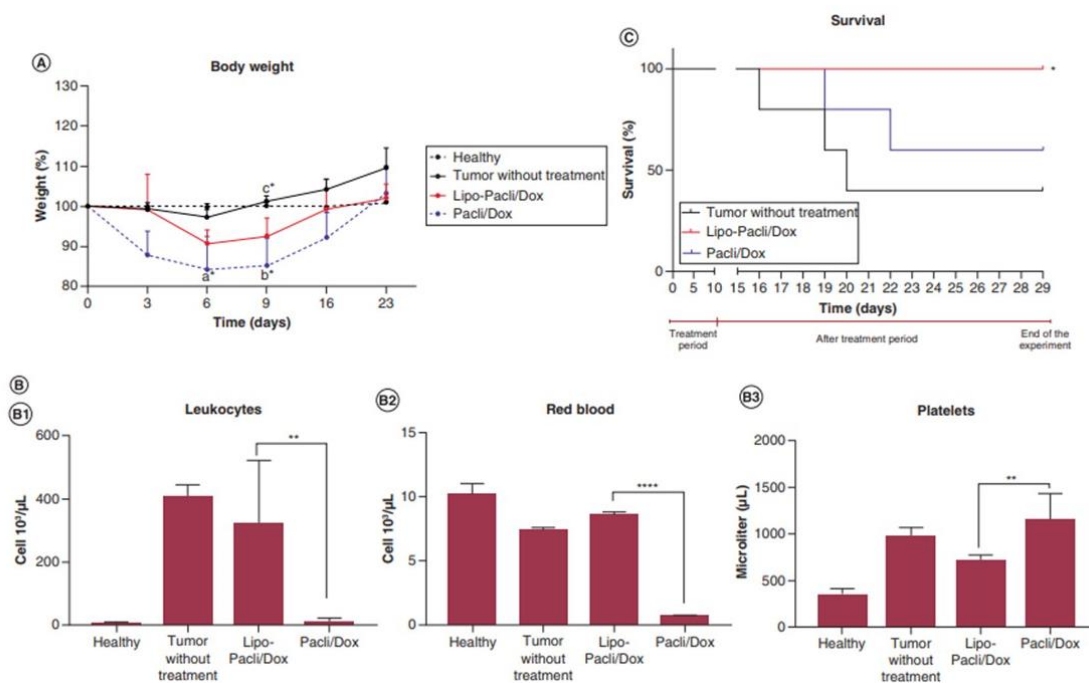


Figure 5. Co-encapsulated paclitaxel and doxorubicin delivery improve drug safety. (A) Percentage of experimental mice body weight over the experimental period. Statistical difference: (a*, b*) compared with healthy animals ($*p < 0.01$) on the 6th and 9th days, as well as a difference with the (c*) group of tumor animals without treatment ($*p < 0.01$) on the 9th day. (B1) Leukocyte count in different treatment groups; (B2) red blood cell in different treatment groups; (B3) platelet count in different treatment

groups (**p < 0.001 and ****p < 0.0001). (C) Kaplan–Meier analysis of animal survival (*p < 0.05). Pacli/Dox: Paclitaxel/doxorubicin.

In addition to weight measurements, the blood cells count was also evaluated at the end of the experiment. As presented in Figure 5B, the total leukocyte count (Figure 5B1) was significantly higher for the tumor-bearing mice that did not receive treatment and that received Lipo-Pacli/Dox; however, the latter was reduced in comparison with the tumor without treatment group. For mice treated with free Pacli/Dox, the total count was similar to the healthy control animals. Regarding red blood cell counts (Figure 5B2), all experimental groups showed a significant cell count reduction ($p < 0.05$) in comparison with healthy animals; however, this reduction was higher ($p < 0.001$) for animals treated with free Pacli/Dox. For platelet count Pacli/Dox treatment induced a significant count in comparison with the Lipo-Pacli/Dox treatment (Figure 5B3).

In addition to the previous toxicity measurements, the survival of mice after the different treatments was measured. Survival data are represented in a Kaplan–Meier curve (Figure 5C). It was observed that all animals treated with Lipo-Pacli/Dox ($n = 5$) survived throughout the experiment (up to the 50th day after tumor transplant), and although the free Pacli/Dox group ($n = 3$) showed a significant ($p < 0.05$) increase in mice mortality, 60% of the group's animals were alive. The group without treatment had a higher number of deaths within the timeframe of the experiment. At the end of experiment, 40% of the animals in the tumor without treatment group survived.

In addition, the liver, lung and spleen were collected and weighed; the liver and spleen were photographed to better visualize macroscopic changes (Supplementary Figure 3A). The co-encapsulation of the chemotherapeutics, Lipo-Pacli/Dox, induced a smaller increase in the weight of all the organs evaluated, compared with the group with the free Pacli/Dox drugs (statistically different, $p < 0.001$). The photographs of the liver and spleen demonstrated an increase in the size of these organs after treatment with the free Pacli/Dox drugs, indicating hepatomegaly and splenomegaly (Supplementary Figure 3B). Lipo-Pacli/Dox encapsulation protected these organs from this change.

Effective tumor growth control & metastasis inhibition by Lipo-Pacli/Dox

For tumor progression studies, tumor growth was measured using two different techniques, volume measurement with a digital caliper (Figure 6A) and bioluminescent quantification (Figure 6E). In Figure 6A, we observed that animals treated with Lipo-Pacl/Dox had a less accelerated growth profile compared with the other experimental groups. Significant statistical differences were observed only after the 23rd day of experimentation. Since one of the main objectives of the article was to evaluate the effect of treatments on metastatic lesions, it was decided that the experiment would be stopped after this metastatic detection. The following week of observation (24–25th day) was used to collect the lung CT images. Similar data from animals treated either with Lipo-Pacl or Lipo-Dox in comparison with animals treated with the free drugs are presented in Supplementary Figure 4. In these groups, no statistical difference was observed comparing the free drug with the liposome-carried drug.

Furthermore, at the end of the experiment, we measured the relative mass of the tumors (tumor weight: animal weight) (Figure 6C). The animals were photographed to evaluate the tumors clinical aspect. (Supplementary Figure 5). Progressive development of the tumor with an area of necrosis was observed in the animals in the tumor group without treatment. Indeed, a large area of necrosis at the center of the tumor can be seen in the free Pacl/Dox group, compared with the treatment group with co-encapsulated drugs, Lipo-Pacl/Dox, in which the tumor is seen to be smaller in size and without the appearance of a necrotic area. In Figure 6C it can be observed that the relative weight of the tumor was significantly lower (12.24 g) for Lipo-Pacl/Dox-treated animals. These data indicate a positive action of Lipo-Pacl/Dox on the control of 4T1L primary tumor growth.

The data presented in Figure 6E & F, show the mean radiance of 4T1L cell bioluminescence in the tumor region and metastatic region (thorax) respectively, after different treatments. Throughout the analysis, none of the groups showed complete eradication of tumor cells. We also observed that bioluminescence from Lipo-Pacl/Dox-treated mice was reduced in comparison with other experimental groups; however, these data were not statistically significant.

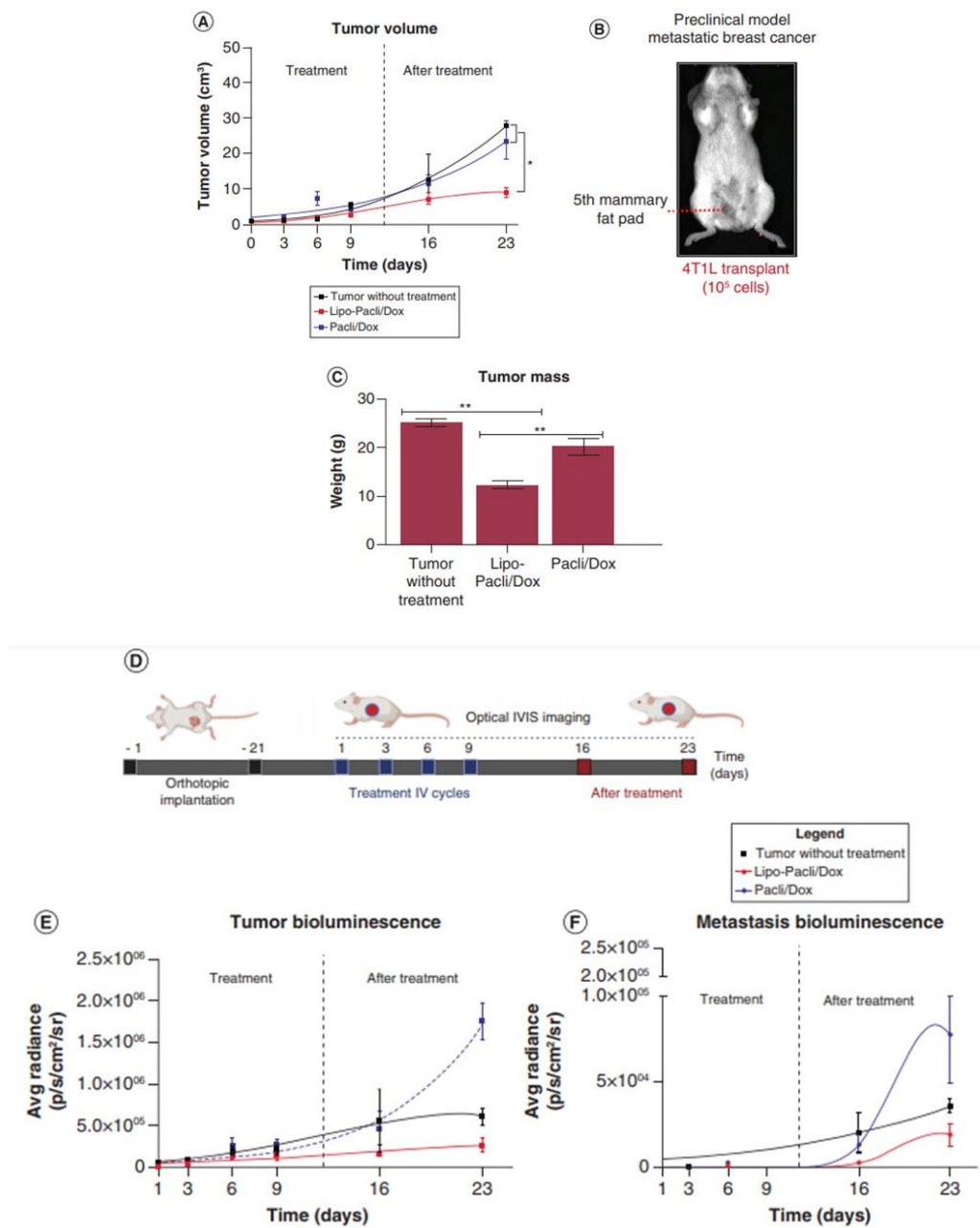


Figure 6. Effective tumor growth control and metastasis inhibition. (A) Tumor volume measured with pachymeter (data represented in cm³). (B) Location of the 5th layer of mammary fat of Balb/c mice, where luciferase-transfected 4T1L cells were injected to establish the orthotopic preclinical graft model. (C) Average tumor weights after animal euthanasia on day 29 after treatment. (D) Schematic illustration of treatment evaluation by in vivo imaging techniques. (E&F) Quantification of bioluminescence intensity at the primary tumor and metastatic regions. *Represent statistical difference ($p < 0.05$), and **represents statistical difference ($p < 0.01$). All data presented as mean \pm SD. The graph curves (red, black and blue) represent the normal Gaussian distribution of the data. Pacli/Dox: Paclitaxel/doxorubicin.

In addition to bioluminescence measurements, we performed CT microtomography to measure possible metastatic lesions in the lungs (images collected between 24 and 25th day). Figure 7A shows the

qualitative images that represent each experimental group obtained in the microtomography. Following the color scale, we observed that the reddish color represents the healthy alveolar space, while the yellowish color indicates dense tissue, which can be signals of fibrosis, inflammation or metastasis. Animals thoracic microtomography aspects are in the Supplementary Videos A–C. In Figure 7B, we measured the alveolar volumes, as a way to evaluate healthy tissues. Graphically, healthy animals have the largest alveolar volumes (0.38 cm³), while animals with untreated tumors have the smallest alveolar volumes (0.03 cm³), corresponding to less than 10% of the healthy alveolar volume. Comparing the alveolar volume of the Lipo-Paclidox group (0.34 cm³) with the Paclidox group (0.22 cm³), a statistical difference was observed ($p < 0.05$), indicating that the Lipo-Paclidox-treated group had fewer lung changes in comparison with healthy animals. The free Paclidox group also showed a statistical difference from healthy groups ($p < 0.01$). In addition to the histopathological analyses (Figure 7D) that identified the presence of inflammation, metastatic nodules and fibrosis in all tumor-bearing mice, we also measured the alveolar wall thickness. In Figure 7C, it can be seen that tumor induction promotes a significant increase in alveolar wall thickness, and the Lipo-Paclidox was able to partially reduce this situation. Lung metastasis histological slides, presented in Figure 7D shows the differences morphological aspects of alveolar volume in the different experimental groups. It is possible to observe that alveolar spaces are larger in the healthy animal image (Figure 7D1), followed by the images from the Lipo-Paclidox (Figure 7D3), Paclidox (Figure 7D4) and tumor without treatment image (Figure 7D2).

CD3⁺ T-cell infiltration in pulmonary metastasis ICD correlates with antimetastatic control

Figure 8A shows the immune-histochemical identification of CD3⁺ lymphocytes (brown stained cells) in lung metastatic nodules. It is clear that in metastatic nodules (all groups except healthy animals, TILs could be detected (brown stained spots); however, this infiltration was higher for animals treated with Lipo-Paclidox and free Paclidox in comparison with tumor without treatment group. In order to compare the experimental groups, TILs were morphometrically measured and plotted in Figure 8B. There, it can be seen that lymphocyte infiltration is higher in tumor-bearing mice compared with healthy animals; however, this infiltration is statistically higher for the Lipo-Paclidox treatment.

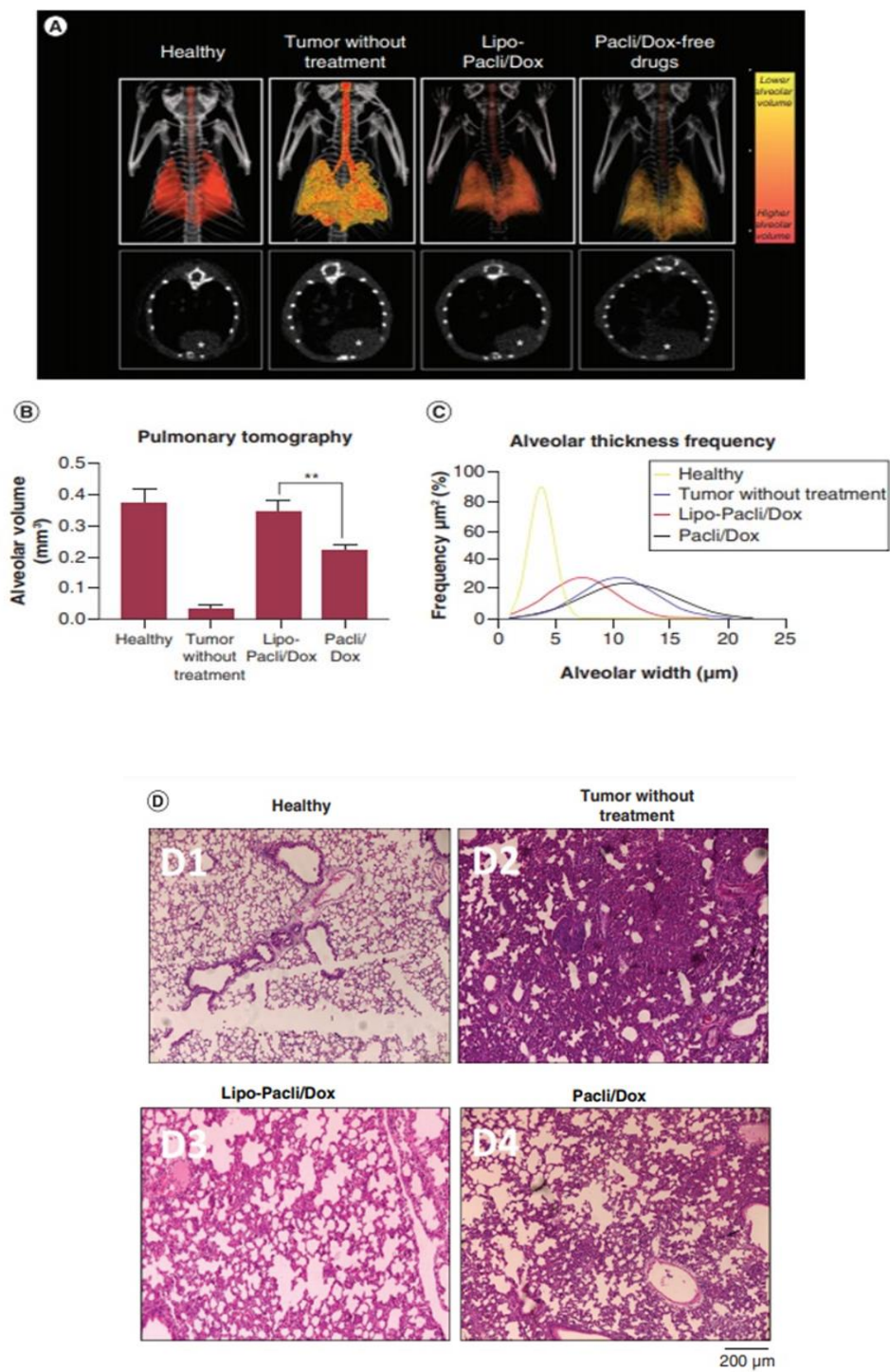


Figure 7. Evaluation of pulmonary metastasis. (A) Computed tomography images of the different experimental groups. The top images represent the 3D lung images, while the bottom images represent a bi-dimensional image from each experimental group. For the bi-dimensional images the white asterisk represents the heart regions. (B) The alveolar volume of mice under different treatments. **Represents statistical difference ($p < 0.01$). All data presented as mean \pm standard deviation. (C) The frequency of alveolar thickness. The graph curves (red, black and blue) represent the normal Gaussian distribution of the data. (D) Histological images of mice lungs subjected to different treatments. (D1) Healthy mice; (D2) tumor-bearing mice without treatment; (D3) tumor-bearing mice treated Lipo-Pacl/Dox and; (D4) tumor-bearing mice treated with Pacli/Dox. Scale bar = 200 μ m. Pacli/Dox: Paclitaxel/doxorubicin.

Dual encapsulation Lipo-Pacl/Dox treatment reduces hematopoietic infiltrate

Supplementary Figure 6 presents the hematopoietic infiltration identified in liver tissues. This infiltration is characterized by strong atypical leukocyte-like cells, placed predominantly around blood vessels. In these hematopoietic infiltrations, it was possible to detect monocytes, granulocytes and isolated megakaryocytes, which are completely atypical for liver tissues. For the healthy animals, no hematopoietic infiltration was observed.

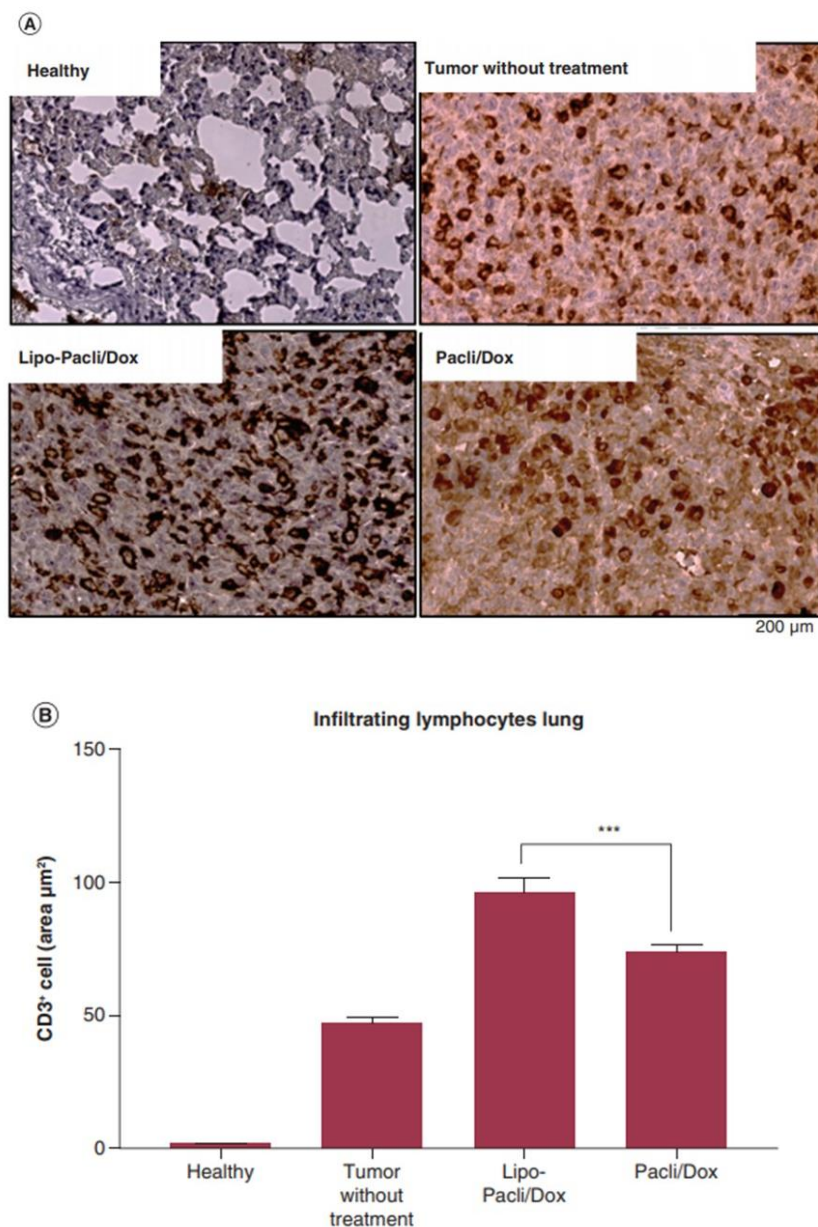


Figure 8. Immunological phenotyping to demonstrate the effect of Lipo-Pacl/Dox treatment on the activation of lymphocytes in the lung region. Histological sections images from lung metastasis marked with anti-CD3+ specific for activated lymphocytes. (A) Represents lung sections images from healthy mice, tumor bearing mice without treatment, mice treated with Lipo-Pacl/Dox, and mice treated with Pacli/Dox, respectively. (B) Represents the anti-CD3+ immunohistochemical staining

quantification of activated lymphocyte. ***Represent statistical difference ($p < 0.001$). All data presented as mean \pm standard deviation. Pacli/Dox: Paclitaxel/doxorubicin.

This hematopoietic infiltration was morphometrically analyzed (Supplementary Figure 6B), and it was observed that free Pacli/Dox treatment promoted high liver infiltration ($p < 0.001$), whereas both the Lipo-Pacli/Dox had a hematopoietic infiltration similar to the healthy liver quantification. This indicates that the drug-treated group in the liposomal system was able to reduce this extra-medullary hematopoiesis detected in liver tissues.

Discussion

Our key finding in this study is the high number of lung TILs in tumor-bearing mice treated with Lipo-Pacli/Dox, which is correlated to a significant reduction in lung metastasis. It is interesting to note that the liposomes containing a single drug, Dox or Pacli, did not promote a statistical tumor control in comparison with the free drug treatment, as presented in Supplementary Figure 4. This is an important indication of the positive effect of the combined treatment of the two drugs entrapped in a single liposome.

In addition, we observed that tumor and metastasis control observed in Lipo-Pacli/Dox-treated animals was associated with a significant reduction in liver hematopoietic infiltration, which is connected with a tumor tolerogenic phenotype [16,17]. The results highlighted here suggest that Lipo-Pacli/Dox, in comparison with the free drug (Pacli + Dox) treatments, promoted an important immunological reorganization, which aimed for immune surveillance against an orthotopic 4T1 breast cancer model. In addition to dramatically prolonging animal survival, the use of Lipo-Pacli/Dox resulted in a significant benefit, even compared with the administration of free Pacli/Dox.

Taken together, our results indicate that this immunological change is a consequence of the Lipo-Pacli/Dox delivery to tumor and metastatic tissues, as shown in the *in vivo* liposome imaging. Pharmacokinetic modulation is one of the goals of nanomedicine, and the results shown here confirm the ability of these nano-sized carriers to improve some pharmacokinetic properties, such as tumor targeting [13,18]. One specific advantage of the liposome used in this study is that the vesicle is a

multilamellar liposome, as shown in the microscopy images (Figure 3A). This pattern is interesting because it produces vesicles with several phospholipidic layers, which are spaces created for entrapping hydrophobic compounds, such as Pacli.

Based on our results, we conclude that nano-sized liposome carriers are an important delivery platform that can release Pacli and Dox, acting as strong ICD drug inducers, in primary tumors and lung metastatic tissues. In this condition, activated lymphocytes are attracted, and both tumor and metastasis are impaired, promoting an important gain in treatment effectiveness. ICD induction has been a high-profile topic in the oncology literature since 2007 when Obeid and co-workers [5] stated that some chemotherapeutic drugs, including Dox, are ICD inducers. This has been a never important finding because some drugs, used specifically as cytotoxic compounds, could also act as elements that activate the immune system against tumor tissues and/or hidden metastasis spots. As defined, ICD is a sub-type of apoptosis, or regulated cell death, which triggers an adaptive immune response against some specific tumor antigens released during cell death [6]. ICD is characterized by the release of immuno-stimulator molecules, such as ATP and HMGB1, and the translocation of CRT to cell membrane. ATP and HMGB1 work as chemotactic molecules, while CRT works as a surface recognition pattern. In this situation, CRT is identified by phagocytic cells as an 'eat me' signal, which triggers the removal of dying cells by activating immune cells. Furthermore, CRT is translocated to the cell membrane in the pre-ICD stages, and so we decided to use CRT as an early marker of ICD in our in vitro experiments. This is an important feature, since it stimulates the immune system, instead of suppressing it. This immune conversion was observed in our results, when we showed a significant reduction in liver hematopoiesis, which is a strong evidence of tumor tolerance [16,17].

One differential approach presented in this article is the innovative strategy to co-encapsulate two ICD inducers, Pacli and Dox, in a single liposome nanocarrier. Dox is a well-known ICD inducer, and extensive evidence of this activity is published in the literature [5,6,9]. The activity of Pacli is not so well known, but Lu et al. [9] showed some evidence of it. Our results prove, for the first time, that both drugs can induce surface CRT expression in 4T1 cell membranes, and the combination of the two drugs amplified this antigen expression.

Regarding drugs concentration used in our in vitro experiments, the free Dox (5 μ M) and free Pacli (5 μ M) concentrations were established based on previous publications [9]. In this paper, the authors identified that both Dox and Pacli are able to induce ICD in 4T1 cells in both 5 and 10 μ M. As we also use the two drugs together, in the same exposition time, we decide to use the 5 μ M of each drug in the combined treatment. For DTX exposition, we used the same molar concentration of the other two ICD-inducers.

This is an important result since both drugs are in clinical use and could be investigated and applied not only in cytotoxic therapies, but also to trigger immune activation. In this in vitro experiment, our main objective was to investigate the free drug's effects against 4T1 cells. Surface CRT expression is one of the hallmarks of ICD, and this is a consequence of CRT translocation, which is constitutively expressed at the endoplasmic reticulum membrane, to the surface cell membrane. In addition, during ICD, dying cells secrete ATP and release HMGB1, which work as chemotactic agents, attracting antigen-presenting cells, such as dendritic cells. In turn, CRT acts as an 'eat-me' signal that will trigger tumor antigen recognition, lymphocyte recruitment and infiltration of activated lymphocytes within tumor and metastatic tissues.

In addition to ICD induction by Pacli and Dox, we also observed an important improvement in drug tolerability and toxicity reduction when drugs are entrapped in the liposome nanocarrier. The adverse effects caused by chemotherapy, during and after treatment, are a limiting factor that significantly affects the patient's life quality during cancer treatment [13]. Based on the parameters analyzed in this study, it was observed that Pacli and Dox encapsulation improved mouse survival and reduced overall weight loss during the entire experimental period in comparison with free drug administration. It is important to point out that animals treated with Lipo-Pacli/Dox had a moderate body weight loss during the experiments; however, this reduction was significantly different to data from animals treated with the free drug administration. This is not an ideal condition, but considering the high toxicity impact of these drugs, any kind of possible toxicity impairment is important in a future possible clinical application.

Furthermore, we also observed that liposomes attenuated mouse hematological toxicity. Analyzing the hematological data, we observed that the free drug treatment induced severe anemia in comparison

with healthy mice and mice treated with Lipo-Pacl/Dox. Anemia is one of the most common side effects of Pacli/Dox chemotherapy [19]. The dose-limiting improvement provided by the liposome is an important advantage related to these nanocarriers, in comparison with conventional free drug therapy.

The 4T1 tumor-bearing mouse model is characterized by significant leukocytosis and unique liver extramedullary hematopoiesis, which are strongly correlated to the tumor tolerogenic phenotype [9,14,20]. The key point is that the huge number of leukocytes, massively produced during liver hematopoiesis, are immature immune suppressor cells, and they contribute to immunogenic tolerance, typical in this tumor model. For this reason, all 4T1 tumor-bearing mice present huge leukocytosis and a strong tendency to metastasis due to immune response suppression [20].

For leukocyte count in animals treated with free Pacli/Dox, the number of cells were similar to results obtained in healthy mice; however, this was reduced in comparison with the Lipo-Pacl/Dox mice. In a preliminary analysis, this last observation was a good result for the free drug treatment; however, the amount of liver hematopoietic tissue, where the immature immune suppressor cells are proliferating, did not decrease. On the contrary, liver hematopoiesis increased for the free drug-treated mice. These results suggest that the free drugs induced important control of leukocytosis by inducing a strong bone marrow hematopoietic toxicity; however, the suppressor cells produced in the liver hematopoietic tissue were not reduced, increasing the immune-suppressed phenotype. Thus, we can suggest that we are observing the toxic effect of the Pacli/Dox treatments when the drugs are administered alone, and the toxicity prevention when the same drugs are administered entrapped in the liposome drug carrier.

These hematological observations correlate with primary tumor control and with the prevention of metastasis [12,16]. As shown in the tumor progression analysis, Lipo-Pacl/Dox promoted significant tumor growth impairment, in the three methodological analyses (tumor volume, bioluminescence and weight).

Interesting to note that comparing the two methodologies (volume/weight and bioluminescence analysis) used to measure tumor growth and progression, different data were obtained in these two methods used. These slight differences can be detected because techniques measure different types of

primary data. For instance, tumor volume measures tumor tissues, plus the inflammation around tumors. In this situation edema is also counted and it is impossible to separate them. On the other hand, bioluminescence measures only the biological activity of tumor cells, which have the luciferases enzyme constitutively express.

Furthermore, thoracic bioluminescence, lung microtomography and histopathological evaluation confirmed the reduction of metastasis in the Lipo-Paclitaxel/Doxorubicin-treated mice in comparison with the free drug-treated mice. In addition, TIL infiltration is well known as a strong prognostic for tumor control [4], and it was a fundamental biological event for the metastatic prevention observed in our results.

Based on this discussion, and from previous publications by our research group [12,16,21], it is reasonable to suggest that the 4T1 cells establish their tumor spots in the mice as a consequence of systemically induced events, affecting different organs, including lungs, liver, spleen and bone marrow. The process probably starts with the super-production of GM-CSF by the 4T1 cells, which attract certain hematopoietic cells, especially the myeloid derived suppressor cells (MDSCs), to home in on the liver tissues [17]. After that, the MDSCs seem to upregulate the regulatory profile of liver macrophages, contributing to immunosuppression in the mouse phenotype [17]. Thus, this immunosuppressed systemic condition creates a tolerant environment for tumor progression.

Breaking this vicious immunosuppression cycle, when malignant cells recruit MDSC to protect themselves, which is common for several other types of cancer, remains a challenge and researchers are intensely involved in this task. In this paper, we present results that indicate that conventional cytotoxic drugs, such as Paclitaxel and Doxorubicin, when delivered in a liposome nanocarrier, could be a useful strategy to partially reverse systemic immunosuppression and improve therapy effectiveness. In addition, as commented previously, the use of traditional cytotoxic drugs as immune activators, by inducing ICD, is an appropriate strategy to provide faster translatable protocols for oncology patients, improving their survival and quality of life.

Conclusion

The concept of chemotherapy-induced ICD has been described in the literature for some decades; however, investigations began to intensify a few years ago with regard to the drugs already used in clinical practice as a practical and reproducible principle of immunotherapy. From the results of this study, we demonstrate that the number of TILs in the metastatic lung contributes to a positive prognostic factor in controlling the progression of the pathology and adds important prognostic information to the survival estimates when treatment involves the encapsulation of the chemotherapeutic agents that induce ICD, combining Pacli and Dox. In addition, the use of a nanocarrier guarantees a safe decrease in the adverse effects of chemotherapy, compared with free drugs. Together, these results indicate that, within this approach, Pacli and Dox could act not only as cytotoxic drugs, but also as immunological modulators for clinical applications.

Supplementary data

To view the supplementary data that accompany this paper please visit the journal website at: www.futuremedicine.com/doi/suppl/10.2217/nnm-2020-0201

Author contributions

RS Faria and LI de Lima contributed to the execution of all experiments and writing of the work. MS Franco and MC Roque designed the liposome formulation samples. JPF Longo, RB Azevedo, SE Moya and MC de Oliveira participated in the study design, analyzed the results and wrote the article. TJA Pacheco contributed to the computed tomography analysis to trace pulmonary metastasis. MC Rodrigues and LA Muehlmann performed the experiments in vitro related to the cell death induction analysis. All authors reviewed the final version of the manuscript.

Financial & competing interest's disclosure

This work was supported and funded by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (307098/20184), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) the Federal District Research Support Foundation, FAPDF and Fundação de Amparo do Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (CDS - RED-00007-14). The authors thanked the Center for Cooperative Research in Biomaterials- CIC biomaGUNE - Soft Matter Nanotechnology Lab (SE Moya and JM Porcel) for financial support. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement

with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed. No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

The authors state that this study was conducted following the principles of the Basel Declaration and the recommendations of the Animal Use Ethics Committee of the University of Brasilia, which approved protocol CEUA (UnB. DOC N^o 66721/2016).

Summary points

- Doxorubicin and paclitaxel, classical cytotoxic drugs can induce the immunogenic cell death (ICD). The ICD was observed *in vitro*, in 4T1 cells, an aggressive metastatic breast cancer cell.
- The main hypothesis involved in ICD is that dying cells can release and/or exposed 'eat me' signals to defense cells. An evidence of that was the increase lymphocyte infiltration in metastatic lesions.
- Liposomes are interesting drug delivery system for drug administration. In our results, it was possible to observe that for pre-clinical tumor mice models, the liposome vesicles can deliver their cargo to tumor tissues.
- It is interesting that the 4T1 tumors produce a strong tolerogenic environment by inducing the production of immunosuppressive leucocytes, that impair immunological surveillance.
- Liposome, as a drug delivery system can increase the delivery to tumor tissues, but they are also an interesting system to improve drug solubility, as shown for paclitaxel encapsulation.
- As shown in our results, confirming some literature information, lymphocyte activation and infiltration in tumor tissues is an important step for tumor control.
- Drug encapsulation, such as showed for the Lipo-Pacli/Dox vehicle is an interesting strategy to significantly reduce drug chemotherapy toxicity.
- Following the toxicity reduction, we also observed that liposome is also useful to improve mice model survival during chemotherapy.

References

Papers of special note have been highlighted as: • of interest; •• of considerable interest

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5), 646–674 (2011).
 - **Contains the fundamental aspects of tumor cell biology.**
2. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 9(3), 162–174 (2009).
 - **Describes basic aspects of myeloid-derived suppressor cells.**
3. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 16(5), 275–287 (2016).
4. Loi S, Drubay D, Adams S *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes and prognosis: a pooled individual patient analysis of early-stage triple-negative breast cancers. *J. Clin. Oncol.* 37(7), 559–569 (2019).
 - **Shows the importance of Lymphocyte infiltration for patient prognosis.**
5. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F *et al.* Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* 13(1), 54–61 (2007).
 - **Provides that several drugs, including doxorubicin, could act as immunogenic cell death inducers.**
6. Krysko V, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 12(12), 860–875 (2012).
7. Clark Wallace H Jr, Elder DE, Guerry DuPont IV *et al.* Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J. Natl Cancer Inst.* 81(24), 1893–1904 (1989).

8. Palma L, Di Lorenzo N, Guidetti B. Lymphocytic infiltrates in primary glioblastomas and recidivous gliomas. *J. Neurosurg.* 49(6), 854–861 (1978).
 9. Lu J, Liu X, Liao YP *et al.* Breast cancer chemo-immunotherapy through liposomal delivery of an immunogenic cell death stimulus plus interference in the IDO-1 pathway. *ACS Nano* 12(11), 11041–11061 (2018).
- Describes the use of a liposome nanocarrier to delivery immunogenic cell death inducers using breast cancer models.
10. Roque MC, Franco MS, Vilela JMC *et al.* Development of long-circulating and fusogenic liposomes co-encapsulating paclitaxel and doxorubicin in synergistic ratio for the treatment of breast cancer. *Curr. Drug Deliv.* 16(9), 829–838 (2019).
 11. Franco MS, Roque MC, Oliveira MC. Short and long-term effects of the exposure of breast cancer cell lines to different ratios of free or co-encapsulated liposomal paclitaxel and doxorubicin. *Pharmaceutics* 11(4), 178 (2019).
- Describes the methods used to prepare the liposome used in the present article.
12. dos Santos Camara AL, Nagel G, Tschiche HR[^] *et al.* Acid-sensitive lipidated doxorubicin prodrug entrapped in nanoemulsion impairs lung tumor metastasis in a breast cancer model. *Nanomedicine (Lond.)* 12(15), 1751–1765 (2017).
- Describes most of the *in vivo* methodology used in the present article to investigate lung metastasis.
13. Franco MS, Roque MC, de Barros ALB, de Oliveira Silva J, Cassali GD, Oliveira MC. Investigation of the antitumor activity and toxicity of long-circulating and fusogenic liposomes co-encapsulating paclitaxel and doxorubicin in a murine breast cancer animal model. *Biomed. Pharmacother.* 109, 1728–1739 (2019).
 14. Soares Sousa CR, Miranda-Vilela AL, de Almeida MC *et al.* Experimental orthotopic breast cancer as a model for investigation of mechanisms in malignancy and metastasis to the lymph nodes. *Int. J. Vet. Sci. Res.* 5(2), 046–057 (2019).
 15. Ganassin R, Merker C, Rodrigues MC *et al.* Nanocapsules for the co-delivery of selol and doxorubicin to breast adenocarcinoma 4T1 cells *in vitro*. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 46(8), 2002–2012 (2018).
 16. Longo JPF, Muehlmann LA, Miranda-Vilela AL *et al.* Prevention of distant lung metastasis after photodynamic therapy application in a breast cancer tumor model. *J. Biomed. Nanotechnol.* 12(4), 689–699 (2016).
- Describes most of the *in vivo* methodology used in the present article to investigate lung metastasis.
17. Ilkovitch D, Lopez DM. The liver is a site for tumor-induced myeloid-derived suppressor cell accumulation and immunosuppression. *Cancer Res.* 69(13), 5514–5521 (2009).
 18. Longo JPF, Lucci CM, Muehlmann LA, Azevedo RB. Nanomedicine for cutaneous tumors – lessons since the successful treatment of the Kaposi sarcoma. *Nanomedicine (Lond.)* 13(23), 2957–2959 (2018).
 19. Wu L, Liu YJ. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity* 26(6), 741–750 (2007).
 20. *Fundamentals of Laboratory Animal Science.* Liu E, Fan J. (Eds). CRC Press, FL, USA (2017).
 21. Rodrigues MC, Vieira LG, Horst FH *et al.* Photodynamic therapy mediated by aluminium-phthalocyanine nanoemulsion eliminates primary tumors and pulmonary metastases in a murine 4T1 breast adenocarcinoma model. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 204, 111808 (2020).

6. CONCLUSÕES GERAIS

- A combinação dos fármacos paclitaxel e doxorrubicina demonstraram ser potentes indutores de morte celular imunogênica;
- A encapsulação dos fármacos combinados demonstrou ser capaz de reduzir significativamente a toxicidade sistêmica destes quimioterápicos após administração;
- A combinação de Pacli e Dox também demonstrou ter a capacidade de otimizar a atividade antitumoral e antimetastática dos fármacos carregados;
- Foi observada uma correlação positiva entre o infiltrado linfocítico e o controle da progressão das metástases.

7. ANEXO 1. CERTIFICADO COMITÉ DE ETICA

Certificado de autorização de Comissão de ética no uso animal da Universidade de Brasília.


Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas Comissão de Ética no Uso Animal
Brasília, 21 de novembro de 2016.
DECLARAÇÃO
Declaramos que o projeto intitulado " AValiação da Biodistribuição e Eficácia Antitumoral de Lipossomas Contendo Doxorubicina e Paclitaxel em Modelos Experimentais de Tumor de Mama. ", UnBDoC n.º 66721/2016, sob responsabilidade do Professor João Paulo Figueiró Longo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: <i>Mus musculus</i> (65 fêmeas). A presente aprovação é válida pelo período de 05/12/2016 a 05/12/2018.

Profa. Dra. Paula Diniz Galera Coordenadora da CEUA – UnB
*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

8. HISTÓRICO ACADÊMICO

Participação de eventos, palestras, organizações de eventos e publicações de trabalho durante o período do doutorado.

Palestra

(2018) XVII Semana da Biologia da Universidade de Brasília. Título da palestra: Desenvolvimento e Aplicação de Nanopartículas Carreadoras de Fármacos. Local: Instituto de Biologia; Cidade: Brasília-DF;

(2017) *Conferencista* no XVI Semana da Biologia: “A Odisseia da Vida”, Universidade de Brasília- UnB, Brasília / DF;

(2016) *Conferencista* no XVI Semana Acadêmica de Biomedicina - Centro Universitário de Brasília – UniCEUB, Brasília / DF

Divulgação Científica

(2019) Divulgação científica na página da rede social Instagram **NanoBioImage**. (Radicchi, MA; CARDADOR, CM; DE LIMA, LI; PACHECO, T; SANTOS, DS; Longo JPF)

Exposição da linha de pesquisa do laboratório de nanotecnologia - NanoBioImage no evento CampusParty - área Open Campus. Maior feira de tecnologia do mundo.

Organização de Eventos

(2019) Comissão Organizadora do Evento: DissemiNano. Promovido para divulgação na área científica em nanotecnologia.

(2018) First International Conference of Nanoscience and Nanobiotechnology. (Congresso, Organização de evento). Referências adicionais: Inglês / USA-Brasil/Português.

Banca Avaliadora

(2018) Participação de banca avaliadora: Pollyanna Pétalla Portella. Avaliação dos mecanismos de resistência celular a quimioterápicos usando nanoemulsões contendo doxorubicina pH sensível e sua distribuição intracelular. Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília. Áreas do conhecimento: Química Farmacêutica Medicinal Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico Referências adicionais: Brasil/Português.

Visita técnica

Center for Cooperative Research in Biomaterials- CIC biomaGUNE - San Sebastián (Spain);

Colaboração pesquisa científica e inovação tecnológica do País Basco País que segue a política de BioBasque, a fim de conhecer setor de negócios baseado em biociências. Período da visita: dezembro/2018-abril/2019;

Departamento de produto farmacêutico, Laboratório em Nanobiotecnologia. Universidade de Minas Gerais- Faculdade de Farmácia. Visita técnica para colaboração com grupo de pesquisa da professora Dr^a Mônica de Oliveira. Desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos mediante o emprego de nanotecnologia. Período agosto de 2019.

Cursos

(2019) Feira de Negócio e Inovação (carga horária: 15h). Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico, Universidade de Brasília, UnB, Brasília-DF, Brasil.

PUBLICAÇÃO DE ARTIGOS CIENTÍFICOS

(2018) Self-nanoemulsifying drug-delivery systems improve oral absorption and antischistosomal activity of epiisopiloturine. Home page do trabalho:

<http://https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/nmm-2017->

[0308?rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=nnm](http://https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/nmm-2017-0308?rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=nnm)

(2017) Seasonal change in main alkaloids of jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth), an economically important species from the Brazilian flora.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast cancer. Acessado: 18 de janeiro de 2020.

<<https://www.cancer.org/>>

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 238-272, 1965. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283665800936>>.

BARENHOLZ, Y. (Chezy). Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. **Journal of Controlled Release**, v. 160, n. 2, p. 117–134, 2012. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365912002301>>.

BATIST, G. et al. Improved anti-tumor response rate with decreased cardiotoxicity of non-pegylated liposomal doxorubicin compared with conventional doxorubicin in first-line treatment of metastatic breast cancer in patients who had received prior adjuvant doxorubicin: resu. **Anti-cancer drugs**, v. 17, n. 5, p. 587–595, 2006.

BERNABEU, E. et al. Paclitaxel-loaded PCL-TPGS nanoparticles: In vitro and in vivo performance compared with Abraxane®. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 43–50, 2014. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.07.036>>.

BINES, J. et al. Anthracyclines and taxanes in the neo/adjuvant treatment of breast cancer: does the sequence matter? **Annals of Oncology**, v. 25, n. 6, p. 1079–1085, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/annonc/mdu007>>.

BISHOP, J. M.; WEINBERG, R. A. **molecular Oncology**. [s.l.] Scientific American,

1996.

DEAN-COLOMB, W.; ESTEVA, F. J. Emerging agents in the treatment of anthracycline-and taxane-refractory metastatic breast cancer. In: *Seminars in oncology, Anais...*2008.

DENARDO, D. G.; COUSSENS, L. M. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. **Breast Cancer Research**, n. 4, p. 212, 2007.

DESHPANDE, P. et al. Transferrin and octaarginine modified dual-functional liposomes with improved cancer cell targeting and enhanced intracellular delivery for the treatment of ovarian cancer. **Drug Delivery**, v. 25, n. 1, p. 517–532, 2018.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1435747>>.

DOS SANTOS CÂMARA, A. L. et al. Acid-sensitive lipidated doxorubicin prodrug entrapped in nanoemulsion impairs lung tumor metastasis in a breast cancer model.

Nanomedicine, v. 12, n. 15, p. 1751–1765, 2017. Disponível em:

<<https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0091>>.

DUNN, G. P. et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape.

Nature Immunology, v. 3, n. 11, p. 991–998, 2002. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1038/ni1102-991>>.

FADERL, S. et al. Outcomes in Older Adults with Newly Diagnosed, High-Risk/Secondary Acute Myeloid Leukemia (AML) Who Achieved Remission with CPX-351 Versus 7+ 3 Induction: Exploratory Analysis of a Phase 3 Study. **Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia**, v. 19, p. S206--S207, 2019.

FRANCO, M. S. et al. Investigation of the antitumor activity and toxicity of long-circulating and fusogenic liposomes co-encapsulating paclitaxel and doxorubicin in a murine breast cancer animal model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1728–1739, 2019. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332218349862>>.

FRANCO, M. S.; ROQUE, M. C.; OLIVEIRA, M. C. Short and Long-Term Effects of the Exposure of Breast Cancer Cell Lines to Different Ratios of Free or Co-Encapsulated Liposomal Paclitaxel and Doxorubicin. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 4, p. 178, 2019.

FRIDMAN, W. H. et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 298–306, 2012.

GALLUZZI, L. et al. Immunological effects of conventional chemotherapy and targeted anticancer agents. **Cancer cell**, v. 28, n. 6, p. 690–714, 2015.

GARG, A. D. et al. Danger signalling during cancer cell death: origins, plasticity and regulation. **Cell death and differentiation**, v. 21, n. 1, p. 26, 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867411001279>>.

HASHEMI, V. et al. Regulatory T cells in breast cancer as a potent anti-cancer therapeutic target. **International Immunopharmacology**, v. 78, p. 106087, 2020.

HORWITZ, S. B. Taxol (paclitaxel): mecanismos de ação. **Annals of oncology: jornal oficial da Sociedade Europeia de Oncologia Médica**, v. 5, p. S3--6, 1994.

IYER, A. K. et al. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. **Drug discovery today**, v. 11, n. 17–18, p. 812–818, 2006.

JAIN, R. K.; STYLIANOPOULOS, T. Delivering nanomedicine to solid tumors. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 7, n. 11, p. 653–664, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.139>>.

KAELIN, W. G. The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. **Nature reviews cancer**, v. 5, n. 9, p. 689–698, 2005.

KLIBANOV, A. L. et al. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. **FEBS letters**, v. 268, n. 1, p. 235–237, 1990.

KROEMER, G. et al. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. **Annual Review of Immunology**, v. 31, n. 1, p. 51–72, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100008>>.

KRYSKO, D. V et al. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 12, p. 860–875, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrc3380>>.

LEHMANN, M. et al. Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 539, n. 1–2, p. 167–175, 2003.

LI, J.; LEE, A. S. Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. **Current molecular medicine**, v. 6, n. 1, p. 45–54, 2006.

LONGO, J. P. F. et al. Prevention of distant lung metastasis after photodynamic therapy

application in a breast cancer tumor model. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 12, n. 4, p. 689–699, 2016.

LU, J. et al. Breast Cancer Chemo-Immunotherapy through Liposomal Delivery of an Immunogenic Cell Death Stimulus Plus Interference in the IDO-1 Pathway. **ACS nano**, v. 12, n. 11, p. 11041–11061, 27 nov. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30481959>>.

LUO, R. et al. Distinct biodistribution of doxorubicin and the altered dispositions mediated by different liposomal formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 519, n. 1–2, p. 1–10, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.002>>.

MU, L.; SPRANDO, R. L. Application of nanotechnology in cosmetics. **Pharmaceutical research**, v. 27, n. 8, p. 1746–1749, 2010.

MUSS, H. B. Adjuvant chemotherapy in older women with breast cancer: who and what? **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 32, n. 19, p. 1996—2000, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1200/JCO.2013.54.8586>>.

OBEID, M. et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. **Nature Medicine**, v. 13, n. 1, p. 54–61, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nm1523>>.

PACE, A. et al. Paclitaxel neurotoxicity: clinical and neurophysiological study of 23 patients. **The Italian Journal of Neurological Sciences**, v. 18, n. 2, p. 73–79, 1997.

POL, J. et al. Trial Watch: Immunogenic cell death inducers for anticancer

chemotherapy. **Oncoimmunology**, v. 4, n. 4, p. e1008866, 2015.

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

PRABHAKAR, U. et al. **Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology** AACR, , 2013. .

PREMIUM, V. S. Jazz Pharmaceuticals Announces First Patient Enrolled in Pivotal Phase 2/3 Study Evaluating JZP-458 for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia or Lymphoblastic Lymphoma. [s.d.]

ROQUE, M. C. et al. Development of Long-Circulating and Fusogenic Liposomes Co-encapsulating Paclitaxel and Doxorubicin in Synergistic Ratio for the Treatment of Breast Cancer. **Current Drug Delivery**, v. 16, n. 9, p. 829–838, 2019.

RYAN, G. CD3 conformation is crucial for signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 1, p. 7, 2010.

SAVAS, P. et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 13, n. 4, p. 228–241, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.215>>.

SHURIN, M. R. et al. **The tumor immunoenvironment**. [s.l.] Springer, 2013.

SINGAL, P. K.; ILISKOVIC, N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 13, p. 900–905, 1998.

SINHA, B. K. et al. Adriamycin-stimulated hydroxyl radical formation in human breast tumor cells. **Biochemical pharmacology**, v. 36, n. 6, p. 793–796, 1987.

SWANSON, G. M.; LIN, C. S. Survival patterns among younger women with breast cancer: the effects of age, race, stage, and treatment. **Journal of the National Cancer Institute. Monographs**, v. 16, p. 69–77, 1994.

TAN, Q.-W. et al. Weekly taxane–anthracycline combination regimen versus tri-weekly anthracycline-based regimen for the treatment of locally advanced breast cancer: a randomized controlled trial. **Chinese Journal of Cancer**, v. 36, n. 1, p. 27, 2017.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40880-017-0196-5>>.

TELES, R. H. G.; MORALLES, H. F.; COMINETTI, M. R. Global trends in nanomedicine research on triple negative breast cancer: a bibliometric analysis.

International journal of nanomedicine, v. 13, p. 2321, 2018.

TENG, M. W. L. et al. From mice to humans: developments in cancer immunoediting.

The Journal of clinical investigation, v. 125, n. 9, p. 3338–3346, 2015.

VALERO, V.; PEREZ, E.; DIERAS, V. Doxorubicin and taxane combination regimens for metastatic breast cancer: focus on cardiac effects. In: Seminars in oncology,

Anais...2001.

WOLFRAM, J.; FERRARI, M. Clinical cancer nanomedicine. **Nano Today**, v. 25, p. 85–98, 2019. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1748013218306388>>.

WU, Y. et al. Pharmacokinetics, biodistribution and excretion studies of neotuberostemonine, a major bioactive alkaloid of *Stemona tuberosa*. **Fitoterapia**, v.

112, p. 22–29, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2016.05.003>>.

ZHAO, Y. et al. A simple way to enhance Doxil® therapy: Drug release from liposomes at the tumor site by amphiphilic block copolymer. **Journal of Controlled Release**, v. 168, n. 1, p. 61–69, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365913001235>>.