



2013



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Micelas Poliméricas e Nanopartículas de Lípidos Sólidos, Contendo Paclitaxel, para Terapêutica de Cancro da Mama

Vera Lúcia Domingues Silva

2013



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Micelas Poliméricas e Nanopartículas de Lípidos Sólidos, Contendo Paclitaxel, para Terapêutica de Cancro da Mama

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Cristina Aguiar dos Santos (Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra) e da Prof^a Doutora Maria Paula Matos Marques Catarro (Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra).

Vera Lúcia Domingues Silva

2013

Esta cópia da dissertação é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da dissertação e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the master thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the master thesis and no information obtained from it may be published without proper acknowledgement.

*“ (...) Se achar que precisa voltar, volte!
Se perceber que precisa seguir, siga!
Se estiver tudo errado, comece novamente.
Se estiver tudo certo, continue.
Se sentir saudades, mate-a.
Se perder um amor, não se perca!
Se o achar, segure-o! (...) ”*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora, a Doutora Ana Cristina Santos, do departamento de Biofísica do IBILI/FMUC, por toda a confiança que depositou em mim, desde do início, e todo o apoio que me conferiu ao longo deste ano. Ao seu lado adquiri novos conhecimentos e cresci como profissional. Agradeço também a oportunidade de dar aulas ao seu lado, uma experiência que, certamente, será uma mais-valia para o meu futuro.

À Prof^a Doutora Mafalda Videira, do iMED da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, agradeço o ter-me permitido enveredar por este projecto e a parceria. Agradeço ainda, todo o material que me disponibilizou, por me ter recebido no seu laboratório e ter-me dado a oportunidade de adquirir experiência prática na produção de micelas poliméricas, factores que foram essenciais para o desenvolvimento desta tese.

Às Prof^{as} Doutoras Paula Veríssimo e Paula Morais, deixo o meu sincero agradecimento por me terem acompanhado ao longo do meu percurso académico e terem-se mostrado sempre prestáveis e disponíveis para ajudar os alunos nos seus problemas. Uma boa formação foi e será sempre uma componente importante, enquanto estudantes das Ciências da Vida.

À Prof^{as} Doutoras Paula Marques por aceitar ser minha orientadora interna, mantendo sempre o elo de ligação com o departamento Ciências da Vida, e por se mostrar sempre disponível para ajudar com qualquer dúvida.

À Mestre Bárbara Oliveiros da Unidade de Biofísica do IBILI, quero agradecer a amizade, dedicação e a paciência com todas as minhas dúvidas de análise estatística.

À Alexandra Arranjo, Bolseira do iMED, um especial obrigada, por toda a amizade, paciência e o apoio que me deu, na minha curta mas agradável estadia no iMED em Lisboa.

Aos meus colegas e amigos, quero agradecer toda a paciência e apoio, nos bons e maus momentos. Desde do início que me viram crescer enquanto Bioquímica e enquanto pessoa. Obrigada por todos os jantares, cafés e trabalhos em grupo, vocês contribuíram para que a minha passagem por Coimbra seja algo que vou lembrar para sempre com muita saudade e muito carinho. Apesar de indirectamente, contribuíram para que este trabalho pudesse existir.

Não posso deixar de destacar a Kathleen, a Raquel, a Sara, a Rita, o Teixo e o Gonçalo, pois foram as pessoas que mais me acompanharam este ano e me viram lutar, quase sempre com um sorriso na cara. A vocês o agradeço, pois todos os dias me lembram que a vida é feita de momentos efémeros conferidos por pequenos minutos de alegria ao lado daqueles que mais gostamos. A vossa amizade será sempre um factor chave deste percurso que foi Bioquímica, e sem dúvida que não teria o mesmo sabor se não estivessem presentes.

Em último, mas em especial, um agradecimento incalculável à minha família, e em particular aos meus pais e irmão, por terem estado sempre ao meu lado e terem feito com que este trabalho valesse a pena. Vocês foram, sem dúvida, o pilar do meu sucesso e as pessoas que mais me viram crescer e apoiaram, sem nunca julgar. A motivação, alegria, força, amor e confiança que sempre me proporcionaram, foram as motrizes deste trabalho e a vocês o dedico!

ÍNDICE

| | |
|---|-----|
| LISTA DE ABREVIATURAS | I |
| RESUMO | III |
| ABSTRACT | V |
| INTRODUÇÃO | 1 |
| 1. Nanotecnologia | 3 |
| 1.1 – Breve introdução e perspectiva histórica | 3 |
| 1.1.1 – Vantagens e Limitações | 5 |
| 1.1.2 – Propriedades das nanopartículas e sua actividade biológica..... | 6 |
| i. Potencial <i>zeta</i> | 6 |
| ii. Dimensões (diâmetro médio)..... | 7 |
| iii. Tempo de circulação e biodistribuição | 7 |
| a. Bevacizumab (Avastin [®])..... | 9 |
| v. Internalização do transportador | 10 |
| vi. Libertação controlada de fármacos..... | 12 |
| vii. Actividade <i>in vitro</i> | 13 |
| a. Macrófagos..... | 14 |
| b. Co-cultura | 15 |
| viii. Actividade <i>in vivo</i> | 16 |
| 1.2 – Sistemas de veiculação de fármacos | 17 |
| 1.2.1 – Nanopartículas Lipídicas Sólidas (SLN)..... | 18 |
| 1.1.2 – Micelas Poliméricas | 20 |
| 2. Cancro | 24 |
| 2.1 – Características da patologia | 24 |
| 2.1.1 – Morfologia do sistema endotelial..... | 25 |
| 2.1.2 – Metabolismo, pH e metastização | 26 |
| 2.1.3 – MDR..... | 26 |
| 2.2 – Cancro da mama | 27 |
| 2.3 – Terapia antineoplásica | 29 |
| 2.3.1 – Terapia de alvo passivo..... | 29 |
| 2.3.2 – Terapia de alvo activo | 30 |
| 2.3.3 – Paclitaxel..... | 31 |
| 3. Objectivos | 33 |
| MATERIAIS E MÉTODOS | 35 |
| 1. Produção e Caracterização de diferentes formulações de nanopartículas | 37 |
| 1.1 – SLN:..... | 37 |
| 1.2 – Micelas Poliméricas:..... | 37 |
| a. Preparação | 37 |
| b. Determinação do diâmetro médio e do potencial zeta | 38 |

| | |
|---|----|
| 2. Ensaio <i>in vitro</i> | 38 |
| 2.1 – Estudo de citotoxicidade para macrófagos peritoneais de rato..... | 38 |
| a. Animais | 39 |
| b. Isolamento e “cultura” de macrófagos peritoneais de rato | 39 |
| c. Avaliação da toxicidade de NP’s vazias | 40 |
| 2.2 – Efeito citotóxico frente a linhas celulares tumorais..... | 41 |
| a. Linha celular tumoral (MDA-MB-231) | 41 |
| b. Manutenção e cultura celular | 42 |
| c. Avaliação do efeito citotóxico de NP’s vazias e NP’s-Ptx | 42 |
| 2.2.1 – Estudos de Internalização de nanopartículas para a linha celular tumoral..... | 43 |
| a. Avaliação da internalização de NP’s por Microscopia Confocal | 43 |
| b. Estudo quantitativo da internalização celular de nanopartículas | 44 |
| c. Avaliação da percentagem de apoptose | 44 |
| 2.3 – Co-cultura | 45 |
| a. Estudo de condições de plaqueamento e manutenção celular..... | 45 |
| b. Avaliação do efeito citotóxico de NP’s-Ptx | 46 |
| 2.4 – Estudos <i>in vivo</i> | 46 |
| a. Animais | 47 |
| b. Preparação das células tumorais para injeção | 47 |
| c. Desenvolvimento de um modelo animal ectópico e monitorização tumoral | 47 |
| 2.5 – Análise estatística | 48 |
| RESULTADOS | 49 |
| 1. Produção e caracterização das NP’s formuladas | 51 |
| 2. Avaliação da toxicidade das NP’s para macrófagos peritoneais de rato | 52 |
| 3. Avaliação do efeito terapêutico para a linha celular MDA-MB-231 | 54 |
| 3.1 – Estudos de toxicidade de nanopartículas vazias | 54 |
| 3.2 – Estudos de citotoxicidade de nanopartículas contendo Paclitaxel..... | 56 |
| 3.3 – Internalização das nanopartículas | 61 |
| 3.4 – Avaliação da percentagem de apoptose induzida por diferentes formulações | 63 |
| 4. Avaliação da citotoxicidade perante uma co-cultura de macrófagos e células MDA-MB-231 | 64 |
| 5. Estudos <i>in vivo</i>: avaliação do desenvolvimento tumoral | 67 |
| DISCUSSÃO | 69 |
| CONCLUSÕES | 79 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 83 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | | | |
|-------|--|---------------|--|
| ANOVA | Análise de Variância | MRP | <i>Multidrug Resistance Associated Proteins</i> |
| ATCC | <i>American Tissue Type Culture Collection</i> | NK | <i>Natural Killer cells</i> |
| BMS | <i>Bristol-Myers Squibb</i> | NP's | Nanopartículas |
| CMC | Concentração Micelar Crítica | PARP | Polimerase de Poli(ADP-Ribose) |
| DDS | <i>Drug Delivery systems</i> | PCS | <i>Photon correlation spectroscopy</i> |
| DLS | <i>Dynamic Light Scattering</i> | PEG | Poli(etilenoglicol) |
| dm | Diâmetro médio | PEO | Poli(óxido de etileno) |
| Dox | Doxorubicina | P-gp | Glicoproteína-p |
| EI | Eficiência de Incorporação | PI | Iodeto de Propídeo |
| ER | Receptor de Estrogénio | Polox | Poloxâmero |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> | PPO | Poli(óxido de propileno) |
| HER-2 | Receptor de Factor de Crescimento Epidérmico 2 | PR | Receptor de Progesterona |
| HPLC | <i>High-performance Liquid Chromatography</i> | PS | Fosfatidilserina |
| i.m. | Intramuscular | Ptx | Paclitaxel |
| i.v. | Intravenoso | RPMI-1640 | <i>Roswell Park Memorial Institute (growth medium)</i> |
| IL-12 | Interleucina 12 | SEM | <i>Standard error of the median</i> |
| IP | Índice de Polidispersão | SEM• | <i>Scanning Electron Microscopy</i> |
| M-CSF | <i>Macrophage-Colony Stimulating Factor</i> | SLN | <i>Solid Lipid Nanoparticles</i> |
| MDR | <i>Multidrug Resistance</i> | SPCAL | Sociedade Portuguesa de Ciências em Animais de laboratório |
| MEM | <i>Non-Essential Amino Acid Solution</i> | TEM | <i>Transsmision Electron Microscopy</i> |
| MP | Micela Polimérica | TNF- α | Factor de Necrose Tumoral |
| MPS | Sistema Fagocitário Mononuclear | U.A. | Unidades Arbitrárias |

RESUMO

Actualmente, um dos grandes desafios é desenvolver novos transportadores farmacológicos que permitam potenciar o efeito de fármacos intensamente utilizados na prática clínica, ao mesmo tempo que se diminuem os seus efeitos nocivos. A Nanotecnologia tem-se mostrado uma área promissora no desenvolvimento de novos sistemas de transporte de fármacos, tendo efeito quer sobre a sua farmacocinética quer sobre a sua biodistribuição. As propriedades físico-químicas destas partículas conferem-lhes toda a sua actividade biológica, pelo que quanto mais completa for a sua caracterização, mais rápida será a sua optimização e modificação. As nanopartículas preparadas a partir de lípidos sólidos têm sido intensamente estudadas, comparativamente a outros sistemas coloidais, pois são facilmente produzidas e a sua dimensão (100 nm) já mostrou ser eficaz em termos de fuga ao sistema fagocitário, bem como para internalização celular. Desta forma, é possível aumentar a biodisponibilidade farmacológica, tirando partido de uma libertação controlada no espaço e no tempo, diminuindo-se a ocorrência de reacções sistémicas. Por outro lado, nos últimos anos, as micelas poliméricas têm surgido como transportadores promissores, graças à sua constituição anfifílica (Pluronic[®]), podendo ser usadas de forma individual ou em conjunto com partículas lipídicas. Estas micelas, além de possuírem todas as vantagens de um transportador dito ideal, propiciam ainda uma modificação da fluidez membranar, alterando também mecanismos de apoptose e extrusão ou resistência farmacológica.

O cancro é a segunda patologia com maior taxa de mortalidade a nível mundial, sendo o principal problema a falta de terapias alternativas, prendendo os pacientes a uma quimioterapia sistémica clássica, que tem associada inúmeros efeitos secundários. O adenocarcinoma de mama avançado e metastático tem uma elevada incidência no sexo feminino, sendo das principais causas de morte por neoplasias sólidas. O principal problema associado a este carcinoma dá-se ao nível do subtipo triplo negativo (ER-/PR-/HER2-), que não responde a qualquer tipo de terapia endócrina, sendo a cirurgia e a quimioterapia clássica a única alternativa para estas doentes. Assim, há uma elevada taxa de mortalidade associada a este tipo de tumor, sendo recorrente a formação de metástases pulmonares e ósseas que pioram o prognóstico e a qualidade de vida.

Neste trabalho pretendeu avaliar-se o efeito terapêutico de novas nanopartículas lipídicas e micelas poliméricas, contendo Paclitaxel (um fármaco antimitótico da família dos taxanos, usado rotineiramente na prática oncológica), sobre uma linha celular de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231), aferindo-se também a toxicidade para macrófagos peritoneais de rato. Concluiu-se que todas as formulações testadas não apresentavam toxicidade significativa para as células fagocitárias e apresentavam valores de IC50 significativamente inferiores aos do fármaco livre. Uma formulação particular, cuja superfície continha Polietilenoglicol mostrou ser a mais promissora, sendo internalizada de forma eficaz pela célula, apresentando ainda capacidade de indução de apoptose por parte do polímero, o que poderá potenciar o efeito terapêutico do sistema nanopartículas e fármaco encapsulado. Estudos preliminares em co-culturas de células permitiram concluir que há um possível efeito citotóxico secundário mediado pelos macrófagos tumorais residentes, quando colocados em contacto com as nanopartículas desenvolvidas e o desenvolvimento de um modelo animal ectópico irá permitir avaliar o efeito terapêutico *in vivo* destas partículas, confirmando ou não o seu sucesso nos ensaios *in vitro*.

A procura de partículas capazes de encapsular fármacos oncológicos potentes, maximizando a sua actividade junto ao alvo tumoral, é uma área emergente, mas existem ainda muitas lacunas neste tipo de estudos, sendo o principal desafio a optimização e a produção de um transportador capaz de aumentar o prognóstico terapêutico, melhorando a qualidade de vida dos doentes oncológicos e conferindo uma ampla escolha de opções terapêuticas alternativas.

Palavras-chave: Nanotecnologia; *Solid Lipid Nanoparticles (SLN)*; Micelas Poliméricas; Cancro da mama; Sistemas de entrega de fármacos (DDS).

ABSTRACT

Nowadays, one of the major challenges is to develop new drug delivery systems that can enhance the effect of drugs already widely used in the clinic, while diminishing their side effects. Nanotechnology has risen as a promising area in pharmacological delivery systems, as it allows a higher pharmacokinetic and biodistribution. The physicochemical properties of these particles are responsible for its overall biological activity, being their complete characterization very important for a faster and more efficient optimization and modification. Nanoparticles prepared from solid lipids have been thoroughly studied, comparing to other colloidal systems, and are easily produced. Their small size (100 nm) is responsible for an efficient escape from phagocytic cells, as well as cell internalization. Thus, these particles are responsible for higher drug availability, allowing a controlled drug release in spatial and time context, while decreasing systemic reactions. On the other hand, polymeric micelles have also been suggested as promising drug vehicles and their most important feature is an amphiphilic matrix (Pluronic[®]), which can be used individually or together with lipid nanoparticles, forming a hybrid. These micelles have all the advantages conferred to other drug delivery systems as well as the possibility of altering cell membrane fluidity and modification of intracellular processes of apoptosis or drug exclusion and resistance.

Cancer is the second leading cause of death worldwide and the lack of alternative therapies maintain patients' dependent on a classic chemotherapy which is associated to many side effects. The most incident form of cancer amongst women is the advanced and metastatic breast cancer, being responsible for a high death rate in this population. The main problem is due to a triple negative cell subtype (ER-/PR-/HER2-), that responds poorly to endocrine therapies, thus surgery and systemic chemotherapy are the only treatment options for these patients. Hence this disease has a high death rate, mainly due a large lung and bone metastatic rate, worsening prognosis and quality of life.

This study intends to contribute for the evaluation/achievement of a therapeutic effect of new lipid nanoparticles and polymeric micelles containing encapsulated Paclitaxel (an antimitotic drug from the taxane family, routinely used in clinical oncology), using a breast cancer cell line (MDA-MB-231), as well as their toxicity for peritoneal rat macrophages. It was concluded that all formulations had little or no significant toxicity for the phagocytic cells and presented significantly lower IC50 values, when compared to the free drug. A particular formulation, containing a modified surface with polyethylene glycol, seemed very promising in terms of drug delivery, as it was efficiently internalized by the cells, and had an apoptosis capacity, potentiating the pharmacological value of the nanoparticle system. Preliminary studies with a cell co-culture, showed a possible secondary toxicity induced by local tumor macrophages, when incubated with nanoparticles. In addition, the developed ectopic mouse model will be important for a complete evaluation of the overall therapeutic efficiency of the new particles, confirming or not the successful results obtained *in vitro*.

The search for new delivery systems, able to encapsulate potent drugs, and maximizing their activity in proximity with the tumor target, is an emerging domain. However, there are still many gaps concerning these studies, and the main challenge is to optimize and produce a vehicle capable of increasing the therapeutic prognosis, while improving the patients' life quality, hence, expanding their therapeutic options.

KEYWORDS: Nanotechnology; *Solid Lipid Nanoparticles (SLN)*; Polymeric Micelles; Breast Cancer; Drug delivery systems (DDS).

INTRODUÇÃO

1. Nanotecnologia

1.1 – Breve introdução e perspectiva histórica

A nanotecnologia define-se como a produção e modificação de materiais, dispositivos e sistemas de dimensões da ordem do(s) nanómetro(s) (1 a 100 nm, geralmente). Esta tecnologia permite a modificação e optimização das propriedades físicas, químicas e biológicas das partículas e, portanto, tem uma aplicação vasta nas áreas da Medicina, Farmacologia, Electrónica, Química, etc. [Ochekpe, *et al.* 2009]. Os componentes destas partículas podem ser de origem orgânica e/ou inorgânica e, consoante o método de formulação usada na sua produção, podem obter-se sistemas de variadas formas (esférica, em forma de concha ou ramificada), dimensões, diferentes propriedades químicas, físicas e biológicas. A nanotecnologia tem-se mostrado promissora, sendo usada como meio de diagnóstico ou terapêutica e, recentemente, com uma co-função de ambos. Obtêm-se, assim, diferentes tipos de nanopartículas (NP's), tais como: nanosuspensões e nanocristais, nanopartículas lipídicas sólidas, nanotubos, nanopartículas poliméricas (nanoesferas e nanocápsulas), nanopartículas metálicas ou cerâmicas, podendo também considerar-se os liposomas e os dendrímeros (Fig. 1). A nanobiotecnologia é uma área recente que deriva da nanotecnologia, mas com aplicação específica às Ciências da Vida, sendo intensamente explorada na área da transporte de fármacos [Hu, *et al.* 2012; Kayser, *et al.* 2005; Yih, *et al.* 2006].

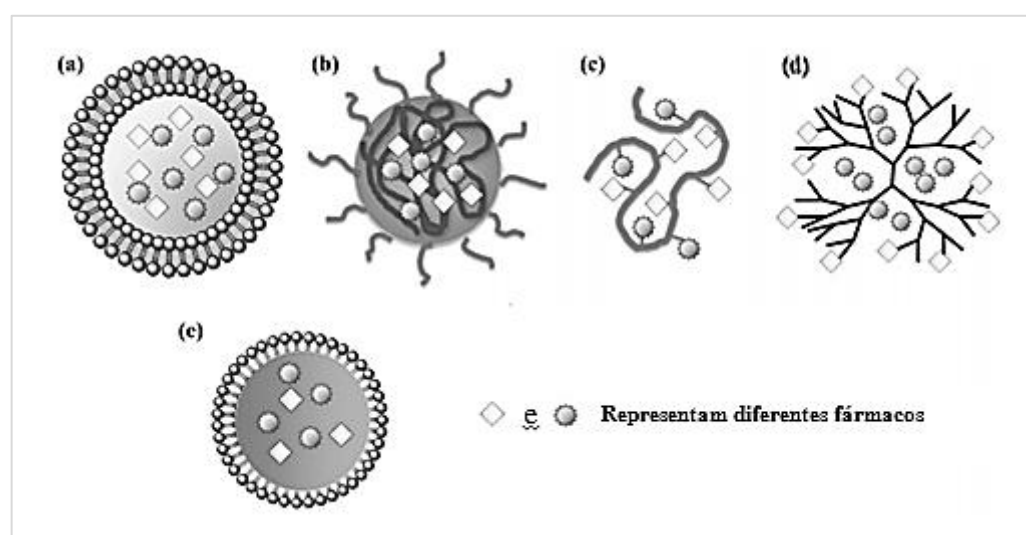


Figura 1. Diferentes transportadores usados em nanomedicina aplicada ao transporte de fármacos, sendo alguns já utilizados em terapia clínica e pré-clínica: a) liposomas; b) micela polimérica; c) conjugado unímeros-fármaco; d) dendrímeros; e) nano emulsão ou SLN (adaptado de: Hu, *et al.* 2012).

Este campo tem sido amplamente estudado, principalmente na área dos *Drug Delivery Systems* (DDS), pois permite ultrapassar vários problemas associados ao fármaco livre, que serão mencionados mais à frente. Apesar de ser considerada uma ciência recente, a nanotecnologia ou nanobiotecnologia já era utilizada no século IX pelos gregos, uma vez que nanopartículas de ouro e prata eram usadas nos vasos de cerâmica para produzir um efeito brilhante e decorativo [Singh, *et al.* 2011]. Em 1857, Michael Faraday foi o primeiro a descrever as propriedades das partículas com dimensões na ordem do nanómetro e, finalmente, no início do século XX, Paul Ehrlich propôs o conceito de “Bala Mágica”. Esta consistia numa partícula transportadora de fármacos para um alvo específico, com um tamanho pequeno o suficiente para ultrapassar diversas barreiras fisiológicas e celulares. Desta forma, a biodisponibilidade do fármaco seria aumentada, diminuindo-se os possíveis efeitos secundários associados à sua forma livre. Nas décadas de 1950 e 1960, esta área teve uma progressão notória, tendo sido primeiramente reconhecida a sua importância num discurso de Richard Feynman (“...*there is plenty of room at the bottom.*”), que focou as vantagens da manipulação de materiais de nano dimensões e a sua vasta aplicação. Ainda nesta época, destacou-se o Professor Peter Paul Speiser, que se pensa ter sido o pioneiro da nanotecnologia aplicada à

Biofarmácia. A sua equipa desenvolveu *beads* de poliacrilamida para administração oral e, mais tarde, focou o seu trabalho em microcápsulas, desenvolvendo, por fim, as primeiras nanopartículas para transporte de fármacos e vacinas. Todavia, apesar deste rápido desenvolvimento da área, foi apenas em 1974 que Norio Taniguchi, um investigador de Tóquio, usou o termo “Nanotecnologia” para se referir aos materiais de pequeno tamanho. Em 1980, Eric Dexler publicou o primeiro artigo científico desta área, revolucionando toda a nanotecnologia [Kreuter 2007; Ochekepe, *et al.* 2009; Singh, *et al.* 2011]. O final do século XX e início do século XXI ficaram marcados pelo desenvolvimento de nanopartículas capazes de transportar de forma direccionada fármacos, macromoléculas e vacinas, para um determinado tecido ou célula, sempre com o objectivo de minimizar os efeitos tóxicos do componente específico (Fig. 2). Foram já efectuados vários estudos ao nível da aplicação de nanopartículas no transporte de substâncias antineoplásicas e fármacos antivirais ou antibacterianos, sendo a aplicação mais promissora o transporte de componentes nano através da barreira hematoencefálica [Kreuter 2007].

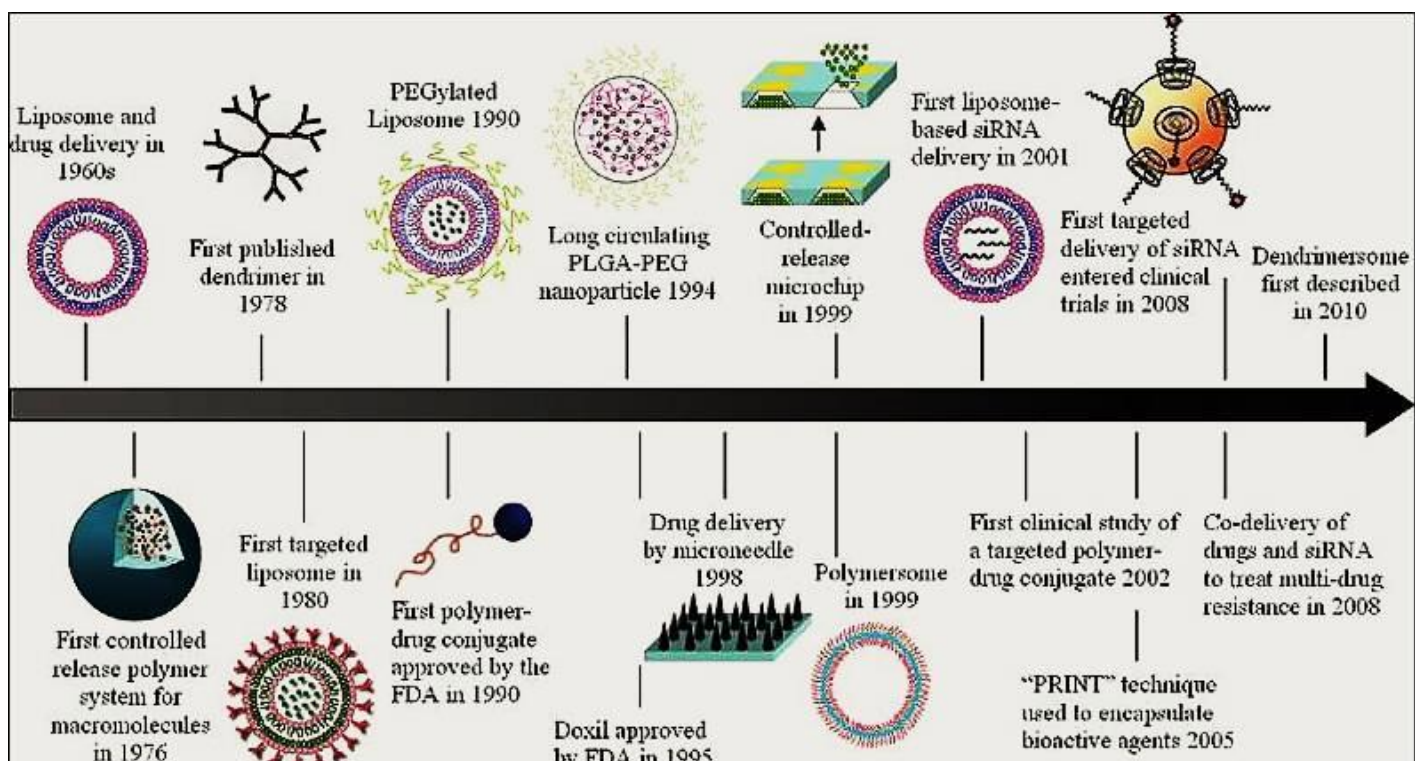


Figura 2. Escalas do desenvolvimento temporal da área da nanotecnologia associada ao transporte de fármacos, proteínas, ADN, ARN, etc.. Destacam-se alguns dos acontecimentos marcantes da história da nanotecnologia (retirado de Shi, *et al.* 2010).

Como já foi mencionado, é na área dos DDS que a nanotecnologia se mostra em franco e activo crescimento. Espera-se que o mercado global das NP's associadas à Medicina/Farmacologia, cresça entre 70-160 biliões de dólares até 2015 [Shi, *et al.* 2010]. Desde do uso de liposomas nos anos 60 até hoje, a nanotecnologia ou, mais concretamente, a nanomedicina tem tido aplicação a nível terapêutico para diversas patologias, como dispositivos na investigação e ainda a nível de diagnóstico e imagem. Surgiu então o conceito de “teranóstico”, em que a NP é usada numa estratégia terapêutica, aliada ao diagnóstico *in situ* e ainda o uso de mais do que uma substância encapsulada para a coentrega de fármacos [Parveen, *et al.* 2012; Shi, *et al.* 2010; Sinha, *et al.* 2006].

Estatisticamente, estima-se que existem cerca de 363 produtos com potencial em nanomedicina. Destes, 38 já foram aprovados e os restantes encontram-se em fase de investigação ou em fase clínica. Estes produtos são utilizados na terapêutica de patologias como o cancro, doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias/imunitárias, doenças degenerativas, etc.. e, ainda, em imagiologia médica [Etheridge, *et al.* 2013]. Em termos clínicos, os exemplos mais conhecidos passam pela aprovação da FDA nos anos 90 do Doxil® [Barenholz 2012] e Daunoxome® (liposomas pegilados,

contendo Doxorubicina (Dox) e Daunorubicina, respectivamente) para o tratamento do sarcoma de Kaposi e do Abraxane® [contendo Paclitaxel (Ptx) encapsulado em nanopartículas associadas a albumina] para a terapia de cancro da mama metastático. Na Europa, temos o exemplo do Myocet®, um liposoma não-pegilado que encapsula Dox [Cho, *et al.* 2008; Farrell, *et al.* 2011; Haley, *et al.* 2008; Parveen, *et al.* 2012]. Apesar deste aparente sucesso, esta área ainda tem diversas limitações e a optimização de muitas formulações é crucial para que se passe à fase seguinte. É importante salientar que a passagem de uma simples teoria à utilização prática de um novo produto é algo que requer muito trabalho, tempo e, por isso mesmo, bastante dispendioso, pelo que se torna necessário criar um plano a longo prazo [Etheridge, *et al.* 2013].

1.1.1 – Vantagens e Limitações

Os principais objectivos da utilização de nanopartículas na área dos DDS consistem no controlo das dimensões da partícula, bem como da sua constituição química e características físicas e biológicas, de modo a conseguir um transporte eficiente e libertação controlada do fármaco. Assim, na preparação de transportadores de dimensões do nanómetro, devem ter-se em conta parâmetros como: o diâmetro médio (dm), propriedades intrínsecas do fármaco, carga/características de superfície do transportador, biocompatibilidade, biodistribuição, toxicidade e possível indução de reacções imunológicas (antigenicidade) [Mohanraj, *et al.* 2006]. Deste modo, este tipo de partículas vai possuir múltiplas vantagens, tais como:

- ✓ multidisciplinaridade, em que se alia a estrutura/função de biomoléculas com a aplicação em áreas como a biotecnologia, terapia génica, transporte de fármacos, imagiologia, biossensores e biomarcadores [Ochekpe, *et al.* 2009; Panyam, *et al.* 2003];
- ✓ devido ao seu tamanho e à possível manipulação deste, estas partículas conseguem chegar a áreas profundas do organismo, tirando partido da via endocítica celular e ultrapassando estruturas anatómicas como a barreira hematoencefálica, epitélio da pele, capilares pulmonares e tumores [Efeito de Permeabilidade e Retenção (EPR)] [Ochekpe, *et al.* 2009; Panyam, *et al.* 2003; Rawat, *et al.* 2006; Sahoo, *et al.* 2003; Shi, *et al.* 2010];
- ✓ permitem o encapsulamento de diversas moléculas como siRNA, ADN, proteínas e, ainda, de fármacos;
- ✓ a sua produção e manipulação, em termos de tamanho e componentes bioquímicas, permite aumentar o tempo de circulação, pois não são reconhecidos pelo sistema fagocitário mononuclear (MPS), e aumentar a sua especificidade para o alvo;
- ✓ em termos de transporte de fármacos há um aumento da sua solubilidade, protecção da sua degradação via encapsulamento, maior biodistribuição, especificidade e libertação constante e controlada do fármaco, diminuindo a citotoxicidade e a dose, alterando-se assim o perfil farmacocinético e de administração [Rawat, *et al.* 2006; Shi, *et al.* 2010];
- ✓ os novos transportadores permitem reformular fármacos antigos com menores custos do que a descoberta de novas moléculas. A reformulação leva a uma minimização dos efeitos secundários de fármacos livres e, conseqüentemente, a uma maior aderência por parte dos doentes, reduzindo-se os custos associados à saúde. Aumenta também o tempo da propriedade farmacológica em termos de patente [Hughes 2005; Ochekpe, *et al.* 2009; Sahoo, *et al.* 2003].

Todavia, apesar de todas estas vantagens, esta tecnologia inovadora tem também algumas limitações, sendo o principal objectivo ultrapassar estes problemas. Devido ao pequeno tamanho das partículas, a sua manipulação durante a produção pode tornar-se difícil formando-se agregados, o que pode levar a uma limitação na eficiência de incorporação (EI) do fármaco, bem como rebentamento da partícula [Mohanraj, *et al.* 2006; Rawat, *et al.* 2006]. Apesar destas partículas mostrarem inúmeras vantagens, em termos de circulação e chegada a locais de difícil acesso, isto pode tornar-se um problema, pois sabe-se que nestes locais, estes transportadores têm a capacidade de provocar reacções inflamatórias

indesejadas. Já foi observado o desenvolvimento de diversas patologias a nível gastrointestinal, pulmonar, cardiovascular, sistema nervoso periférico (entrada de nanopartículas ao nível dos axónios) e ainda a nível cerebral. O maior desafio actual é o desenvolvimento de transportadores eficazes, capazes de atravessar a barreira hematoencefálica para tratamento de tumores, com o mínimo de efeitos inflamatórios locais [Surendiran, *et al.* 2009]. Actualmente, é de grande interesse ultrapassar o problema destas partículas poderem transportar pequenas moléculas que, após ultrapassarem a membrana celular e nuclear, possam vir a provocar danos genéticos irreversíveis e mutações [Rawat, *et al.* 2006].

1.1.2 – Propriedades das nanopartículas e sua actividade biológica

Tendo em conta este tipo de tecnologia de transporte de fármacos, os parâmetros mais importantes e que mais influenciam o processo são: o tipo e as dimensões do sistema, a sua carga, propriedades de superfície, interacção com proteínas do soro/MPS e a internalização do transportador. Estes parâmetros vão ser importantes para determinar a eficácia terapêutica do sistema, ou seja, capacidade de incorporação do fármaco e o modo como ocorre a sua libertação e, ainda, toda a farmacocinética, biodistribuição e actividade fisiológica [Dobrovolskaia, *et al.* 2008; Fadeel, *et al.* 2010; Moghimi, *et al.* 2000; Mosqueira, *et al.* 2001].

i. Potencial zeta

As propriedades referentes à superfície da NP são também importantes para determinar o seu percurso biológico, influenciando a sua interacção com determinadas proteínas e componentes do soro e do sangue, bem como a sua internalização celular. Em termos de carga de superfície, temos o potencial *Zeta* do sistema¹, que pode originar uma partícula catiónica ou aniónica. Este factor reflecte o potencial eléctrico da partícula e é influenciado pela sua composição em termos de material do transportador, bem como dos fármacos ou componentes que foram encapsulados. Foi demonstrado que partículas com um potencial acima de -30 mV e abaixo de +30 mV são mais estáveis em suspensão e apresentam menor agregação. Demonstraram que partículas neutras apresentam menores taxas de opsonização relativamente a partículas altamente carregadas [Swami, *et al.* 2012]. Estes dados foram confirmados por um estudo de Xiao *et al.* (2011) que avaliou o efeito de partículas com o mesmo tamanho, mas cargas diferentes, quando incubadas com macrófagos de ratinho. Os resultados mostraram que partículas com um potencial muito negativo ou muito positivo eram facilmente internalizadas pelos macrófagos, tendo o ensaio de hemólise confirmado a alta imunogenicidade de partículas catiónicas [Xiao, *et al.* 2011]. O tipo de proteínas adsorvidas difere com a carga de superfície, sendo partículas catiónicas responsáveis pela ligação a proteínas do soro (por exemplo, albumina) e partículas aniónicas facilmente opsonizadas por IgG. NP's altamente hidrofóbicas são mais facilmente retiradas da circulação, sendo a estratégia de utilização de PEG e outros polímeros hidrofílicos na superfície de DDS importante para a sua funcionalização. As partículas devem, portanto, apresentar uma superfície neutra ou relativamente negativa, por forma a não interagir com o sistema imunitário ou com proteínas do soro, garantindo uma actividade biológica máxima [Aggarwal, *et al.* 2009]. Assim, a estabilidade *in vivo* de diferentes NP's, o seu tempo de circulação e farmacocinética, são factores determinados pela carga do DDS [Mohanraj, *et al.* 2006]. As técnicas mais usadas para determinar o potencial *Zeta* de partículas são: espectroscopia de correlação de fotões (PCS – *Photon*

¹ Potencial *Zeta* - quase todos os materiais macroscópicos ou particulados em contacto com um líquido adquirem uma carga eléctrica na sua superfície. A carga líquida na superfície da partícula influencia a distribuição de iões na sua vizinhança, aumentando a concentração de iões de carga contrária junto à superfície. Deste modo, forma-se uma dupla camada eléctrica na interface partícula-líquido. Num campo eléctrico cada partícula e os iões que lhe estão mais fortemente ligados movem-se como um todo e o potencial no plano de cisalhamento entre esse todo e o meio circundante designa-se por potencial *Zeta*. Quando uma camada de macromoléculas é adsorvida à superfície da partícula, ela move o plano de cisalhamento para longe da superfície e altera o potencial *Zeta*. Assim, este potencial é função da carga de superfície da partícula, de qualquer camada adsorvida na interface com o meio e da natureza e composição do meio que a rodeia. O potencial *Zeta* pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais. Quanto maior este potencial, mais provável é que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas repelem-se entre si e essa força supera a tendência natural para a agregação.

correlation spectroscopy), dispersão dinâmica de luz (DLS – *Dynamic Light Scattering*) [Fadeel, *et al.* 2010; Jones, *et al.* 2009; Mohanraj, *et al.* 2006].

ii. Dimensões (diâmetro médio)

Tendo em conta as dimensões do sistema, a ordem de grandeza do nanómetro tem mostrado inúmeras vantagens comparativamente ao micrómetro, pois tem um maior número de alvos terapêuticos [chegada a locais como a pele (camada epitelial), pequenos capilares, axónios e capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica]. Um estudo específico comparou a influência do tamanho na internalização celular, tendo-se concluído que 1 µm de nanopartículas resultou numa internalização cerca de 2,5 vezes maior que 10 µm de micropartículas em células da linha Caco-2 [Panyam, *et al.* 2003]. Esta ordem de grandeza afecta também a libertação do fármaco, uma vez que partículas mais pequenas têm uma maior área de superfície e, portanto, uma libertação mais rápida e com risco de agregação do sistema. Por outro lado, partículas maiores permitem um maior rendimento de encapsulamento e uma libertação mais lenta, mas com elevada hipótese de reconhecimento pelo sistema MPS. É, assim, importante obter uma nanopartícula de dimensões pequenas, mas com elevada estabilidade, algo que pode ser bastante difícil em termos de biotecnologia [Mohanraj, *et al.* 2006].

As técnicas mais usadas para determinar o tamanho das partículas formuladas são: espectroscopia de correlação de fótons (PCS – *Photon correlation spectroscopy*), dispersão dinâmica de luz (DLS – *Dynamic Light Scattering*), tal como para o potencial *Zeta*, com posterior confirmação por Microscopia Electrónica de Transmissão (TEM) ou de varrimento (SEM) [Fadeel, *et al.* 2010; Mohanraj, *et al.* 2006].

iii. Tempo de circulação e biodistribuição

Um factor importante associado ao tamanho e às propriedades de superfície destes transportadores é o seu tempo de circulação. Sabe-se que um dos maiores problemas para partículas de pequenas dimensões é a sua rápida eliminação do sistema circulatório via macrófagos ou, mais concretamente, pelo sistema MPS e a interacção com componentes do soro/sangue [Dobrovolskaia, *et al.* 2008; Mosqueira, *et al.* 2001]. O reconhecimento dá-se maioritariamente através de componentes específicos à superfície do transportador (opsoninas) que são adicionadas, pois o organismo reconhece este sistema hidrofóbico como estranho. Assim, o sistema é fagocitado pelos macrófagos, sendo as partículas encaminhadas para o fígado, pulmões, medula óssea e baço. Uma das tentativas de fuga a este sistema é a modificação da superfície do sistema terapêutico. No entanto, se o alvo a tratar for o sistema MPS pode optar-se por um sistema hidrofóbico mais simples, que seja efectivamente fagocitado, por exemplo, patologias hepáticas e pulmonares, enquanto para outros alvos é necessário diminuir esta opsonização (estas propriedades encontram-se sumariadas no Quadro 1). Assim, para aumentar o tempo de circulação *in vivo*, procede-se à associação de polímeros/surfactantes hidrofílicos à superfície do sistema ou usa-se PEG [Hans, *et al.* 2002; Mohanraj, *et al.* 2006].

Quadro 1. Propriedades de NP's que influenciam a opsonização e adsorção de proteínas. Efeito de diferentes revestimentos sobre a biodistribuição de partículas (adaptado de: Aggarwal, *et al.* 2009).

| Propriedades das NP's | Observação/efeito | Revestimento | Adsorção de proteínas (comparação com NP's sem revestimento) | Prevenção de biodistribuição via RES (<i>in vivo</i>) |
|--|--|-------------------------|--|---|
| Carga de superfície | NP's neutras têm menor opsonização. | PEG | Menor | Sim |
| Hidrofobicidade | Influência na taxa de opsonização e no tipo de proteína adsorvida (têm menor tempo de circulação que NP's hidrofílicas). | Poloxâmero | N/A | Sim |
| | | Dextrano | Menor | N/A |
| | | Poliassorbato | N/A | N/A |
| Tamanho/morfologia/ curvatura de superfície | Influencia a quantidade de proteínas adsorvidas, mas não o tipo. | Pluronic F127 | Menor | N/A |
| | | Poli (óxido de etileno) | Menor | N/A |

Este polímero possui propriedades físico-químicas próprias, tendo uma baixa toxicidade e imunogenicidade. O PEG cria uma camada hidrofílica ou hidratada, cujas ramificações a tornam flexível, diminuindo a interação da partícula com proteínas do soro, bem como a opsonização dessa NP [Mosqueira, *et al.* 2001]. Quanto mais densa e maior for a cadeia de PEG, mais eficaz será o sistema relativamente à sua actividade biológica. Isto porque uma cadeia menor forma uma conformação tipo “cogumelo”, onde as cadeias de PEG estão muito próximas da superfície do transportador, mantendo uma certa proximidade e interação da NP com o meio envolvente. Há medida que se aumenta o tamanho da cadeia de PEG formam-se ramificações que se estendem para fora da superfície do transportador (configuração “brush”) (Fig. 3), protegendo-o contra interações não-favoráveis [Owens, *et al.* 2006; Swami, *et al.* 2012]. Concluindo, em termos de dimensões, o nanotransportador deve ser da ordem dos 100 nm, de modo a poder ultrapassar o problema da fagocitose, ter um tempo de circulação mais longo e, ainda, penetrar em determinados locais do organismo, tais como tumores e outros, como acima mencionado [Cho, *et al.* 2008; Swami, *et al.* 2012]. As NP's podem ainda apresentar diferentes morfologias que também afectam o tamanho, carga e internalização da partícula [Fadeel, *et al.* 2010; Torchilin 2001].

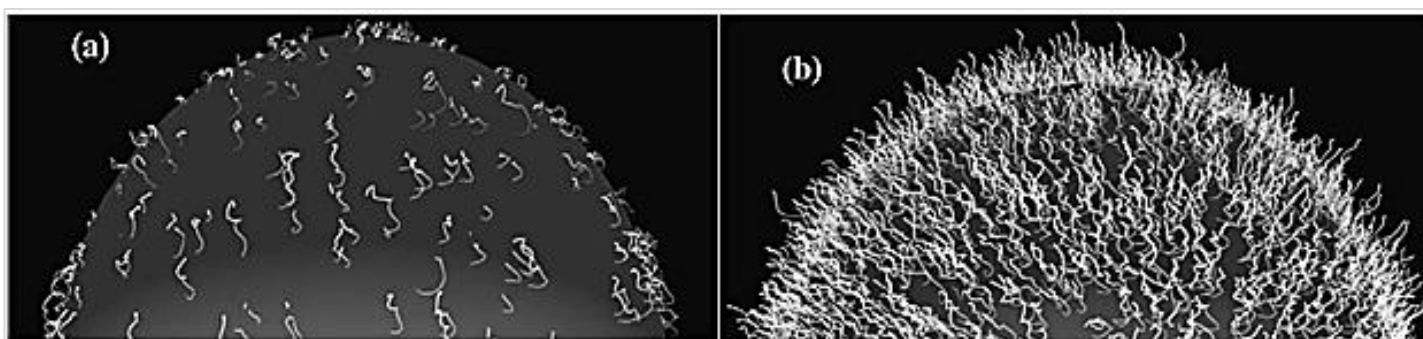


Figura 3. Esquema ilustrativo das configurações de PEG na superfície de uma NP polimérica. Em (a), observa-se uma baixa densidade de cobertura de PEG, formando-se uma configuração tipo “cogumelo”, onde as cadeias se encontram próximas da superfície do polímero. Em (b), observa-se a configuração “brush”, em que as cadeias de PEG se estendem a partir da superfície, formando-se uma camada hidrofílica muito densa (retirado de: Owens, *et al.* 2006).

iv. Superfície do transportador: direccionamento biológico

A terapia convencional oncológica, apesar de ter melhorado a percentagem de sobrevivência dos doentes, apresenta ainda diversos efeitos nefastos e é pouco selectiva em termos de células tumorais. Aposta-se cada vez mais na introdução de novas formulações com capacidade de transporte de fármacos, tirando partido de diferentes vias de administração, com doses inferiores e um transporte mais selectivo para o alvo terapêutico. Este processo de entrega activa baseia-se nas modificações da superfície do DDS, permitindo uma optimização do transportador e uma maior especificidade para um determinado alvo [Brannon-Peppas, *et al.* 2004]. Podem associar-se anticorpos, pequenas proteínas, glúcidos e determinados ligandos específicos (transferrina, folato, etc.) de modo a alterar a biodistribuição e farmacocinética do transportador, sendo uma estratégia amplamente explorada nas novas terapias antineoplásicas [Sinha, *et al.* 2006]. As NP's simples já conseguem tirar partido do efeito de EPR de tumores sólidos (transporte passivo), havendo uma acumulação do fármaco cerca de 10 a 100 vezes superior a uma administração do fármaco livre. Tendo isto em conta, é facilmente previsível que um transporte activo, após uma modificação eficiente do transportador, irá facilitar não só a chegada ao tumor, mas uma maior taxa de internalização e acumulação farmacológica no citoplasma [van Vlerken, *et al.* 2006].

Uma estratégia de direccionamento amplamente usada é a conjugação de anticorpos na superfície do transportador. Estas moléculas são proteínas com peso molecular de cerca de 150 kDa, que permitem reconhecer antígenos específicos de células tumorais, aumentando a internalização selectiva do transportador. Alguns anticorpos usados na clínica estão resumidos no trabalho de Chari (2007) e Brannon-Peppas (2004) [Brannon-Peppas, *et al.* 2004; Chari 2007].

a. Bevacizumab (Avastin[®])

Uma terapia muito estudada em oncologia é o uso de compostos antiangiogénicos. A angiogénese define-se como o processo de formação de novos vasos sanguíneos e é importante para a renovação e reparação de células endoteliais, bem como para a chegada de nutrientes e oxigénio a locais confinados de tumores. Isto torna-se importante, quer para a proliferação tumoral, quer para a metastização. O factor de crescimento vascular do endotélio (*Vascular Endothelial Growth Factor* - VEGF) é o principal modulador deste processo, promovendo a formação de vasos sanguíneos e linfáticos, enquanto expressa, também, proteínas anti-apoptóticas como a Bcl-2 e A1 [Shojaei 2012]. Este factor é sobreexpresso em diversos tumores (pulmão, mama, gastrointestinal, colorectal e carcinoma do ovário) *in situ*, sendo a expressão variável entre tumores e dentro do mesmo tumor. Foi em 1993 que se observou pela primeira vez que um anticorpo monoclonal de rato anti-VEGF humano, tinha um efeito antiangiogénico potente e em 1997, através de uma mutagénese dirigida, procedeu-se à “humanização” deste anticorpo (~93% humano e ~7% rato), desenvolvendo-se o Bevacizumab (Beva) [Ferrara, *et al.* 2004; Gerber, *et al.* 2005]. Este composto foi aprovado em 2003 pela *Food and Drug Administration* – FDA, como um fármaco antiangiogénico com o nome de Avastin[®] (Genentech Inc). Apesar de ter sido aprovado para a primeira linha de tratamento de cancro colorectal, dada a elevada expressão de VEGF noutros carcinomas, já existem imensos estudos onde se usa Beva como coadjuvante da quimioterapia [Brannon-Peppas, *et al.* 2004; Wang, *et al.* 2004]. No entanto, a taxa de sobrevivência geral com a utilização deste composto tem tido resultados controversos, havendo ainda alguma dúvida sobre a verdadeira eficácia terapêutica deste composto, comparando com monoterapias de outros fármacos como o Paclitaxel (Ptx) e Docetaxel, tendo a FDA removido a licença de utilização do Beva em terapias oncológicas combinadas [Johnston 2011].

Existem dois receptores de VEGF principais: o VEGFR-2 e VEGFR-1, sendo o mecanismo do segundo ainda pouco conhecido. De acordo com a literatura, o Beva exerce a sua função inibindo e neutralizando o efeito do VEGF sobre os seus receptores, no entanto este não provoca uma lise celular directa, pelo que se coloca a hipótese de que não haverá interacção deste fármaco com os receptores, mas sim sequestro do VEGF solúvel e impedimento da sua ligação aos respectivos

receptores [Wang, *et al.* 2004]. Os tumores são conhecidos por possuírem um endotélio h perperme vel e mal estruturado, que limita a ac o de agentes citotóxicos. Este fármaco provoca a normaliza o, diminui o da densidade e fluxo do endotélio tumoral (estudos em xenoenxertos de modelos animais), havendo altera o da permeabilidade do tumor e conseqüente redu o da neoplasia [Gerber, *et al.* 2005; Salvador, *et al.* 2008]. Tendo em conta a pequena porão de anticorpo derivado de ratinho, seria de esperar alguma reac o imunitária perante a administra o de Beva, todavia, um estudo efectuado na espécie *Macaca fascicularis* (macaco) provou a segurança clínica deste fármaco, não havendo reac o sist mica. Quando usado com outros agentes terapêuticos, não ocorre altera o farmacológica destes por parte do Beva, concluindo-se então, que este inibidor angiog nico   promissor como molécula de direccionamento, aumentando a internaliza o do DDS, tendo um perfil clínico seguro (dose máxima de 50 mg/kg) e pode resultar como possível adjuvante terapêutico [Ferrara, *et al.* 2004; Gerber, *et al.* 2005; Xu, *et al.* 2008].

v. Internaliza o do transportador

A principal vantagem na utiliza o de NP's, como transportadores farmacológicos,   a possibilidade de não são direccionar o fármaco para o alvo de interesse, mas também facilitar a internaliza o desse mesmo fármaco, de modo a diminuir a dose e efeitos secundários associados a uma administra o terapêutica convencional e frequente. No entanto, a entrada na célula e o percurso intracelular de muitos transportadores ainda   um parâmetro limitado e pouco conhecido [Xu, *et al.* 2013]. O percurso biológico de um fármaco   determinado por factores já mencionados anteriormente, como as dimensões, forma, carga, distribui o, elimina o e metabolismo. A encapsula o eficiente em DDS permite melhorar as propriedades farmacológicas e fisico-químicas de um fármaco, aumentando a sua concentra o junto do tumor e, conseqüentemente, a probabilidade deste ser internalizado pelas células. Consoante a natureza do transportador (polimérico, lipídico ou inorgânico), este pode explorar diferentes vias de internaliza o e taxas de liberta o do fármaco. As principais vias envolvidas na entrada de NP's nas células passam pela via endocítica, dependente e independente de claterina, ocorrendo internaliza o via endocitose, fagocitose ou pinocitose e posterior encaminhamento da partícula para a via endocítica e liberta o intracelular do fármaco (Fig. 4). Esta capacidade de entrar na célula, aliada a uma possível inibi o da glicoproteína-p (P-gp), torna-se vantajosa para ultrapassar o problema da resistência de células tumorais a determinados fármacos (*Multidrug resistance* – MDR) [Serpe 2007].

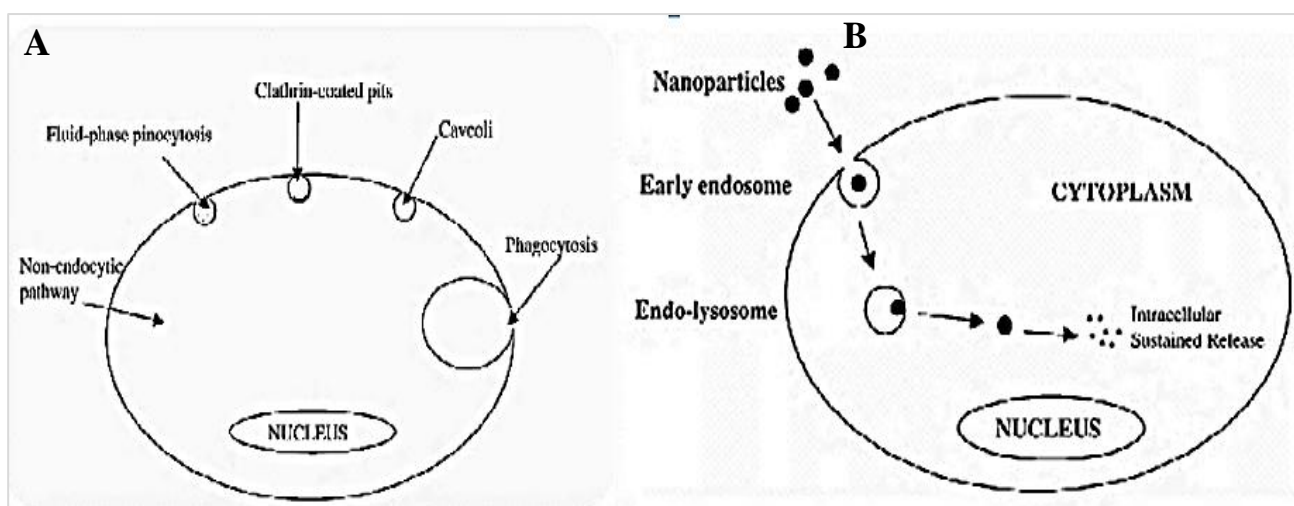


Figura 4. Esquema representativo das várias vias de internaliza o possíveis para as nanopartículas (A) e posterior percurso intracelular (B) (adaptado de: Panyam, *et al.* 2003).

A fagocitose e macropinocitose (endocitose de fase líquida) envolvem o encapsulamento de meio extracelular por extensões específicas da membrana. As partículas reconhecidas têm, normalmente, cerca de 500 nm e são reconhecidas após opsonização ou adsorção proteica. Estes processos de internalização são efectuados por células específicas, como os macrófagos, monócitos e fibroblastos. A macropinocitose é importante para obter concentrações farmacológicas de NP's junto dos tumores com EPR [Jones, *et al.* 2009; Watson, *et al.* 2005]. A endocitose mediada por claterina (por ex: pinocitose) permite a entrada de moléculas através de receptores específicos na membrana, já que são encapsulados em vesículas com revestimento de claterina (proteína presente na membrana). Estas vesículas seguem a via endocítica (ocorrendo acidificação gradual) para organitos intracelulares, tais como o endosoma primário e, por fim, o lisosoma, dentro do qual decorre alteração do conteúdo vesicular. Este processo ocorre essencialmente para partículas à volta dos 100 nm e é a via de internalização melhor descrita e preferencial para a entrada de vírus, bactérias e muitas NP's [Jones, *et al.* 2009; Watson, *et al.* 2005; Xu, *et al.* 2013]. Por fim, existe ainda a endocitose independente de claterina ou mediada por caveolina ou *caveolae*, que é a proteína integral maioritária de invaginações da membrana (60-80 nm de diâmetro). Estas proteínas oligomerizam-se em estruturas tipo *hairpin*, que formam *rafts* lipídicas com alto teor em colesterol. Este mecanismo existe maioritariamente em células musculares, endoteliais, fibroblastos e adipócitos, mas não ocorre em neurónios e leucócitos por exemplo. Há evidências de que as vesículas internalizadas por este mecanismo seguem o mesmo percurso que as vesículas de claterina, mas pensa-se que a sua localização intracelular ocorre em endosomas específicos, denominados de caveosomas, que possuem pH neutro e são responsáveis pelo processo de transcitose [Xu, *et al.* 2013]. A avaliação da via envolvida na entrada do fármaco é importante para antever a sua internalização celular e eficácia terapêutica. Assim, existem diversas técnicas como a microscopia confocal, de fluorescência ou electrónica que, por utilização de sondas fluorescentes, de inibidores específicos (disponíveis comercialmente) ou alteração de temperatura, permitem realizar estudos de internalização celular após incubação com o transportador desenvolvido (Fig. 5) [Sahay, *et al.* 2010; Watson, *et al.* 2005].

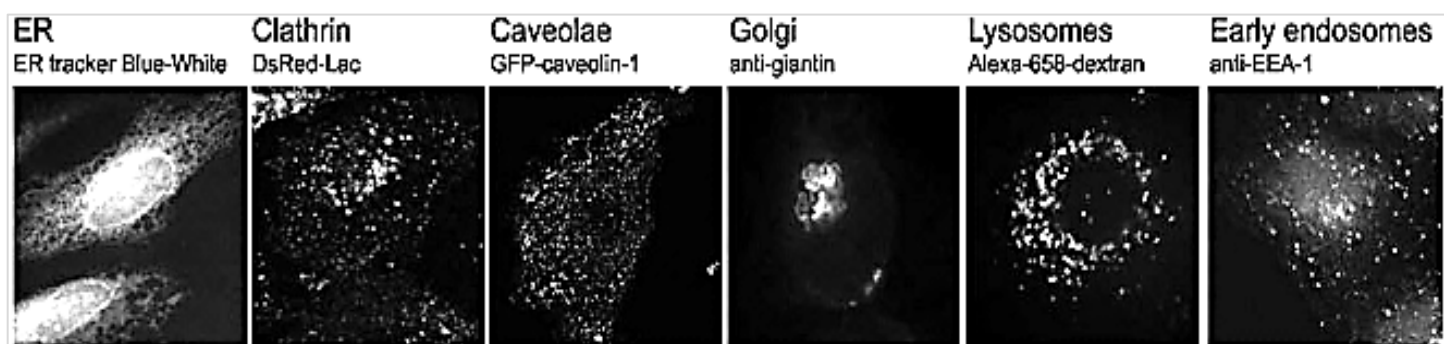


Figura 5. Imagens obtidas, por microscopia de campo largo, de células epiteliais de pulmão humano (A49), após marcação com sondas específicas de vários organitos intracelulares (adaptado de: Watson, *et al.* 2005).

Após a explicação anterior, é fácil prever que as propriedades físico-químicas da partícula, como o tamanho, carga e a natureza química do transportador, são factores importantes para determinar o modo de internalização da NP. As partículas deverão ter cerca de 100 nm, de modo a tirar partido do efeito EPR e aumentar a sua internalização celular. Por outro lado, partículas catiónicas tendem a ser mais facilmente internalizadas do que partículas aniónicas ou neutras, mas isto vai depender do direccionamento do transportador que se pretende e da própria natureza da célula. As partículas carregadas positivamente parecem entrar via endocitose mediada por claterina, sendo algumas NP's, como o Doxil[®], internalizadas preferencialmente via caveolina, devido à carga negativa. Há que contrabalançar o efeito da carga para tentar minimizar a sua fagocitose e concentrar a NP junto do alvo tumoral [Sahay, *et al.* 2010]. Tendo em conta o tipo de transportador, polimérico ou lipídico, já existem evidências de que a via preferencial de entrada destas NP's é a endocitose mediada por claterina. As micelas poliméricas podem existir na forma micelar agregada ou em unímeros. Há estudos que indicaram que as micelas entram preferencialmente por endocitose mediada por claterina, enquanto os unímeros entram via caveolina

seguindo um percurso intracelular até à mitocôndria, onde podem exercer várias funções. Estes copolímeros exercem efeito sobre a própria membrana (alterando a sua fluidez) e ainda sobre a P-gp, características importantes no seu efeito terapêutico e na libertação do fármaco, que serão exploradas posteriormente neste trabalho [Panyam, *et al.* 2002; Sahay, *et al.* 2010; Sahay, *et al.* 2008]. Por último, também as NP's feitas a partir de lípidos sólidos (*Solid Lipid Nanoparticles* – SLN) entram essencialmente pela via mediada por claterina, podendo, em certos casos, haver envolvimento de macropinocitose. Apesar desta via ser preferencial na entrada de SLN e no seu reencaminhamento para o lisosoma, a carga, dimensões e natureza das células envolvidas poderão alterar este percurso, pelo que se torna necessário caracterizar e avaliar a internalização de cada formulação específica [Martins, *et al.* 2012].

vi. Libertação controlada de fármacos

A terapia convencional farmacológica está muitas vezes associada a uma elevada dose terapêutica e a administrações muito frequentes, o que acarreta efeitos secundários indesejáveis e menor adesão à instituição da terapêutica. Neste sentido, surgiu o conceito de libertação controlada de fármacos, que consiste num sistema que promove a protecção do fármaco, aumentando o seu tempo de circulação e que, por alteração de propriedades desse transportador, permite uma maior especificidade em termos de alvo, libertando o fármaco de forma controlada. Deste modo, é possível diminuir a dose e a frequência de administração potenciando a terapia antineoplásica, com menores efeitos sistémicos (Fig. 6) [Farrell, *et al.* 2002].

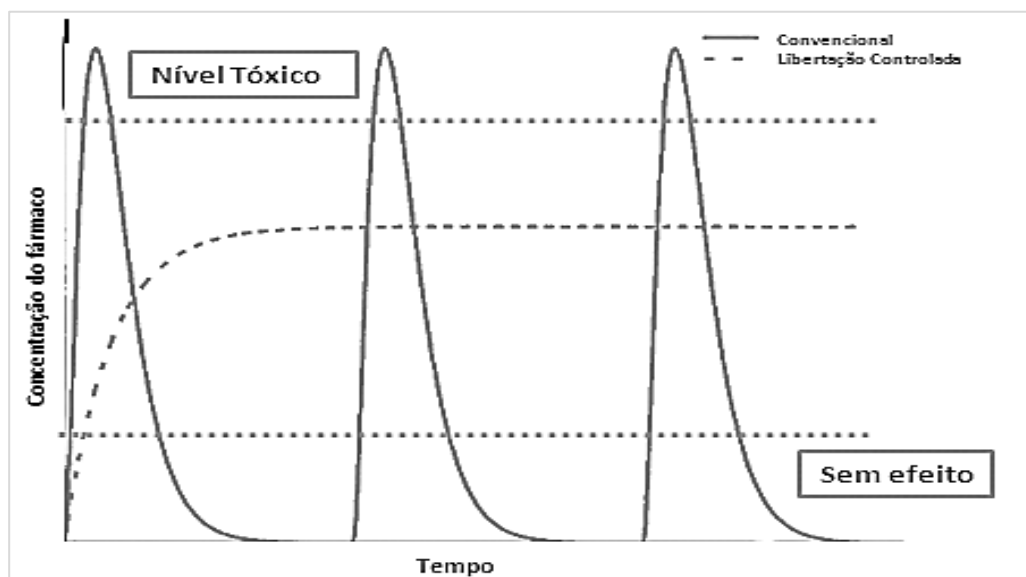


Figura 6. Figura representativa de um perfil de administração convencional e de libertação controlada de um fármaco (adaptado de: Farrel, *et al.* 2002)

Actualmente, investe-se muito na obtenção de substâncias antineoplásicas, com o menor número de efeitos secundários, que possam actuar de forma sinérgica e em associação com NP's ditas “inteligentes”, que permitem libertar o fármaco de forma precisa, consoante a variação de factores tais como: temperatura, pH, pressão, características eléctricas/mecânicas, etc. e cuja superfície se encontra modificada e associada a receptores, anticorpos e lípidos/glúcidos que permitirão um reconhecimento específico da célula tumoral a tratar. Desta forma, será possível conciliar um diagnóstico do tumor bem como a sua terapia, o dito “teranóstico” [Sinha, *et al.* 2006].

Após um encapsulamento eficiente de um fármaco, a sua libertação pode efectuar-se de diversas formas, sendo a solubilidade, modo de encapsulamento (por conjugação química ou encapsulamento físico) e a constituição do sistema transportador (polímeros biodegradáveis, co-polímeros anfífilicos ou lípidos, etc.), factores importantes na determinação do seu perfil de libertação [Kedar, *et al.* 2010]. Tendo em conta uma matriz polimérica, a libertação do fármaco pode dar-se por difusão através da matriz, erosão ou degradação do sistema e turgescência do transportador após um estímulo. No caso dos

polímeros biodegradáveis, a libertação dá-se por erosão através da hidrólise de géis, solubilização da matriz ou clivagem química dos polímeros constituintes do sistema transportador por enzimas específicas. Em relação à solubilização da matriz, esta pode dar-se por erosão na massa no caso dos sistemas hidrofílicos, pois a velocidade de penetração da água elevada ocorrendo fendas e desintegração do sistema; ou por erosão superficial, no caso de sistemas hidrofóbicos, pois sendo a velocidade de penetração da água baixo a erosão começa à superfície e o polímero reduz o seu tamanho [Göpferich 1996].

Os sistemas que respondem a estímulos, libertam o seu conteúdo por intumescimento ou enrugamento e após aumento ou diminuição do tamanho do sistema, o fármaco irá difundir ou sair após a sua desintegração. Este último processo é algo que está a ser explorado recentemente, pois está associado a nanopartículas de uma geração mais evoluída, permitindo controlar de forma eficaz, no tempo e no espaço, o fármaco de interesse [Sharma, *et al.* 2011]. Quando a NP envolve copolímeros, ou seja, micelas poliméricas, o mecanismo de libertação é um pouco mais complexo e ainda não está completamente elucidado. Pensa-se que a libertação do fármaco se pode dar no espaço intracelular após a desintegração da micela em unímeros, havendo difusão passiva do fármaco hidrofóbico através da bicamada; ou ocorre internalização da micela intacta e após entrada no lisosoma, ocorre a clivagem do polímero e dissociação do fármaco que se liberta para o citoplasma. Ambos os mecanismos são vantajosos, pois permitem utilizar menores doses farmacológicas, uma vez que há uma grande acumulação do fármaco no interior da célula. Adicionalmente, se a primeira hipótese for plausível, há ainda a possibilidade dos unímeros entrarem por endocitose mediada por caveolina, podendo alterar a fluidez membranar e inibir a P-gp por depleção de ATP da célula (inibição do efluxo de fármaco) [Chen, *et al.* 2008; Cho, *et al.* 2010; Kwon, *et al.* 1996]. Todavia, para poder alterar o perfil de libertação do fármaco, é possível modificar a superfície da micela, recorrendo ao entrecruzamento de cadeias poliméricas, de modo a alterar o estado químico e físico da partícula. Um estudo efectuado para determinar o tempo de libertação de Doxorubicina indicou que para micelas de copolímeros inter cruzados, com um estado mais rígido, a libertação do fármaco era retardada de forma significativa. Assim, o perfil de libertação depende não só do tipo de micela, mas também do seu estado físico [Kedar, *et al.* 2010]. Por fim, as partículas lipídicas (SLN), podem ser formadas a partir de diferentes lípidos sólidos à temperatura ambiente, pelo que terão temperaturas de transição de fase diferentes. Desta forma, dependendo do tamanho, da viscosidade e do estado físico do lípido, a matriz pode ter um comportamento mais sólido ou líquido, modulando a libertação do fármaco do seu interior. SLN com características mais sólidas tendem a retardar a libertação do fármaco, enquanto uma maior mobilidade lipídica da matriz (fase líquida) permite uma difusão eficaz do fármaco. Portanto, consoante o método de produção e a constituição lipídica das NP's, é possível modular o seu perfil de libertação por alteração das cadeias de ácidos gordos [Mühlen, *et al.* 1998; Uner, *et al.* 2007].

vii. Actividade *in vitro*

Cada nova formulação de um determinado sistema de entrega apresenta características fisico-químicas únicas que, juntamente com a via de administração escolhida [endovenosa (i.v.), dérmica, pulmonar ou *per os*], apresentará propriedades farmacológicas e toxicológicas diferentes. Aposta-se, então, na área da nanotoxicologia, onde se estabelecem protocolos meticulosos de caracterização das formulações desenvolvidas, tendo em conta as propriedades das NP's, mencionadas anteriormente, de forma a antever a estabilidade, possível agregação e actividade biológica de um novo DDS. O que se pretende efectuar são estudos variados de toxicidade e citotoxicidade, de forma a torná-las, um dia, em protocolos rotineiros, coerentes e padronizados [Jones, *et al.* 2009].

Após uma avaliação das características inerentes a cada formulação, é necessário proceder à observação do seu possível efeito *in vitro*, usando culturas primárias de células ou linhas celulares, que se encontram disponíveis e facilmente obtidas através da *American Tissue Type Culture Collection* ou ATCC. Os estudos de nanotoxicidade podem ser efectuados com

células fagocíticas (macrófagos), neuronais, endoteliais, epiteliais, hepáticas e provenientes de linhas celulares tumorais. A escolha do modelo celular a utilizar é feita de acordo com o tipo de actividade biológica que se pretende e com o ensaio a efectuar. Durante este processo, é necessário justificar a escolha, tendo em conta que uma linha celular obtida pela ATCC pode estar contaminada ou não possuir as características do fenótipo celular de origem. Desta forma, procede-se muitas vezes à utilização de culturas primárias, no entanto é necessário balancear as controvérsias éticas associadas ao sacrifício animal, custos e as vantagens relativamente à utilização de uma linha celular secundária [Jones, *et al.* 2009]. Este tipo de ensaio *in vitro* é extremamente importante para obter informações mecanísticas (dose, tamanho ideal, eficiência de reactividade celular), relativamente à formulação desenvolvida, e ao realizar ensaios de biocompatibilidade, toxicidade, reactividade e internalização celular, que poderão dar uma ideia prévia do possível efeito terapêutico de uma determinada NP [Feng, *et al.* 2003]. No entanto, o principal problema no desenvolvimento de novos DDS vem do facto das células coexistirem em tecidos, onde a comunicação intracelular e o cruzamento de vias de sinalização é um factor predominante em termos fisiológicos, algo que pode não ser correctamente aplicado/avaliado em células cultivadas. Além do mais, dependendo da via de administração, o transportador irá encontrar diversas barreiras biológicas como a linfa, sangue, sistema imunitário etc., que não estão presentes em estudos feitos em ensaios celulares. Torna-se então importante passar de um modelo 2D, limitado em termos de comunicação e comportamento biológico, para modelos com maior complexidade celular, que possam mimetizar de uma forma mais precisa o efeito terapêutico de um DDS. Para isto, recorre-se à posterior utilização de modelos animais (ensaio *in vivo*) e co-culturas celulares, pois muitos ensaios *in vitro* falham quando comparados com estudos mais complexos em organismos vivos, pondo em causa a validação e correlação dos resultados obtidos para o transportador formulado [Fadeel, *et al.* 2010].

a. Macrófagos

As células estaminais hematopoiéticas existem na medula óssea, onde se diferenciam em células precursoras de vários constituintes do sangue e sistema imunitário. Um exemplo são os monócitos, células com uma capacidade de fagocitose moderada que contém lisosomas primários no seu interior, tendo um efeito proinflamatório ao libertar determinadas citocinas [interleucina 12 (IL-12), factor de necrose tumoral (TNF- α), etc.]. Estas células circulam durante 1 a 3 dias e depois movem-se para os tecidos onde amadurecem, formando células com alta capacidade fagocitária (pseudópodes desenvolvidos e fagolisosomas): os macrófagos [Geiser 2010]. Estes existem maioritariamente em órgãos como fígado, pulmões, baço e nódulos linfáticos, tendo também a capacidade de infiltrar tumores, exercendo um papel de primeira defesa, essencial para a eliminação de diversos agentes patogénicos [Ahsan, *et al.* 2002]. Em suma, os macrófagos são células inatas do sistema imunitário, tendo um papel de defesa contra agentes patogénicos; reparação de tecidos; são proinflamatórios após a infiltração tumoral, recrutando células imunitárias e libertando citocinas específicas; no entanto os macrófagos associados a tumores (TAM) podem exercer um papel fundamental na progressão e metastização tumoral [Almouazen, *et al.* 2012].

Como já foi mencionado, os macrófagos exercem uma função importante quando se trata do reconhecimento e sequestro de NP's. Isto pode tornar-se uma barreira, quando o alvo terapêutico não são os órgãos alvo destas células. Assim, é necessário proceder a alterações de superfície do transportador, de modo a evitar a rápida eliminação pelo MPS ou, se a terapia passa pela chegada a órgãos como o fígado, baço, pulmões, etc., há que potenciar o reconhecimento das partículas pelos macrófagos [Ahsan, *et al.* 2002; Dobrovolskaia, *et al.* 2008]. Todas estas características, aliadas à elevada resistência, índice fagocítico e elevado tempo de circulação destas células, tornam-nos a primeira linha de contacto de novos DDS. No entanto, é necessário ter em conta que, apesar de constituírem um sistema celular interessante (pois mantém-se em cultura

durante um certo período de tempo, se suplementados correctamente), são células com um índice de proliferação baixo ou nulo, quando mantidas em culturas *in vitro* [Mauel, *et al.* 1971; Santos, *et al.* 2008]. Muitas das culturas secundárias, que são comercializadas podem não mimetizar correctamente a estrutura e função biológica destas células, pois após o seu isolamento (efectuado a partir de vários locais anatómicos de rato) são transfectados e cultivados. O único problema que se coloca prende-se com o sacrifício animal, devido a factores éticos. No entanto, é necessário avaliar a coerência de um estudo e o seu custo, quando se trata de escolher o protocolo mais correcto e se o problema ético se sobrepõe a estes parâmetros [Jones, *et al.* 2009]. Existem diversos protocolos usados para o isolamento de macrófagos de rato ou ratinho, sendo este processo descrito mais à frente neste trabalho [Zhang, *et al.* 2008; Zhou, *et al.* 2006]. A avaliação da nanotoxicologia de novos DDS é um factor importante a determinar antes de se proceder a ensaios biológicos mais complexos. Os macrófagos constituem um sistema responsável pelo contacto directo de partículas estranhas ao organismo, podendo realizar-se ensaios de citotoxicidade nestas células, permitindo antever o possível efeito das NP's sobre outras linhagens celulares (à partida menor toxicidade para células ditas normais) e células tumorais (uma elevada citotoxicidade). Concluindo, é importante proceder a uma caracterização extensa da toxicidade primária das NP's, de modo avaliar o seu sucesso como agentes terapêuticos tumorais em situações fisiológicas [Jones, *et al.* 2009; Lanone, *et al.* 2009].

b. Co-cultura

É conhecido que as neoplasias não vivem ou sobrevivem como identidades isoladas, sendo o ambiente tumoral envolvente um factor de elevada importância para a progressão tumoral. Existem diferentes tipos de células não tumorais que compõem o microambiente neoplásico, sendo as células endoteliais, os fibroblastos e os macrófagos os componentes maioritários. Os capilares sanguíneos são importantes na irrigação tumoral para fornecimento de nutrientes e oxigénio e são o caminho preferencial para a metastização. Já os fibroblastos são importantes para dar suporte físico ao tumor, pois são responsáveis por segregar a matriz extracelular [Leek, *et al.* 2002]. Um factor importante que está sempre associado à patologia do cancro é a inflamação. O recrutamento de monócitos e macrófagos para estes locais é mediado pela hipoxia e factores segregados devido a oncogenes ou danos celulares. Os macrófagos têm um duplo comportamento, tendo propriedades anti-tumorais e pro-tumorais, que já foram demonstradas num estudo *in vitro* [Hauptmann, *et al.* 1993]. Como já foi mencionado anteriormente, os macrófagos derivam dos monócitos e a sua polarização é determinada pelas citocinas presentes no ambiente. A activação clássica destas células dá-se por citocinas do tipo 1 (Th1) (ex: interferão- γ , lipopolissacarídeo bacteriano e TNF- α) e a activação alternativa (M2) é induzida por citocinas Th2, como as interleucinas 4 e 13 (IL-4 e IL-13), bem como o factor de estimulação de colónias de macrófagos (*macrophage-colony stimulating factor* - M-CSF) [Ding, *et al.* 2012; Leek, *et al.* 2002]. Estas células imunitárias podem então inibir a progressão neoplásica, sinalizando o recrutamento de linfócitos T, que têm a capacidade de induzir a apoptose da célula tumoral. Por outro lado, quando o ambiente tumoral permite a formação dos ditos macrófagos associados a tumores (*Tumor-associated macrophages* – TAM), há uma secreção de factores como o VEGF e várias citocinas que promovem a angiogénese e posterior progressão e metastização tumoral (Fig. 7) [Lamagna, *et al.* 2006; Lewis, *et al.* 2006]. Existe então uma forte correlação positiva entre a inflamação e a angiogénese e, conseqüentemente, um mau prognóstico tumoral. Vários estudos indicam uma forte infiltração de macrófagos em tumores da mama e pulmão, próstata e cólon, havendo uma elevada expressão de citocinas por parte destes carcinomas, associadas ao fenótipo M2 [Chen, *et al.* 2005; Ono 2008].

Estas evidências mostram o quão importante é simular um ambiente fisiológico, quando se está a desenvolver um novo transportador terapêutico. Tendo em conta a possível interacção de NP's com os macrófagos e posterior recrutamento e infiltração destes em tumores como da mama (neoplasia modelo deste trabalho), torna-se necessário simular as interacções e

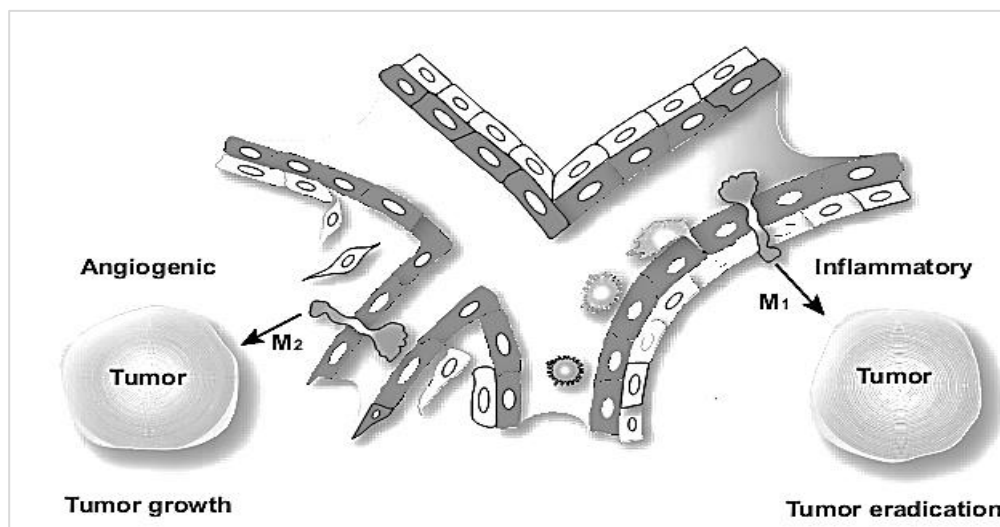


Figura 7. Diferentes funções dos macrófagos em termos de microambiente tumoral. Podem adquirir um fenótipo inflamatório (M1), contribuindo para a morte tumoral ou um fenótipo angiogênico (M2), havendo uma maior progressão da neoplasia (retirado de: Lamagna, *et al.* 2006).

o contacto celular biológico que existem nestas células. Assim, os estudos *in vitro* são completados com co-culturas de macrófagos e células tumorais [Dong-Le Bourhis, *et al.* 1997; Soma, *et al.* 2000]. Existem alguns estudos de linhas celulares da mama co-cultivados com macrófagos, tanto com contacto celular directo como com separação física das células, que provam o envolvimento da inflamação na angiogénese, na progressão e maior capacidade de invasão tumoral [Dong-Le Bourhis, *et al.* 1997; Hagemann, *et al.* 2004]. Neste contexto, surgiu também a hipótese de uma possível alteração deste comportamento, quando as células fossem incubadas com NP's terapêuticos. Segundo a literatura, uma co-cultura de macrófagos com células tumorais, posteriormente incubadas com um fármaco livre ou encapsulado em NP's, mostrou uma maior citotoxicidade mediada pelo fármaco encapsulado do que na forma livre. Este aumento da capacidade terapêutica pode ser devida à acção dos macrófagos associados aos tumores que, após a fagocitose dos NP's do meio envolvente, são activados e medeiam uma citotoxicidade secundária, onde não só segregam citocinas que sinalizam a morte celular, mas libertam as partículas farmacológicas por exocitose, contribuindo para uma maior acumulação destas junto ao alvo tumoral. Há assim uma maior correlação com o ambiente biológico, sendo os estudos *in vitro* indicadores da possível acção terapêutica das partículas após administração *in vivo* [Al-Hallak, *et al.* 2010; Soma, *et al.* 1999; Soma, *et al.* 2000; Yang, *et al.* 2011].

viii. Actividade *in vivo*

A transdução e desenvolvimento de modelos tumorais em ratinhos é um processo altamente utilizado em estudos biológicos e morfológicos tumorais e, ainda, para a formulação de novas terapias oncológicas. Mais do que obter um resultado positivo frente a uma linha celular primária ou secundária, torna-se importante compreender e reproduzir essa eficácia terapêutica em modelos animais que se possam assemelhar, de certa forma, à reacção biológica obtida com tumores humanos [Kim, *et al.* 2006]. Um modelo animal bastante usado é a estirpe Balb/C nude, um protótipo experimental que possui uma aplasia congénita do timo, sendo imunodeficiente para linfócitos T, e tendo um fenótipo sem pêlo. Estes ratinhos não são completamente neutros em termos imunológicos; com cerca de três/quatro semanas de idade têm uma imunodeficiência máxima, sendo o período ideal para o estudo de muitas linhas celulares, no entanto, é com a idade de seis e oito semanas que este modelo é mais utilizado. Todavia, é necessário ter em atenção que nesta fase estes ratinhos são capazes de expressar determinadas imunoglobulinas e têm reactividade das células NK (*Natural killers*), responsáveis pelo

reconhecimento e disseminação de muitas células tumorais e suas metástases. Tendo em conta estas características, estes animais necessitam de uma acomodação própria com separação física directa de outros animais que sejam timo-competentes, devido à sua alta susceptibilidade a infecções [Kozlowski, *et al.* 1984; Sharkey, *et al.* 1984]. Um estudo realizado com adenocarcinoma de cólon, que após transplantação neste modelo proliferou de forma eficiente, levou ao uso regular deste ratinho como modelo *in vivo*. Estudos iniciais deixaram dúvidas acerca da eficácia de proliferação de alguns tumores neste protótipo, mas ao longo do tempo estes têm-se mostrado eficazes quer como modelos ortotópicos, em que o tumor humano é injectado no local de origem tumoral, quer como modelo ectópico (xenoenxerto), em que o tumor é injectado num local diferente da origem como por exemplo intraperitoneal ou subcutaneamente. Estudos mais recentes, também evidenciaram algum sucesso na formação de metástases quer a partir do local da transplantação, quer por injeção directa na cauda da veia, havendo disseminação sistémica das células tumorais. Os tumores formados apresentam as mesmas características histológicas e propriedades bioquímicas do tumor humano, revelando alguma fiabilidade nos resultados posteriormente obtidos. Constitui um modelo vivo e dinâmico, apesar de ser caro e necessitar de condições estéreis específicas [Fleming, *et al.* 2010; Kozlowski, *et al.* 1984; Price, *et al.* 1990].

Consoante o tipo de terapia a aplicar, é extremamente importante escolher um modelo reprodutível e, quando possível já descrito, de modo a tirar o maior partido dos ensaios biológicos, que se mostram demorados e caros. No caso das nanopartículas, existem diversas vias de administração já descritas, sendo este um factor importante quando se está a desenvolver o modelo animal. Vários estudos indicaram já que mais que o modelo em si, as próprias características das células injectadas e o seu local de transplantação influenciam muito o sucesso da proliferação tumoral em ratinhos. No caso de algumas linhas celulares de mama (importantes para este trabalho), a maior taxa de sucesso (100% dos ratinhos *nude* injectados) provém de uma injeção directa na gordura da mama, sendo o volume tumoral monitorizado por palpação da glândula, contrariamente a uma injeção subcutânea que tem uma taxa de sucesso inferior a 50% [Price, *et al.* 1990]. No entanto, esta última técnica é bastante mais simples e fácil de monitorizar sem recurso a imagiologia, sendo usada como um modelo preliminar em avaliações terapêuticas. É necessário também ter em conta o sucesso de metastização, pois estas são responsáveis por cerca de 80% das mortes por carcinomas. A via endovenosa é a mais utilizada para indução de tumores secundários. No caso de adenocarcinoma de mama torna-se difícil ter um modelo que replique completamente o perfil metastático, mas linhas celulares triplamente negativas como a MDA-MB-231, têm mostrado alta capacidade de metastização pulmonar, quando administrada subcutaneamente ou por via endovenosa [Fleming, *et al.* 2010; Fraker, *et al.* 1984; Iorns, *et al.* 2012; Tester, *et al.* 2004].

1.2 – Sistemas de veiculação de fármacos

Existem diversos tipos de nanopartículas, que têm características e funções próprias. As NP's podem classificar-se em dois tipos: orgânicas (nanosuspensões e nanocristais, nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas poliméricas, nanotubos, liposomas e dendrímeros) e inorgânicas (nanopartículas metálicas e cerâmicas) [Singh, *et al.* 2011]. Os materiais constituintes destas partículas podem ser naturais (ex: proteínas e polissacarídeos) ou sintéticos [ex: poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA) e o copolímero poli [(ácido láctico)-co-(ácido glicólico)] (PLGA)]. Os materiais naturais não têm sido muito utilizados, pois variam bastante em termos de pureza e apresentam, por vezes, estruturas ramificadas, o que poderia comprometer a associação de um fármaco na nanopartícula. Já os materiais sintéticos são amplamente usados, pois possuem elevada biocompatibilidade e biodegradabilidade, o que facilita não só o transporte do nanotransportador ao longo da via fisiológica, como também minimiza a sua acumulação e toxicidade, dado que se degrada facilmente por mecanismos fisiológicos comuns. Estes materiais permitem, igualmente, variar componentes como a

hidrofobicidade e hidrofília da nanopartícula, o que vai facilitar o encapsulamento de um determinado fármaco, pois permite manipular a sua solubilidade [Hans, *et al.* 2002].

Apesar da existência de uma grande variedade de sistemas de transporte de fármacos, é necessário definir um objectivo, por forma a desenvolver uma formulação com função activa. Como já foi mencionado, os primeiros transportadores a ser utilizados foram os liposomas. Estes são geralmente classificados como vesículas esféricas constituídas por vários tipos de lípidos não-tóxicos e colesterol, que envolvem um núcleo aquoso onde se podem dissolver e transportar diferentes componentes (fármacos, siRNA, DNA, etc.). Podem ser modificados na superfície para aumentar o seu tempo de circulação [utilizando-se, por exemplo, o polímero hidrofílico poli[(etileno glicol) - (PEG)] ou especificidade para o alvo e, portanto, são bons transportadores de fármacos, pois permitem alterar o seu perfil farmacocinético, bem como a sua biodisponibilidade. Tendo em conta a sua constituição lipídica, são também biocompatíveis e já demonstraram algum sucesso nas áreas da Biologia, Medicina e Bioquímica, tendo-se mostrado promissores no transporte e libertação controlada de fármacos antineoplásicos [Haley, *et al.* 2008; Rawat, *et al.* 2006; Yih, *et al.* 2006]. No entanto, estes sistemas ainda são conhecidos pela baixa taxa de transfecção e actividade biológica e o futuro reserva ainda muito trabalho e estudo em termos de formulação e optimização [Feng, *et al.* 2003; Sharma, *et al.* 1997]. Estas limitações levaram à procura de sistemas alternativos, tendo surgido o conceito de NP's poliméricas. Estas partículas são compostas por polímeros sintéticos, mencionados anteriormente, que são biocompatíveis e biodegradáveis (rapidamente metabolizados pelo ciclo de *Krebs* e excretados pelo organismo [Panyam, *et al.* 2003]. Consoante o método de formulação, podem produzir-se nanoesferas ou nanocápsulas. No primeiro caso, o fármaco encontra-se disperso pelo núcleo e matriz polimérica, enquanto no segundo o fármaco está localizado somente no núcleo, envolvido por uma cápsula polimérica, bem definida. Devido ao seu pequeno tamanho e elevada capacidade de encapsulamento, estes transportadores tornam-se vantajosos no sentido em que entram facilmente na célula pela via endocítica, libertando-se o fármaco de uma forma progressiva e controlada. Isto permite ainda ultrapassar o problema de MDR, apresentado por muitas células tumorais [Parveen, *et al.* 2012; Sahoo, *et al.* 2003]. Um bom exemplo deste tipo de veículo é o Abraxane®, mencionado anteriormente. No entanto, também apresentam algumas limitações, tais como uma possível citotoxicidade de alguns polímeros sintéticos, a rápida remoção da circulação por macrófagos do MPS e, ainda, a falta de métodos eficazes para uma produção rápida e em larga escala em termos industriais [Kayser, *et al.* 2005; Rawat, *et al.* 2006].

Alternativamente, existem dois tipos de partículas que se têm destacado quer pela variedade de vias de administração e elevada biocompatibilidade, como no caso das NP's feitas à base de lípidos ou SLN, quer pela sua facilidade de produção, elevado tempo de circulação e biodisponibilidade, como no caso das micelas poliméricas (MP's). Assim, estes serão mencionados com mais pormenor [Mehnert, *et al.* 2001a; Parveen, *et al.* 2012; Wissing, *et al.* 2004].

1.2.1 – Nanopartículas Lipídicas Sólidas (SLN)

Este tipo de nanotransportadores surgiu no início dos anos 90, como uma alternativa aos transportadores coloidais tradicionais (nanoemulsões, liposomas, nanoesferas, etc.). A entrega específica de fármacos continua a ser uma tarefa árdua no campo da Farmacologia e, mais que o desenvolvimento de novos fármacos ou a sua optimização, é necessário procurar alternativas viáveis que permitam melhorar o seu efeito terapêutico, ao nível de um transporte eficiente, acompanhado de uma libertação controlada no espaço e no tempo. As SLN apresentam dimensões entre 50 a 100 nm, sendo, maioritariamente, constituídos por lípidos sólidos à temperatura ambiente. Consistem num núcleo hidrofóbico envolvido por uma monocamada lipídica, estando o fármaco dissolvido no núcleo ou disperso na matriz lipídica. Este tipo de nanopartícula é não-tóxico (biocompatível) e reúne características dos liposomas com as nanopartículas poliméricas. Assim, as SLN's

foram desenvolvidas para serem aplicadas a nível parentérico, pulmonar e dérmico e a Nanobase® foi a primeira formulação de SLN aprovado pela FDA. Estas NP's mostram-se eficazes em termos de terapia génica e, através da utilização de lípidos catiónicos para a sua formulação, já foi possível obter graus de transfecção e expressão génica semelhantes ao uso de liposomas catiónicos mas com menor toxicidade, sendo agentes de transfecção não-virais bastante promissores [Kayser, *et al.* 2005; Rawat, *et al.* 2006].

Apesar da existência de inúmeros transportadores coloidais estes apresentam ainda muitas desvantagens, sendo as SLN constituídas por lípidos sólidos à temperatura ambiente, estabilizados por surfactantes, formando-se uma matriz lipídica sólida capaz de incorporar diversos fármacos. Estas NP's permitem aumentar a biocompatibilidade, solubilidade de fármacos hidrofóbicos, aumentar a especificidade e uma libertação mais controlada, sendo um sistema bastante estável [Sailaja, *et al.* 2011].

Existem diversas técnicas usadas na preparação das SLN's, sendo a homogeneização a alta pressão (a frio ou quente) e a preparação a partir de micro emulsões as mais utilizadas em termos de produção em escala (Muller 200). Segundo a literatura, as características inerentes a estas partículas estão dependentes do processo usado na sua preparação, das condições em que são preparadas, do tipo de lípido incorporado, tipo de surfactante usado, do comportamento cristalino da matriz e, ainda, das condições de armazenamento. Observou-se, então, que a presença de estados polimórficos e de uma cristalinidade variada da matriz eram algumas limitações destas partículas, afectando quer a sua eficiência como transportador, quer a própria incorporação e libertação controlada do fármaco [Mehnert, *et al.* 2001a; Wissing, *et al.* 2004]. Os lípidos devem ser escolhidos pela sua variedade em termos de tamanho da cadeia hidrofóbica e as próprias características fisico-químicas que, como já foi mencionado, será importante na determinação das características das nanopartículas e na composição da matriz. Os surfactantes devem ser produtos aprovados em termos clínicos e são importantes para aumentar a estabilidade do produto final e minimizar a formação de agregados, que podem alterar o tamanho e carga da partícula e, consequentemente, a sua actividade biológica [Mühlen, *et al.* 1998].

Um factor importante no desenvolvimento de SLN's é a sua caracterização em termos dos parâmetros já mencionados anteriormente. Uma característica única deste tipo de transportadores é muito importante para avaliar a sua estabilidade final como produto e, após armazenamento, o seu comportamento térmico (temperatura de fusão e índice de cristalinidade). Estes parâmetros são avaliados pela técnica da calorimetria diferencial de varrimento (*Differential Scanning Calorimetry – DSC*), que permite obter informações acerca do estado físico e térmico da amostra, pois mede o ganho ou perda de energia sob a forma de calor de uma determinada amostra, em função da temperatura [Dubey, *et al.* 2012]. O estado cristalino da amostra é importante no perfil de libertação do fármaco encapsulado, havendo uma relação inversa entre o grau de cristalinidade dos lípidos e a mobilidade do fármaco [Wissing, *et al.* 2004]

Em suma, vários estudos foram já efectuados com este tipo de partículas e uma avaliação pormenorizada das suas características fisico-químicas é uma área extensa no âmbito do desenvolvimento de novos DDS. As são NP's bem toleradas, permitem uma internalização celular via endocitose e uma maior acumulação do fármaco no interior da célula, ultrapassando o problema de MDR. Uma grande vantagem associada a estes sistemas é a sua aplicação a nível de vários sistemas de administração, sendo amplamente estudado para ultrapassar a barreira hematoencefálica, tendo-se também mostrado eficaz em termos de terapia e diagnóstico de micrometastizações a partir de cancro da mama, pois são sistemas altamente linfotrópicos, tendo uma elevada especificidade para os nódulos linfáticos. A sua utilização individual ou por hibridização polimérica é uma promessa em termos de nanotecnologia aplicada à terapêutica oncológica.

1.1.2 – Micelas Poliméricas

As nanopartículas designadas de micelas poliméricas foram inicialmente propostas pelo grupo de Bader, *et al.* (1984) [Bader, *et al.* 1984; Jones, *et al.* 1999], mas a sua introdução como possíveis DDS só foi introduzida no início dos anos 90 [Kazunori, *et al.* 1993]. Estes tipos de NP's tornaram-se muito promissoras na última década, sendo os seus polímeros usados inicialmente como potenciadores da libertação de fármacos ou como surfactantes para alterar a morfologia e outras propriedades de diferentes NP's. Assim, já existem inúmeros sistemas nos quais se solubilizaram diversos fármacos e se obteve uma melhor eficácia terapêutica, comparativamente ao fármaco livre ou outros DDS. Como este tipo de micelas começou a mostrar inúmeras vantagens quando associadas a estes materiais, pensou-se na sua utilização individualmente e aplicação na área da Farmacologia. Este tipo de sistemas rapidamente se tornou muito promissor e as suas propriedades e vantagens estão muito bem resumidas num trabalho de Torchilin (2001) [Torchilin 2001]. As micelas poliméricas podem dividir-se em dois grupos principais que são: as micelas surfactantes de baixo peso molecular e as micelas poliméricas. Dentro do primeiro grupo temos o exemplo de vários tipos de surfactantes comerciais como o Cremophor[®] EL (usado como solubilizador de Taxol[®]) e poliassorbatos (ex: Tween[®] 80). O Cremophor[®] E tem uma elevada capacidade de solubilização de fármacos pouco solúveis em água, mas estão-lhe associados diversos efeitos secundários como reacções de hipersensibilidade e activação do complemento, bem como nefro e neurotoxicidade. Comparativamente, o Tween[®] 80 já tem uma actividade biológica/farmacológica inferior, no entanto é um dos surfactantes mais utilizados na dispersão e formulação de novos veículos de transporte de fármacos, devido ao seu elevado perfil de segurança clínica. O que caracteriza a formação de micelas é o factor da Concentração Micelar Crítica (CMC). Somente acima deste valor é que os unímeros poliméricos se associam em estruturas micelares, sendo a sua estabilidade em soluções diluídas e a viscosidade do sistema determinadas por este parâmetro. No caso dos surfactantes o CMC é bastante elevado, pelo que estes se dissociam rapidamente quando diluídos, pondo em causa a estabilidade do sistema em situações fisiológicas. As micelas poliméricas têm sido amplamente estudadas e são estruturas com um CMC mais baixo (cerca de 1000 vezes inferior aos surfactantes de baixo peso molecular), sendo bastante mais estáveis e apresentando maior actividade biológica comparativamente aos surfactantes mencionados. Este tipo de micelas pode ser formado a partir de co-polímeros anfifílicos, que se micelizam espontaneamente em solventes orgânicos, formando estruturas ramificadas de uma camada externa de um polímero hidrofílico e um núcleo de um polímero hidrofóbico [Garrec, *et al.* 2004].

As micelas poliméricas formadas a partir de co-polímeros anfifílicos têm surgido, na última década, como DDS promissores, principalmente na área da Oncologia, tendo uma aplicação vasta no transporte de proteínas, material genético e fármacos hidrofóbicos (Tabela 1) [Kedar, *et al.* 2010; Kwon, *et al.* 1996; Letchford, *et al.* 2007; Nishiyama, *et al.* 2006]. Um tipo de micelas que tem sido amplamente usado são os Poloxâmeros (Polox), que são constituídos por tri-blocos de polímeros sintéticos hidrofílicos [Poli(óxido de etileno) – PEO] e hidrofóbicos [Poli(óxido de propileno) - PPO]. A fórmula geral destas micelas é dada por $PEO_{m/2} - b-PPO_n - b-PEO_{m/2}$. Este tipo de polímeros é comercializado com o nome de Pluronic[®], havendo diferentes tipos, consoante o tamanho e peso dos blocos que os formam. Desta forma, é possível escolher diferentes tipos de poloxâmeros, consoante a formulação e efeito biológico pretendido [Adams, *et al.* 2003; Kedar, *et al.* 2010; Moghimi, *et al.* 2000].

A micelização destas NP's dá-se de forma espontânea, quando os polímeros são colocados num solvente orgânico, sendo o seu método de produção bastante simples, barato e rápido, comparativamente a outros tipos de NP's [Letchford, *et al.* 2007]. Esta auto-organização das micelas é um processo reversível e dependente da termodinâmica da solução. Em concentrações baixas, os blocos micelares existem na forma de unímeros e a partir da CMC ocorre a diminuição da entropia do sistema (devido à organização molecular do solvente). Posteriormente, há agregação dos blocos em micelas e um

sucessivo aumento da entropia, favorecido pelas interações hidrofóbicas entre os polímeros. As micelas que se formam apresentam um tamanho ideal entre os 5-100 nm e uma CMC de 10^{-7} - 10^{-3} M em solução aquosa. As principais técnicas envolvidas na produção deste tipo de transportadores são a dissolução directa numa solução aquosa, para polímeros com elevada solubilidade em água, e o método de evaporação do solvente, para polímeros mais hidrofóbicos e maximização do encapsulamento de fármacos lipofílicos, com posterior reidratação do filme polimérico [Cho, *et al.* 2010; Gaucher, *et al.* 2005].

Tabela 1. Co-polímeros usados no transporte de diferentes compostos. Efeito citotóxico e na internalização celular para diferentes linhas celulares, comparativamente aos compostos na sua forma livre (adaptado de Adams, *et al.* 2003 e Garrec, *et al.* 2004).

| Classe Polimérica | Blocos poliméricos | Composto encapsulado | Comentário | Referência |
|-------------------|--|---|--|---|
| Pluronic® | Polox 235 (P85) | Doxorubicina, Vinblastina, Daunorubicina, Metotrexato, Cisplatina | Aumento da citotoxicidade do fármaco encapsulado vs fármaco livre [adenocarcinoma do ovário (SKOV-3) e sub-cultura MDR] | [Alakhov, <i>et al.</i> 1996] |
| | Polox 235 (P85) | Fuoresceína, Taxol, Etoposídeo, Ácido Valpróico | Aumento da permeabilidade do fármaco (adenocarcinoma de cólon humano Caco-2) | [Batrakova, <i>et al.</i> 1999] |
| | Polox 407/D- α -Tocoferil polietilenglicol | Ácido gambógico | Maior eficácia terapêutica associada a uma maior internalização celular em cancro da mama MDR com inibição de P-gp | [Saxena, <i>et al.</i> 2012] |
| | Polox 188/Poli (ácido láctico-co-glicólico) - PLGA | | Maior citotoxicidade, internalização e libertação do fármaco, após adição do polímero micelar (adenocarcinoma de mama MCF-7) | [Yan, <i>et al.</i> 2010] |
| | P123 | Docetaxel | Maior citotoxicidade <i>in vitro</i> (hepatocarcinoma HepG2 e melanoma B16), bem como alta inibição tumoral <i>in vivo</i> | [Liu, <i>et al.</i> 2011] |
| | Poli (ϵ -caprolactona)/Polox188 | Paclitaxel | Formação de poros e libertação controlada do fármaco das micelas/inibição de P-gp e MDR em cancro da mama | [Lamagna, <i>et al.</i> 2006; Ma, <i>et al.</i> 2007; Yuan, <i>et al.</i> 2010] |
| Co-polímero | Oligo (metacrilato de metil)/Poli (ácido acrílico) | Doxorubicina | Libertação controlada do fármaco para administração oral | [Inoue, <i>et al.</i> 1998] |

Estas estruturas podem ter várias morfologias [Torchilin 2001], sendo a mais comum uma esfera com constituição ramificada, onde os polímeros hidrofílicos se organizam de forma a contactar com a superfície externa e compactar os resíduos hidrofóbicos no seu interior, onde, posteriormente, se dissolverá o fármaco aplicado (Fig. 8). Não são consideradas NP's sólidas, mas sim composições de unímeros que estão em constante equilíbrio dinâmico [Letchford, *et al.* 2007].

Os blocos de PEO são importantes para criar uma estabilidade estérica para minimizar a ligação de opsoninas e

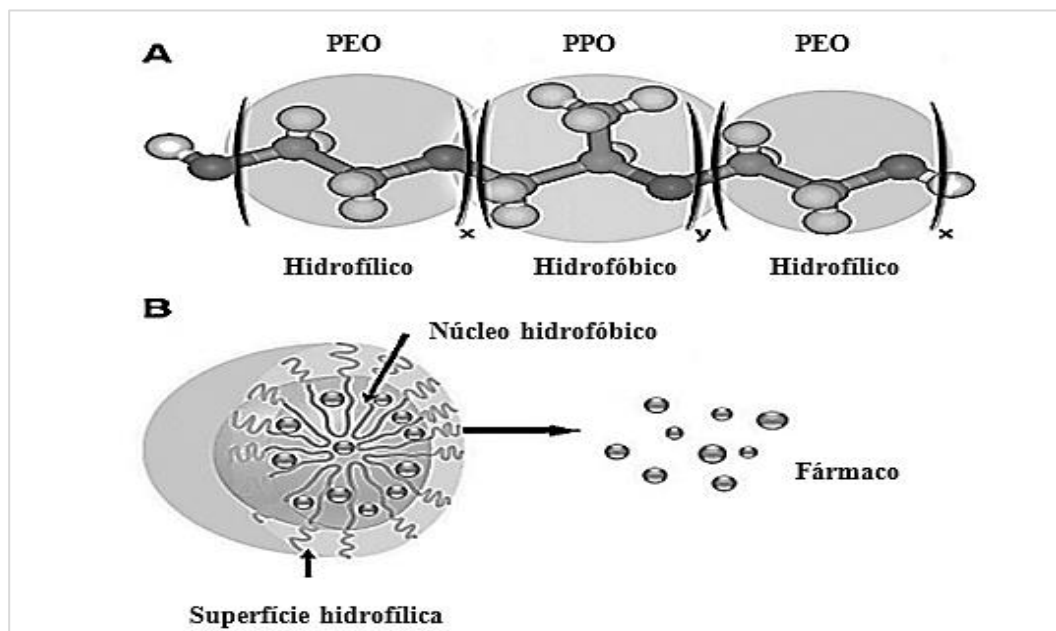


Figura 8. Bloco co-polimérico Pluronic® (A) e micela com fármaco encapsulado (B) (adaptado de Batrakova, *et al.* 2008).

proteínas do soro [Adams, *et al.* 2003], permitindo uma baixa taxa de fagocitose por parte do MPS e um maior tempo de circulação do transportador, tendo uma acção semelhante a resíduos de PEG, que forma uma camada hidratante e repulsiva à volta da nanopartícula, que aliada ao pequeno tamanho e alta curvatura da superfície do sistema, aumenta de forma significativa o seu tempo de circulação. Assim, o maior comprimento de PEO influenciará o tamanho, carga (maior densidade de PEO associada a menor potencial *zeta*), conformação e adsorção do sistema, havendo um maior tempo de circulação e menor índice fagocitário [Dunn, *et al.* 1997; Goppert, *et al.* 2005]. Segundo a literatura, os liposomas de longa circulação (pegilados) apresentam um tempo de circulação superior ($T_{1/2} > 48$ h), comparativamente às micelas poliméricas ($T_{1/2} < 24$ h). No entanto, o facto de as MP's terem uma maior acumulação tumoral, comparativamente aos liposomas, e uma taxa de fagocitose bastante inferior, juntando todas as outras vantagens associadas a estes transportadores, fazem das micelas uma boa escolha quando se trata de novos DDS [Dunn, *et al.* 1997; Nishiyama, *et al.* 2006; Redhead, *et al.* 2001]. A porção hidrofóbica determinará a solubilidade do fármaco e o tamanho da sua cadeia vai influenciar a CMC. O comprimento e a proporção dos blocos hidrofílicos vs hidrofóbicos determinam a capacidade de formar estruturas micelares, bem como a sua conformação. Quanto maior a porção hidrofóbica, mais favorecida é a micela em solução (e menor o CMC), sendo a porção hidrofílica um destabilizador desta estrutura [Kedar, *et al.* 2010]. A principal característica que tem atraído as atenções para este tipo de transportadores é a capacidade dos Pluronic® alterarem a fluidez da membrana celular, interferirem com processos intracelulares de apoptose e serem responsáveis pela depleção de concentrações intracelulares de ATP, inibindo transportadores membranares de efluxo de fármacos (P-gp) e contribuindo para uma inibição da MDR (Fig. 9) [Batrakova, *et al.* 2008; Kedar, *et al.* 2010].

Em termos de libertação do fármaco, o que se pretende é evitar uma alta concentração deste no sangue, minimizando os efeitos secundários, quando comparado com a injeção i.v. do fármaco livre. Assim, as MP's têm mostrado capacidade de libertar o fármaco incorporado de forma lenta e gradual, permitindo um tratamento oncológico mais controlado, junto do tumor alvo. A libertação depende não só do tamanho da micela, mas também da sua constituição polimérica e da quantidade de fármaco que é encapsulado. Assim, a estrutura micelar pode apresentar uma estrutura mais rígida que impede uma libertação brusca do fármaco ou mais líquida, para uma maior difusão deste. Pensa-se que o fármaco pode difundir directamente através das cadeias poliméricas, após dissociação da micela em unímeros ou após internalização do sistema pela célula tumoral. Concluindo, um transportador modificado na superfície permite uma libertação controlada e activa do fármaco junto do seu alvo [Kedar, *et al.* 2010; Kwon, *et al.* 1996].

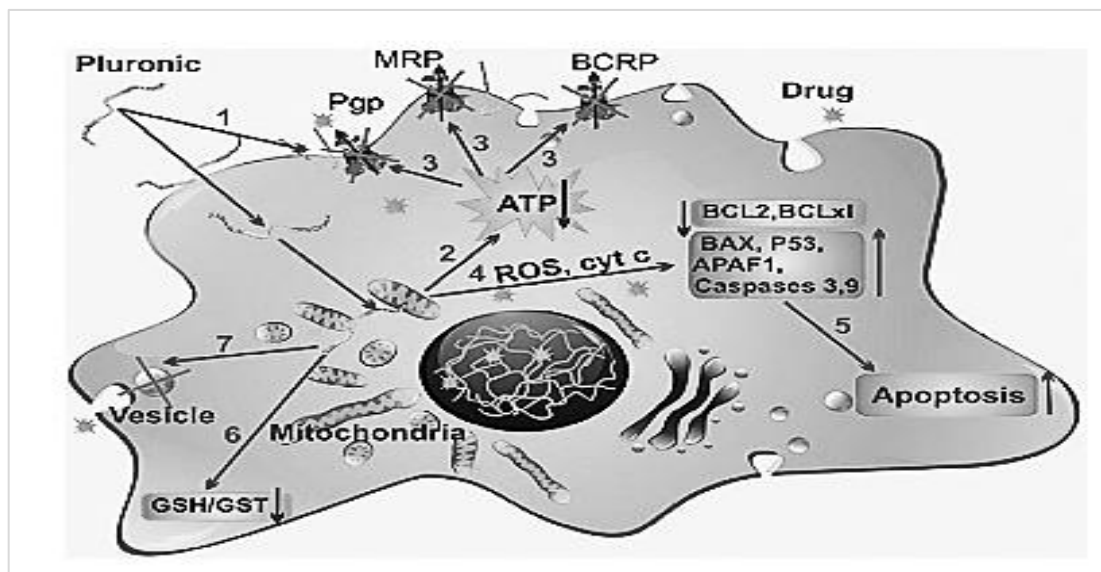


Figura 9. Diversos efeitos provocados pelas MP's em células MDR. 1) Incorporação das micelas na membrana e alteração da sua fluidez; 2) indução da depleção de ATP; 3) inibição dos transportadores de efluxo de fármacos; 4) liberação de citocromo C pela mitocôndria; 5) aumento dos sinais pro-apoptóticos na célula; 6) inibição do mecanismo de detoxificação glutatião/glutatião s-transferase; 7) inibição da sequestração de fármacos por vesículas citoplasmáticas (adaptado de: Batrakova, *et al.* 2008).

A estabilidade das micelas poliméricas é determinada por vários factores, que já foram mencionados, sendo os estudos mais recentes feitos de modo a otimizar formulações já existentes e que já se mostram eficazes como sistemas de entrega de fármacos [Miller, *et al.* 2013; Redhead, *et al.* 2001].

A título de conclusão, este tipo de veículo tem inúmeras vantagens comparativamente a outros sistemas de entrega, pois apresenta um tamanho ideal de cerca de 5-100 nm que lhes permite infiltrar tumores pelo EPR, atravessar a barreira hematoencefálica e minimizar o seu reconhecimento pelo sistema MPS. Desta forma, são reconhecidos pelo seu elevado tempo de circulação, tamanho ideal para maior internalização celular, uma maior biodisponibilidade e solubilidade de fármacos hidrofóbicos, aliado a uma baixa toxicidade [confirmada pela avaliação das condições hepáticas, renais e dos principais órgãos, após injeção endovenosa (i.v.) das MP's] e eficiente excreção renal dos polímeros sintéticos que os constituem (Fig. 10) [Kazunori, *et al.* 1993; Kedar, *et al.* 2010].

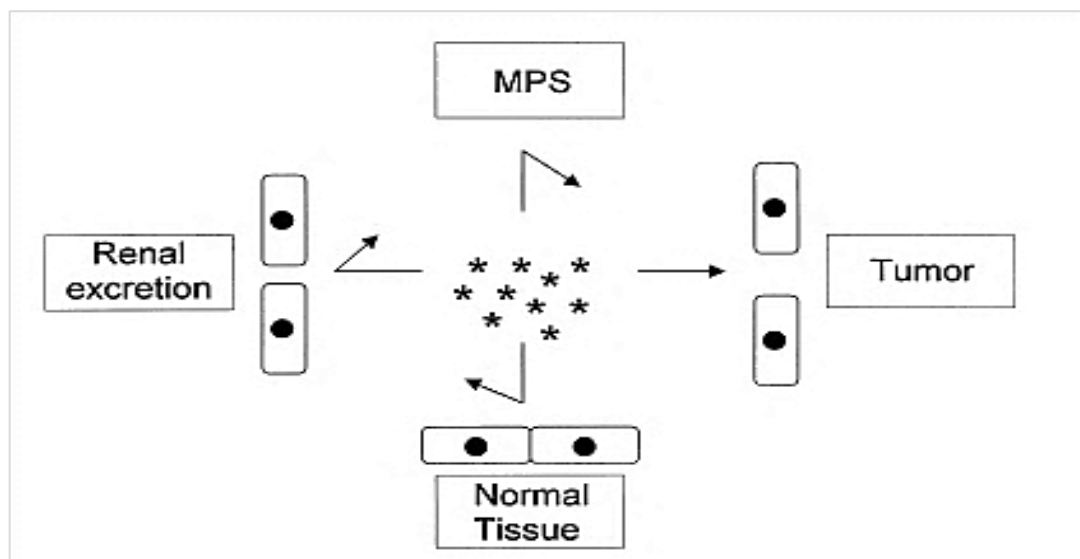


Figura 10. Esquema representativo das vantagens associadas aos sistemas poliméricos em termos de acumulação tumoral e excreção renal (retirado de Jones, *et al.* 1999).

2. Cancro

2.1 – Características da patologia

Uma das patologias em que a aplicação destes nanotransportadores bioconjugados se mostrou promissora é o cancro. Esta doença caracteriza-se por uma proliferação e vascularização descontrolada e pela capacidade de invasão celular (metastização), tendo, portanto, associada uma elevada taxa de mortalidade a nível mundial.

O cancro é a segunda causa de morte do século XXI, (sendo a primeira as doenças cardiovasculares) e é uma das patologias mais complexas e preocupantes na Medicina actual. A estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS) prevê a morte de cerca de 84 milhões de pessoas entre 2005 e 2015, sendo as neoplasias com maior taxa de diagnóstico (em 2008) o cancro do pulmão (1,61 milhões de pessoas), cancro da mama (1,38 milhões de pessoas) e cancro colorectal (1,23 milhões de pessoas). As neoplasias do pulmão, estômago e fígado são as que apresentam maior taxa de mortalidade [Danhier, *et al.* 2010; Ferlay, *et al.* 2010]. Apesar da existência de terapias com maior especificidade tumoral e menor toxicidade (o que poderá melhorar muito a qualidade de vida de doentes com esta patologia), a terapêutica tem-se mantido de certa forma estacionária nos últimos 30 anos, baseando-se na terapia convencional química e/ou radiação, bem como na cirurgia [Farrell, *et al.* 2011]. A remoção cirúrgica de um tumor sólido e do tecido envolvente é das primeiras opções de tratamento quando a localização e tamanho da neoplasia o permitem. No entanto, este procedimento não elimina metastizações e é ineficaz contra tumores não-sólidos. Adicionalmente, um estudo de Shapiro e Fungman (1957) mostrou a ineficácia das terapias convencionais quando usadas individualmente, sendo a multiterapia, ou seja, a combinação de ciclos de quimioterapia, radioterapia e imunoterapia (após cirurgia ou não), uma escolha assertiva [Feng, *et al.* 2003; Gu, *et al.* 2007].

A quimioterapia define-se como a terapêutica química de uma determinada patologia e é amplamente usada no tratamento de neoplasias. Este conceito surgiu nos anos 50, com a utilização do gás mostarda durante a segunda guerra mundial, observando-se o seu efeito em termos de inibição do crescimento celular. A sua aplicação clínica começou nos anos 60 e já existem diferentes agentes aprovados e rotineiramente usados na clínica como fármacos de primeira opção em Oncologia (Paclitaxel, Doxorubicina, Fluoruracil, Cisplatina, Tamoxifeno, etc.) [Peer, *et al.* 2007]. No entanto, esta terapêutica continua a ter imensas desvantagens, pois os agentes quimioterapêuticos convencionais são bastante inespecíficos, tendo uma elevada toxicidade e resultando numa dose subterapêutica, devido à baixa acumulação tumoral. Os doentes sacrificam a sua qualidade de vida e bem-estar, tendo-se muitas vezes resultados práticos pouco eficazes, pois estes agentes requerem tratamentos frequentes com doses elevadas, criando-se o problema de MDR para muitos fármacos que, por vezes, apresentam uma farmacocinética ineficaz. Há, portanto, toda uma dúvida clínica envolvida na escolha entre uma dose elevada que tenha algum efeito terapêutico, associado a diversos efeitos secundários e ao dano de tecidos não-tumorais (medula óssea, fígado, tracto gastrointestinal, por exemplo), e a escolha de uma dose subterapêutica com menor efeito tóxico, mas possível ineficácia clínica. Todavia, a quimioterapia é, sem dúvida, um mercado multimilionário, ocupando cerca de 48% das vendas da indústria farmacêutica, rendendo biliões de dólares anuais [Chabner, *et al.* 2005; Danhier, *et al.* 2010; Feng, *et al.* 2003; Wong, *et al.* 2007].

O cancro caracteriza-se por uma proliferação celular desregulada, pois ocorrem mutações ao nível dos genes que codificam a proteína supressora tumoral (proteína Rb) e a proteína de reparação tumoral (p53) [Qureshi, *et al.* 2011]. Apesar de existirem ainda algumas lacunas no conhecimento sobre a formação e metastização de neoplasias, sabe-se que há uma contribuição de factores externos como o tabaco, radiação e compostos químicos e ainda de factores internos, como predisposição genética, alterações hormonal e do sistema imunitário. Pode haver uma contribuição individual ou em conjunto destes factores para a carcinogénese, demorando até 10 anos para que uma simples mutação pontual leve ao

desenvolvimento de uma célula tumoral. As alterações mais proeminentes ao nível das células tumorais, comparativamente ao tecido normal e que são amplamente explorados na terapia, são a morfologia da vascularização, metabolismo/pH e ainda o desenvolvimento de resistência a determinados fármacos, como por exemplo o Paclitaxel [Feng, *et al.* 2003].

2.1.1 – Morfologia do sistema endotelial

Estas células proliferam e dividem-se de forma descontrolada, formando uma massa tumoral com elevadas exigências metabólicas, que tornam o meio envolvente escasso em nutrientes e, por vezes, em oxigénio, levando à morte das células sãs envolventes. Assim, há uma elevada vascularização destes tecidos, o que contribui ainda mais para a sua rápida proliferação, pois o tumor tem fácil acesso a todos os componentes essenciais ao seu crescimento. Além de uma potenciação do processo de formação e novos vasos sanguíneos, há também uma alteração na morfologia da árvore vascular tumoral. A árvore vascular é heterogénea, havendo zonas de necrose e zonas de elevada vascularização. Os seus endotélios apresentam poros entre as células vizinhas, que podem variar entre os 10 e os 1 000 nm. Este fenómeno foi denominado de EPR e permite uma maior acumulação de transportadores farmacológicos no espaço intersticial do tumor. Assim, em termos de árvore vascular, o microambiente tumoral caracteriza-se por ter uma extensa angiogénese, ausência de tecido muscular liso, poros nos endotélios, alterações do fluxo sanguíneo e uma drenagem linfática ineficiente, que promovem uma elevada pressão intersticial e consequente retenção de fluidos (Fig. 11) [Alexis, *et al.* 2008; Danhier, *et al.* 2010; Feng, *et al.* 2003].

Para proliferar o tumor necessita de espaço, libertando proteases para o meio, que hidrolisam a matriz extracelular, permitindo a sua extravasão para o tecido endotelial e rápida realocização pelo organismo (metastização), sendo uma fase bastante delicada e progressiva da doença. Concluindo, é uma patologia crónica, grave, com elevadas exigências terapêuticas, pelo que actualmente se desenvolve um enorme esforço tecnico-científico para procurar novas formas de neutralizar estas células com a maior comodidade e menor toxicidade para o doente, apostando-se num aumento da sua qualidade de vida aliada a um possível aumento da taxa de sobrevivência [Brannon-Peppas, *et al.* 2004; Danhier, *et al.* 2010].

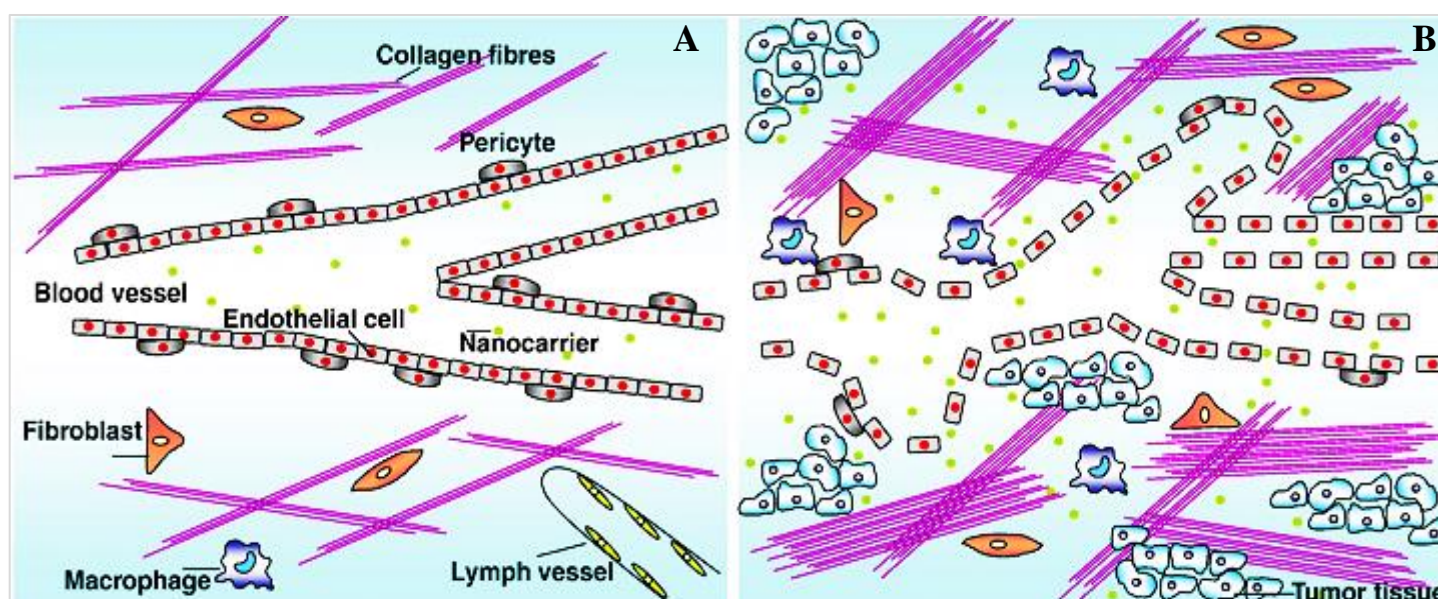


Figura 11. Diferenças morfológicas de um tecido normal e de um tecido neoplásico, responsáveis pelo efeito da permeabilidade e retenção. (A) Tecido normal que contém vasos endoteliais lineares e sem defeitos, sendo as células epiteliais mantidas por estruturas de conexão. As fibras de colagénio, fibroblastos e macrófagos encontram-se na matriz extracelular. (B) Tecido cancerígeno, cujos vasos endoteliais contêm defeitos morfológicos, tendo uma maior quantidade de macrófagos e fibras de colagénio no espaço extracelular e um sistema linfático escasso ou com drenagem alterada (Danhier, *et al.* 2010).

2.1.2 – Metabolismo, pH e metastização

As células neoplásicas conseguiram evoluir de forma a sobreviver e adaptar-se ao ambiente envolvente, tirando partido deste para induzir a sua angiogénese e consequente metastização. Este microambiente tumoral é definido pela remodelação celular do tumor, suas alterações metabólicas, organização da matriz extracelular e recrutamento de vários factores inflamatórios e células do sistema imunitário [Swartz, *et al.* 2012]. Apesar destas células terem um pH intracelular semelhante aos tecidos normais, o seu metabolismo próprio deu aso a um abaixamento do pH extracelular que anda à volta do 6,0 e 7,0. Esta característica provém da alta taxa glicolítica, associada às células cancerígenas sujeitas a baixos níveis de oxigénio (hipoxia), como é o caso de células localizadas numa zona mais central ou nuclear do tumor. No entanto, sabe-se que esta taxa glicolítica é também explorada em condições aeróbias, sendo esta condição designada por efeito de *Warburg*. Esta teoria define que os tumores não tiram partido de uma metabolização completa de glicose e produzindo lactato em vez de dióxido de carbono. Isto advém do facto destas células possuírem mutações ao nível das enzimas mitocondriais, como a ATP sintase (tendo um desacoplamento da fosforilação oxidativa) e enzimas chave como a succinato desidrogenase e fumarato hidratase, que são essenciais para uma progressão do metabolismo glicolítico ao nível do ciclo de *Krebs*. Como o consumo de glicose nestas células é bastante eficaz, a sua oxidação completa poderia levar a uma produção de ATP que superasse a demanda energética do tumor. Mais do que obter energia, estas células necessitam de uma constante manutenção de cofactores enzimáticos como o NAD⁺, para manter a elevada taxa glicolítica e, ainda, da biomassa disponível para uma rápida e eficiente divisão e proliferação celulares. Isto pressupõe uma constante reciclagem de nicotinamida pela conversão de piruvato e lactato, bem como da glicose-6-fosfato desviada para o metabolismo das pentoses-fosfato, que permite a formação de intermediários para a síntese de ADN [Danhier, *et al.* 2010; Feron 2009]. Este desvio metabólico leva a uma superprodução de lactato que, sendo libertado para o meio, provoca um abaixamento de pH, contribuindo para a formação de um microambiente ácido que se tem tornado vantajoso em termos de sobrevivência tumoral. Estudos já evidenciaram que estas condições são importantes para a degradação da matriz extracelular (por induzir a actividade de proteinases do meio e revelar toxicidade para as células normais envolventes), por promover a angiogénese e inibir a resposta inflamatória. Em suma, a evolução tumoral permitiu a sua rápida adaptação e criação de um microambiente propício à sobrevivência neoplásica, permitindo a sua constante imortalização e proliferação celular, aliada a uma fácil metastização promovida pelo efluxo de protões/lactato. O pH ácido extracelular é um factor chave para uma invasão local de células tumorais quer *in vitro*, quer *in vivo* [Estrella, *et al.* 2013].

2.1.3 – MDR

Uma outra característica das células tumorais a salientar é a sua resistência a determinados fármacos, como por exemplo o Paclitaxel, que se designa por MDR [Wang, *et al.* 2011]. Esta resistência pode surgir devido a uma redução ineficaz do tumor ou a uma reincidência após quimioterapia. Uma proteína membranar muito conhecida e que funciona como um agente activo de extrusão de fármacos é a glicoproteína-p. Esta proteína foi descoberta em 1976 e rapidamente associada a uma diminuição intracelular de fármacos, por um mecanismo dependente da hidrólise de ATP (transporte activo primário). No entanto, as células apresentam apenas dois genes para codificar a Pg-p, existindo muitos mais, associados a uma baixa eficácia da quimioterapia. Certas células tumorais contêm, ainda, transportadores da família das MRP (“*Multidrug Resistance -Associated Proteins*”), que estão presentes na membrana celular e funcionam como transportadores aniónicos que fazem extrusão do fármaco que se encontra no interior da célula. A glicoproteína-p, pertencente à classe MRP2, é responsável pela diminuição da concentração de fármacos no interior do tumor, contribuindo para a sua resistência. Um estudo em que se inibiu a sequência que codifica este transportador, numa linha celular de hepatócitos, demonstrou uma

maior sensibilidade das células perante vários agentes quimioterapêuticos, indicando o seu envolvimento na MDR de neoplasias [Borst, *et al.* 2000]. Este mecanismo de MDR é multifactorial, pois associado a este mecanismo de efluxo poderá haver alteração de enzimas como a topoisomerase, glutatíon-s-transferase, etc. e ainda a concentração do fármaco em vesículas intracelulares acídicas, que são degradadas ao nível de lisosomas [Haley, *et al.* 2008; Serpe 2007]. Além de factores associados à química tumoral, também a sua morfologia e árvore vascular estão envolvidas na resistência a agentes quimioterapêuticos. Pondo de parte o tumor em si, é importante considerar que todas as barreiras fisiológicas envolvidas na via de administração do fármaco, bem como a sua biodistribuição e excreção, constituem também parâmetros importantes quando se avalia o efeito terapêutico ou a sua resistência por parte da neoplasia [Vauthier, *et al.* 2003]. A MDR é uma componente importante a considerar, quando se pensa em novas terapias para o cancro, tendo-se mostrado a nanotecnologia muito promissora nesta área. Estas partículas permitem não só uma internalização pela via endocítica das partículas, evitando a sua acumulação em vesículas, mas também a retenção no lisosoma e associação a transportadores membranares, aliada a componentes matriciais que podem ter propriedades anti-MDR (ex: Poloxâmeros) [Batrakova, *et al.* 2008; Kwon, *et al.* 1996].

2.2 – Cancro da mama

Entre mulheres, o cancro da mama continua a ser o carcinoma mais frequente, tendo uma elevada incidência e a maior taxa de mortalidade a seguir à neoplasia do pulmão. Em 2008 foram diagnosticados 1,38 milhões de novos casos desta patologia e em 2012 previu-se a morte de quase 400 000 mulheres, devido a cancro da mama agressivo e invasivo. Esta patologia pode variar consoante a etnia, situação demográfica, predisposição genética da mulher e a sua idade. Cerca de 10 a 15% de todos os carcinomas da mama afectam mulheres com idade inferior a 35 anos e cerca de 40% destes casos envolvem uma pré-disposição genética que pode derivar de uma mutação genética dos genes BRCA1/BRCA2 (3-8% de todos os casos), que geram proteínas essenciais em mecanismos de reparação de ADN [Lux, *et al.* 2006; Ma, *et al.* 2013]. Apesar da sua elevada incidência, é das neoplasias que inclui a possibilidade de rastreio, feito pela própria mulher ou em termos clínicos, sendo a mamografia uma técnica imagiológica que tem vindo a aumentar a probabilidade de detecção precoce desta patologia, diminuindo a taxa de mortalidade. Todavia, a metastização associada a este carcinoma continua associado a um mau prognóstico, tendo elevados índices de mortalidade que se devem essencialmente ao problema da resistência a fármacos recorrentes na clínica oncológica ou ineficácia do tratamento devido à elevada heterogeneidade e possíveis subtipos celulares deste carcinoma [Al-Hajj, *et al.* 2003; Tanaka, *et al.* 2009]. Apesar de 95% das neoplasias de mama terem origem epitelial, estes carcinomas são conhecidos por terem uma elevada heterogeneidade celular, sendo classificados de acordo com um fenótipo dominante em termos histopatológicos, moleculares e de expressão génica [Al-Hajj, *et al.* 2003].

Diversas linhas celulares mantidas em cultura, derivadas de diferentes massas celulares de carcinoma de mama, associadas a vários modelos *in vivo* já utilizados e descritos, permitiram identificar diferentes marcadores e características histopatológicas e bioquímicas que permitem diferenciar a heterogeneidade deste tecido e prever o seu comportamento face às terapias existentes [Lacroix, *et al.* 2004]. Assim, foi possível restringir a classificação molecular em três subtipos celulares, que apresentam diferentes respostas terapêuticas, sobrevivência e capacidade de metastização. Estes fenótipos incluem então um perfil luminal que inclui células que sobreexpressam receptores de estrogénio (células positivas para este receptor - ER+) e marcadores epiteliais como a E-caderina, células do tipo basal que inclui para além do perfil ER+, sobreexpressão de receptores para o factor de crescimento epidérmico (HER2+) e, por fim, células do tipo triplo negativo que não expressam receptores hormonais de estrogénio ou progesterona nem o HER2 [Johnston 2011; Tomaskovic-Crook, *et al.* 2009]. Cerca de 60% dos carcinomas de mama são positivos para os três tipos de receptores (HER2+, ER+ e progesterona -

PR+), sendo uma pequena fracção destes tumores (15%) ricos em células triplo negativas, sendo a mutação do gene BRCA1 responsável por grande parte destes carcinomas. As células da mama em estado não-patogénico possuem um fenótipo do tipo epitelial, expressando diversos factores associados a este tipo de células e os subtipos neoplásicos que mantêm este fenótipo acabam por não ser tão agressivos ou invasivos, tirando a sobreexpressão do receptor HER-2 que agrava o prognóstico [Chen, *et al.* 2009]. No entanto, apesar de estar ainda em discussão, pensa-se que o principal problema associado ao carcinoma de mama e que lhe confere a elevada heterogeneidade e variada resposta terapêutica é a capacidade das células alterarem o seu perfil molecular e genético, expressando um fenótipo característico do tecido mesenquimatoso ou basal (existência de marcadores como a N-caderina, vimentina e laminina), cujo principal problema é a capacidade de degradar a matriz extracelular a induzir a progressão tumoral. A esta mudança fenotípica dá-se o nome de transição epitelial-mesênquima (EMT) e pode ser o principal responsável por um carácter mais agressivo da neoplasia da mama e sua capacidade de reincidência, com menor resposta à quimioterapia [Katz, *et al.* 2011; Tomaskovic-Crook, *et al.* 2009].

Os tratamentos primários para neoplasias da mama envolvem a intervenção cirúrgica, radiação e terapias adjuvantes hormonais/endócrinas, imunoterapia ou quimioterapia sistémica [Fernandez, *et al.* 2010]. As células triplo positivas são menos agressivas, pois respondem de forma eficaz a terapias hormonais combinadas. O fármaco mais comum no tratamento deste tipo de tumor envolve análogos do estrogénio como o Tamoxifen ou inibidores de enzimas envolvidas na síntese de hormonas andróides como os inibidores da aromatase. O Tamoxifen tem-se mostrado eficaz em termos de aumento da sobrevivência dos doentes e 5 anos de terapia adjuvante deste fármaco com taxanos ou alcalóides já consegue reduzir a taxa de mortalidade em cerca de 31% [Abbasalipourkibir, *et al.* 2010; Johnston 2011; Tanaka, *et al.* 2009]. Dentro deste subtipo, há um caso particular de neoplasias que expressam mais receptores HER-2, que são responsáveis por activar cascatas intercelulares de proteínas cinases envolvidas nas vias RAS/MAP, que estimulam a proliferação e a sobrevivência celular. O tratamento mais comum para este tipo de tumor envolve a imunoterapia com um anticorpo (Trastuzumab) direccionado para o receptor HER-2. Terapias combinadas de Paclitaxel com Docetaxel também se têm mostrado promissoras no que se refere à disseminação destes tumores, aumentando a eficácia terapêutica em relação à monoterapia destes fármacos de 40% para 61% [Chen, *et al.* 2009; Fernandez, *et al.* 2010; Tanaka, *et al.* 2009].

As células do último subtipo (ER-, PR- e HER-2-) incluem os tumores do tipo basal, com perfil mesenquimatoso, altamente invasivo e com resposta ineficaz a terapias endócrinas, pois não há um marcador específico para este tipo de carcinoma. A primeira linha de escolha para tratar este tipo de cancro da mama baseia-se em regimes de quimioterapia usando taxanos ou alcalóides que, apesar de aumentarem a sensibilidade das células ao fármaco, acabam por ter, quando associados, doses consideradas subóptimas, com resultados clínicos pouco significativos a longo prazo. Desta forma, ocorre uma maior taxa de reincidência local e sistémica, acompanhada de um maior índice de metastização (para o pulmão, ossos e cérebro) [Chen, *et al.* 2009; Tanaka, *et al.* 2009]. Tendo em conta a recente relação deste fenótipo tumoral com mutações ao nível dos genes BRCA, envolvidos em mecanismos de transcrição, regulação e reparação homóloga de cromosomas, tem-se vindo a estudar a sensibilidade destas células a agentes causadores de lesões no ADN, como a inibição das PARP [Polimerase de Poli (ADP-ribose)]. Até à data nenhum destes agentes foi aprovado para uso clínico recorrente, mas ensaios clínicos têm mostrado alguma promessa como agentes oncológicos para doentes com este fenótipo tumoral, negativo para os diversos receptores [Telli, *et al.* 2010]. A metastização é responsável pela elevado índice de mortalidade associado a este carcinoma e, apesar do sucesso terapêutico contra este tipo de progressão tumoral ter vindo a aumentar nos últimos anos (graças à introdução de inibidores de aromatase de terceira geração e possíveis terapias direccionadas), o tempo de sobrevivência associado a este estadio da doença é somente de 18 a 24 meses e apenas 20% das doentes sobrevivem aos 5 anos que sucedem o primeiro diagnóstico [Fernandez, *et al.* 2010; Iorns, *et al.* 2012].

Apesar de existirem inúmeras terapias proeminentes em fase clínica [Fernandez, *et al.* 2010], a nanotecnologia surgiu

como uma possível alternativa terapêutica que poderá potenciar o efeito de fármacos clássicos que já mostraram efeitos clínicos relevantes face a neoplasias de mama mais agressivas [Wong, *et al.* 2006]. Como já foi mencionado, este tipo de transportadores, quando devidamente formulados, permitem um maior direccionamento farmacológico associado a doses terapêuticas que são mantidas após uma libertação controlada e uma internalização eficaz da NP, que diminui a ocorrência de insensibilidade à quimioterapia ou MDR. Já existem alguns transportadores, aprovados ou em ensaios clínicos promissores, para uso na prática oncológica contra carcinoma avançado de mama, como o Abraxane®, uma NP que contém Ptx (aprovada pela FDA em 2005) (que permitiu aumentar a internalização e a biodisponibilidade do Taxol®, minimizando os seus efeitos secundários) e o Myocet (aprovado no Canadá e Europa para tratamento de cancro da mama metastático) que é um liposoma semelhante ao Doxil®, não-pegilado. Em termos de significado clínico, este transportador tem a mesma eficácia que o Doxil®, mas com menores efeitos tóxicos e maior e mais rápida libertação do fármaco encapsulado [Schutz, *et al.* 2013; Wang, *et al.* 2013].

2.3 – Terapia antineoplásica

A quimioterapia e a radioterapia convencionais, apesar de neutralizarem as células tumorais, estão associadas a elevadas doses terapêuticas que provocam efeitos citotóxicos para as restantes células do organismo e estão muitas vezes associadas ao desenvolvimento de resistência ao tratamento escolhido. O desenvolvimento de novos fármacos é um processo demorado e extremamente dispendioso, sendo a procura de novas vias de administração e a formulação de novos transportadores direccionados uma forma mais barata e eficaz de otimizar fármacos existentes, potenciando-se o seu efeito terapêutico enquanto se minimizam os seus efeitos secundários [Feng, *et al.* 2003]. Como já foi abordado neste trabalho, existem inúmeros tipos de nanotransportadores, cuja manipulação da superfície e fisico-química permite obter uma maior especificidade e aumentar a biodisponibilidade do fármaco com uma menor dosagem. A nanotecnologia permite tirar partido de uma terapia tumoral passiva, devido à morfologia particular das neoplasias ou de uma terapia activa que permite uma maior eficácia terapêutica. Há que ter em conta que, de modo a tirar partido de uma entrega activa eficaz, existem diversas barreiras passivas a ser ultrapassadas [Alexis, *et al.* 2008; Feng, *et al.* 2003]. A terapia baseada no direccionamento é definida pelos cientistas e oncologistas como um mecanismo realizado por um agente farmacológico, que actua sobre uma molécula/alvo específico ou numa via de sinalização biológica, causando a regressão da neoplasia ou a sua disseminação. Algumas das terapias existentes baseiam-se no tratamento hormonal (cancro da mama e próstata), no uso de pequenos inibidores de enzimas ou proteínas, fármacos pro-apoptóticos, agentes antiangiogénicos e, ainda, na terapia combinada com anticorpos [Alexis, *et al.* 2008; Ross, *et al.* 2004].

2.3.1 – Terapia de alvo passivo

Tendo em conta os diversos alvos terapêuticos, a nanobiotecnologia representa uma terapia por processos passivos e activos. O processo passivo tira partido das características fisico-químicas do transportador e das propriedades inerentes às células tumorais, tal como a sua elevada vascularização, drenagem linfática disfuncional e uma elevada retenção de fluidos no seu espaço intersticial [Gu, *et al.* 2007; Misra, *et al.* 2010]. Estas características tornam o tecido epitelial anormal, com um espaçamento celular de cerca de 400 a 600 nm. Assim, existem NP's que possuem um efeito de permeabilidade e retenção induzidos, isto é: o transportador extravasa rapidamente através do tecido endotelial do tumor e, como este tem um sistema linfático pouco desenvolvido, ocorre uma maior acumulação do fármaco no interior do tumor, diminuindo a dose inicial do mesmo. Alguns estudos já indicaram que apesar de este processo não ser o direccionamento ideal, apresenta uma acumulação de sistemas transportadores, cerca de cem vezes superior, comparativamente a outros tecidos, [Byrne, *et al.*

2008; Gu, *et al.* 2007].

Existem mais duas formas de terapia passiva que tiram partido do microambiente tumoral e uma terceira que consiste na administração local do fármaco. Em relação ao microambiente o que acontece é que o sistema de transporte de fármacos usado tem características intrínsecas que lhe permitem beneficiar de alterações de pH do meio (no caso dos tumores um meio ácido), meio redox e presença de certas enzimas do tumor. Desta forma, o sistema mantém-se estável até chegar ao tumor alvo e somente se degrada a pH ácido ou após hidrólise por determinadas metaloproteinases, por exemplo, libertando o seu conteúdo terapêutico. Neste caso, temos o exemplo de liposomas sensíveis a pH, que se mantêm estáveis a pH fisiológico, sendo a sua degradação e consequente libertação do fármaco induzida pelo abaixamento do pH ao longo da via endocítica (via preferencial de internalização destes sistemas) [Misra, *et al.* 2010]. A administração local de fármacos consiste numa injeção intratumoral, sendo uma técnica que evita a circulação do fármaco, diminuindo, portanto, o risco de toxicidade, mas é bastante invasiva e requer quantidades elevadas do fármaco. Todavia, este processo tem as suas desvantagens pois, dependendo das características do sistema transportador e das células tumorais em si, este direccionamento passivo pode não ser suficiente para atingir uma concentração terapêutica eficaz [Sinha, *et al.* 2006].

2.3.2 – Terapia de alvo activo

O alvo neoplásico ideal é definido como uma macromolécula que é sobreexpressa em células malignas, mas inexistente nas restantes células, havendo uma acumulação selectiva do fármaco somente no tumor, minimizando-se os efeitos tóxicos sistémicos. Deveria ser uma molécula facilmente isolada e quantificada em amostras de doentes oncológicos, com elevada correlação com o prognóstico clínico [Gu, *et al.* 2007; Ross, *et al.* 2004]. Em termos de alvos tumorais temos, por exemplo, certas proteínas/glúcidos e receptores (por ex: transferrina, folato e estrogénio), que são sobreexpressos nestas células e que podem ser associados à superfície do transportador - designados de sistemas ternários - permitindo uma maior especificidade terapêutica [Misra, *et al.* 2010]. Como já foi mencionado, existem actualmente inúmeros anticorpos aprovados pela FDA e que estão em estudo associados a novos transportadores antineoplásicos. Estes anticorpos foram modificados, sendo completamente humanizados ou são quimeras (utiliza-se somente uma cadeia única do fragmento do anticorpo inicial). Tornaram-se então moléculas facilmente estabilizadas após ligação ao transportador e com uma resposta imunológica muito inferior [Alexis, *et al.* 2008; Ross, *et al.* 2004]. Um outro alvo terapêutico bastante promissor é o tecido endotelial do tumor, usando fármacos antiangiogénicos associados a nanopartículas direccionadas para este tecido, tenta-se neutralizar o tumor bloqueando o fornecimento de nutrientes e oxigénio. A angiogénese é um processo crucial para a proliferação tumoral e requer a sinalização de diversos factores angiogénicos libertados pelas células tumorais. Desta forma, este constitui um alvo importante na terapia tumoral, uma vez que a utilização de sistemas transportadores de fármacos antiangiogénicos que inibem a libertação de factores como o VEGF (factor de crescimento vascular endotelial), metaloproteinases e factores de crescimento de fibroblastos e plaquetas se têm mostrado importantes para diminuir a vascularização tumoral [Brannon-Peppas, *et al.* 2004; Byrne, *et al.* 2008; Gerber, *et al.* 2005].

O processo activo é bastante vantajoso, comparativamente ao passivo, pois detém uma maior especificidade terapêutica. Modifica-se a superfície dos sistemas de transporte de modo a que eles interajam com o seu alvo específico. Existem estudos realizados com sistemas cuja superfície contém um aglomerado de glúcidos direccionados contra a lectina encontrada na superfície tumoral (estratégia que requer optimização, pois a lectina existe à superfície de outras células); contra vários receptores como folato; hormonais como estrogénio e progesterona (no caso do cancro da mama) e ainda receptores de lipoproteínas. Uma nova classe de ligandos são os aptâmeros, pequenas sequências de cadeia única de ADN ou ARN, que não são imunogénicos, sendo facilmente sintetizados e modificados com produção e larga escala. A sua elevada

especificidade já mostrou potencialidade terapêutica em termos de estudos *in vivo* [Alexis, *et al.* 2008; Byrne, *et al.* 2008]. Desta forma, há libertação do fármaco somente nas células a tratar, minimizando os efeitos secundários e permitindo também tirar partido de uma maior internalização dos sistemas, ultrapassando-se o problema da MDR. Em suma, investe-se cada vez mais na nanotecnologia que combine uma libertação controlada no espaço e no tempo de fármacos já utilizados na terapia antineoplásica convencional (por ex: doxorubicina e taxanos, como o Paclitaxel), para potenciar a sua farmacocinética e biodistribuição [Gu, *et al.* 2007].

2.3.3 – Paclitaxel

O Taxol[®] (Bristol-Myers Squibb – BMS, Nova Iorque) é o fármaco anticancerígeno com mais sucesso clínico na terapia oncológica. Em 1999 a venda deste fármaco rendeu cerca de 1,5 biliões de dólares e, apesar da diminuição deste valor em 2006 e 2007 (devido à expiração dos períodos de patentes e desenvolvimento de medicamentos genéricos), continua a ser um dos fármacos de escolha para o tratamento de vários tipos de neoplasia e as suas vendas rendem cerca de 1 bilião de dólares, actualmente. É um diterpeno da família dos Taxanos, com a fórmula molecular $C_{47}H_{51}NO_{14}$, sendo composto por três sistemas de anéis, cada um com a sua função (Fig. 12) [Malik, *et al.* 2011]. Este fármaco foi desenvolvido a partir de Paclitaxel que é um produto natural, extraído pela primeira vez da casca e das agulhas do teixo do pacífico em 1960. É amplamente usado na clínica para o tratamento de cancro da mama, ovário, pulmão, cólon, bexiga, mieloma múltiplo e sarcoma de Kaposi, tendo sido aprovado pela FDA em 1992 [Fonseca, *et al.* 2002; Mandal, *et al.* 2009; Nie, *et al.* 2011;

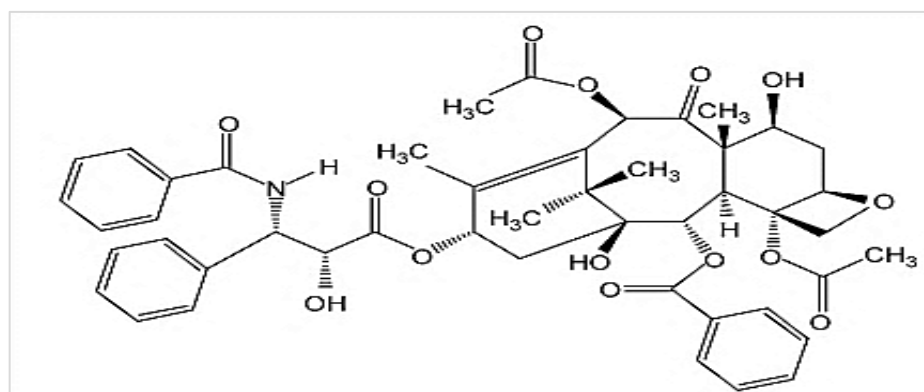


Figura 12. Estrutura química do fármaco Paclitaxel (retirado de: Zhang, *et al.*, 2005).

Yoncheva, *et al.* 2012; Zhang, *et al.* 2013]. Apesar do seu grande sucesso clínico, este fármaco apresenta algumas desvantagens, tais como um elevado peso molecular (MM=854 Da), baixa solubilidade em água ($\approx 0,3-1 \mu\text{g/ml}$), tempo de vida curto (cerca de 5,8 horas) e o facto de ser substrato para a P-gp (desenvolvimento de MDR) e para o citocromo P-450 (uma enzima essencial para a detoxificação hepática). Para ultrapassar o problema da solubilidade, as formulações comerciais de Paclitaxel consistem numa infusão endovenosa de etanol e óleo de castor polioxiethylado ou “Cremophor EL” (1:1, v/v). Todavia, é necessário um volume de cerca de 26 ml de “Cremophor EL” para solubilizar o Ptx (por injeção/por doente), tendo este associados inúmeros efeitos secundários, tais como neuro e nefrotoxicidade e reacções sistémicas (por vezes fatais), devido à sua interacção com proteínas do soro [Cline, *et al.* 2013; Fonseca, *et al.* 2002; Yoncheva, *et al.* 2012; Zhang, *et al.* 2010]. Este composto é um inibidor mitótico potente e, contrariamente a muitos fármacos antineoplásicos, contribui para a estabilização dos microtúbulos do citoesqueleto, impedindo a progressão normal do ciclo celular [Zhang, *et al.* 2013].

Os microtúbulos são o terceiro elemento constituinte do citoesqueleto, sendo formados por heterodímeros das proteínas α e β tubulina. São importantes para determinar a morfologia celular, o seu movimento, transporte de vesículas intracelulares e no processo de divisão celular ou mitose. Estes dímeros podem despolimerizar ou polimerizar, estando os microtúbulos

sujeitos a ciclos de montagem e desmontagem muito rápidos. Ambos os tipos de tubulina são capazes de ligar moléculas de GTP, que são responsáveis por mediar o processo de hidrólise para o prolongamento ou encurtamento dos microtúbulos. Isto é determinado pela taxa de tubulina associado a GTP, comparativamente à sua hidrólise. Se o número de dímeros de GTP se mantiver superior à taxa de hidrólise ocorre prolongamento da cadeia heterodimérica, se, por outro lado, a hidrólise de GTP for mais rápida ocorre o encurtamento e dissociação de tubulina. Esta permuta de ciclos de crescimento e encurtamento de microtúbulos designa-se por instabilidade dinâmica e o controlo deste processo é extremamente importante para a formação e contracção do fuso mitótico e para uma segregação cromosómica correcta [Amos 2000; Amos 2004; Cooper 2000; Jordan, *et al.* 2004]. A estrutura e a dinâmica dos microtúbulos encontram-se esquematizadas em seguida (Fig. 13). A actividade antineoplásica do Ptx deve-se essencialmente ao anel A, à cadeia amínica lateral, ao grupo benzoíla do carbono 2 e ao anel de oxetano. O grupo acil-amida do carbono 13' mantém a sua actividade e o hidroxilo (carbono 2) potencia o efeito anti-tumoral. O Ptx consegue infiltrar-se no microtúbulo através de pequenas aberturas da sua estrutura, onde ganha acesso ao

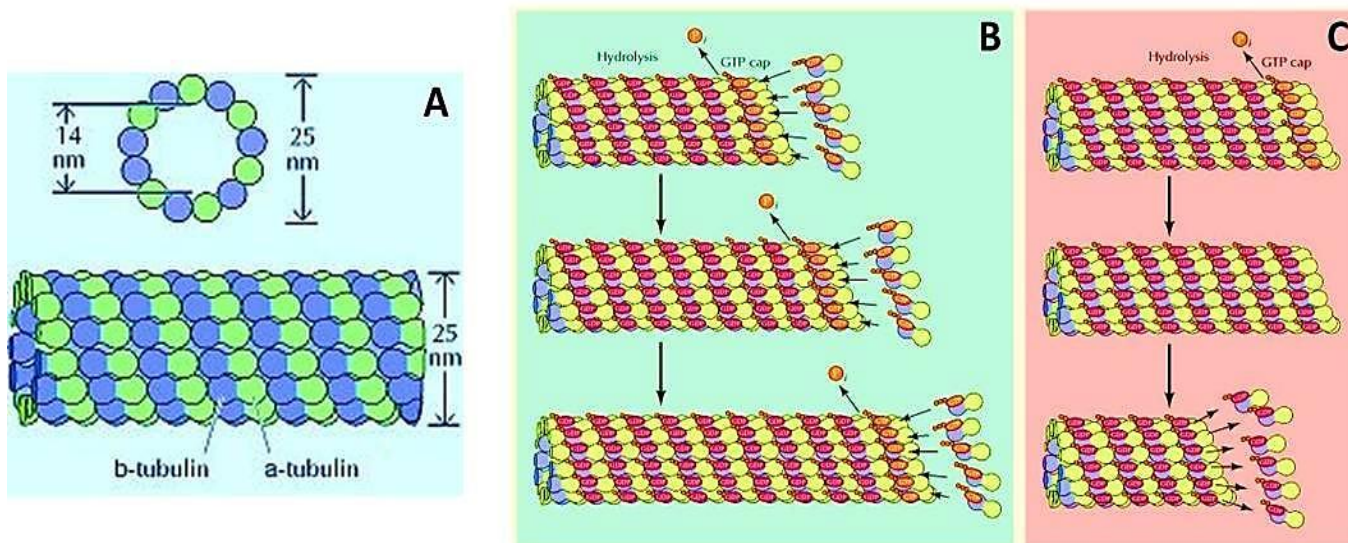


Figura 13. Imagens representativas da estrutura dos microtúbulos (A) formados a partir de dímeros de α e β tubulina e da sua dinâmica instável (B e C). A imagem b representa a situação em que há elevada concentração de moléculas de tubulina com GTP, havendo adição sucessiva de novos dímeros e crescimento da cadeia, pois mantém-se um *cap*-GTP, que inibe a hidrólise. Já a imagem C, representa a situação em que a taxa de hidrólise supera o número de moléculas associadas a GTP, havendo uma rápida dissociação do microtúbulo (adaptado de *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition; 2000).

seu interior e se liga ao grupo amínico terminal da β -tubulina. Com isto, ocorre uma mudança conformacional da tubulina (por um mecanismo ainda desconhecido), tendo esta maior afinidade para novas moléculas de tubulina vizinhas, o que leva a uma polimerização e estabilização da sua estrutura. Este processo ocorre mesmo na ausência de GTP, um factor importante na dinâmica destes constituintes celulares, e pensa-se que há uma relação estequiométrica de 1:1 entre o Ptx e as moléculas de tubulina, sendo uma baixa concentração deste fármaco bastante eficaz na estabilização dos microtúbulos. Ocorre então uma inibição da dinâmica instável dos microtúbulos, havendo uma organização incorrecta do fuso mitótico e cessação do processo de divisão celular. Prevê-se que este fármaco actue num passo tardio da fase G2 ou no início da mitose (fase M), estabilizando os microtúbulos do citoesqueleto, promovendo a sua polimerização e alongamento, o que impede a progressão do ciclo celular [Chen, *et al.* 2001; Jordan, *et al.* 2004; Malik, *et al.* 2011; Mandal, *et al.* 2009; Zhang, *et al.* 2013].

As características inerentes ao Ptx levaram à realização de diversos estudos *in vitro* e *in vivo*, de modo a determinar o perfil dose/resposta deste fármaco. Este composto apresenta um perfil de acção muito próprio, sendo o seu efeito terapêutico dependente da dose administrada, do tempo de exposição e da fase do ciclo celular em que se encontram as células. Um estudo realizado em clonogénicos de oito linhas celulares diferentes mostrou que o efeito do Ptx se observa passado 24 h de exposição, para concentrações mais baixas do fármaco (cerca de 10-50 nm), sendo este efeito observável ao longo de 72 h de exposição. No entanto, para concentrações acima dos 10 000 nm ocorreu uma certa sobrevivência por parte das células, o

que pode dever-se ao efeito da solução de Taxol ou à própria MDR adquiridas pelas células. Concluiu-se, ainda, que este fármaco só tem efeito em células que se encontrem numa fase exponencial ou proliferativa e não numa fase *plateau*, dado o seu efeito ao nível mitótico [Liebmann, *et al.* 1993].

Dado o elevado sucesso deste fármaco, existe actualmente um problema grave associado à sua extracção e produção. Sabe-se que são necessárias cerca de 3 000 teixos do pacífico para extrair cerca de 1 Kg de Paclitaxel, sendo que 2,5-3 g deste composto são usados no tratamento de cada doente oncológico. A procura de alternativas como a produção sintética ou criação de bioreactores microbianos está actualmente em curso, de modo a evitar o esgotamento deste fármaco [Malik, *et al.* 2011]. Uma outra alternativa é aumentar a solubilidade deste fármaco, de modo a aumentar o seu índice terapêutico, minimizando também os efeitos secundários da sua formulação i.v. Inúmeros veículos formulados a partir de SLN, micelas poliméricas, liposomas, dendrímeros, etc. já se encontram em fase clínica, havendo inclusive um pequeno número de NP's que incorporam Ptx já comercializado. O Opaxio[®] (polímero conjugado a Ptx), o Abraxane[®] (nanopartículas de albumina com Ptx incorporado), o Lipusu[®] (liposomas de Ptx injectáveis) e o Genexol-PM[®] (micela polimérica de Ptx) são alguns dos transportadores existentes na clínica como alternativas vantajosas à clássica administração de Taxol[®] [Yoncheva, *et al.* 2012; Zhang, *et al.* 2010; Zhang, *et al.* 2013]. Estas possíveis alterações da farmacocinética do Ptx são importantes para ultrapassar o problema de solubilidade deste fármaco, tendo-se o exemplo de uma formulação micelar contendo Paclitaxel, que consegue aumentar a sua solubilidade de 1 µg/ml para 5 mg/ml, permitindo um rendimento de encapsulação maior [Wan, *et al.* 2013]. Aliado a esta vantagem, há ainda a possibilidade de conjugar as propriedades apoptóticas dos copolímeros e a capacidade de uma libertação controlada no espaço e no tempo, conferido por muitas NP's, de modo a ultrapassar o problema do MDR (aumentando o efeito terapêutico com menores doses), potenciando o efeito do Ptx, tendo em conta a sua dependência temporal [Soga, *et al.* 2005; Yoncheva, *et al.* 2012; Zhang, *et al.* 2013].

3. Objectivos

Os objectivos deste trabalho passaram por avaliar a citotoxicidade de formulações de nanopartículas lipídicas, já produzidas anteriormente pelo grupo da Prof^a Doutora Mafalda Videira, e comparar o seu efeito com novas formulações de micelas poliméricas e híbridos de nanopartículas contendo ambas as matrizes (polimérica e lipídica). Estas nanopartículas foram produzidas com Paclitaxel encapsulado e devidamente caracterizadas, pretendendo-se determinar a sua toxicidade perante macrófagos peritoneais de rato, a sua eficácia terapêutica *in vitro* numa linha celular de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231) e uma co-cultura de ambas as células. Por fim, iniciou-se o desenvolvimento de um modelo animal ectópico, tendo-se como objectivo final, mas preliminar, iniciar a avaliação da eficácia biológica destes novos sistemas alternativos de transporte de Paclitaxel para tratamento oncológico de cancro da mama.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Produção e Caracterização de diferentes formulações de nanopartículas

1.1 – SLN:

Este trabalho está integrado num projecto financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, intitulado “*siRNA incorporation in a lipid/micelle-based nanocarrier as a strategy to restore E-cadherin expression and eradicate advanced breast cancer metastatic phenotype*” (Projecto FCT: PTDC/SAU-FAR/120453/2010) e que foi realizado em parceria com o grupo da Prof^a Doutora Mafalda Videira, do iMed/Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

As SLN (1%) e SLN (1%), com Paclitaxel (25 µg/ml) encapsulado, foram produzidas por uma técnica de emulsificação/solidificação previamente descrito [Videira 2008] e foram gentilmente cedidas pelo grupo da Prof^a Doutora Mafalda Videira para realizar os ensaios de citotoxicidade.

1.2 – Micelas Poliméricas:

a. Preparação

100 mg de Pluronic[®] F68 (MM=8350 g/mol, Sigma-Aldrich, P1300) (Fig. 14) foram dissolvidos em 10 ml de clorofórmio [grau analítico, estabilizado com etanol (Sigma, CL0201)]. Esta preparação foi dividida para 8 balões de diluição de fundo redondo (cerca de 1 ml em cada) e selados com parafilme. Procedeu-se à vortexação durante cerca de 5 min para assegurar uma homogeneização correcta da solução. As nanopartículas foram produzidas por um método de evaporação de solvente, previamente descrito [Saxena, *et al.* 2012; Torchilin 2001], usando um rota vapor com uma bomba de vácuo a 78 kPa, agitação de 270 r.p.m., água do banho (80°C) e uma coluna de refrigeração a cerca de 8°C. O balão de diluição é correctamente encaixado no agitador e imerso na água do banho, durante cerca de 15-20 min. Após evaporação total do clorofórmio o fundo do balão torna-se baço, indicando precipitação e solidificação de um filme polimérico. Este

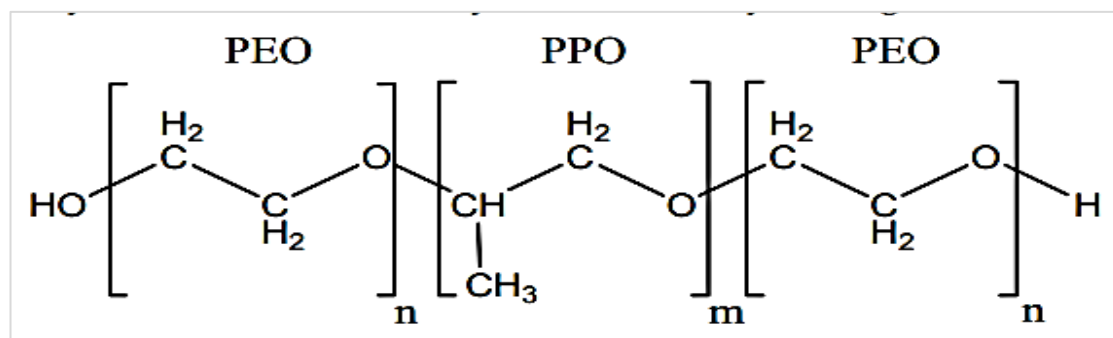


Figura 14. Estrutura química dos poloxâmeros. São constituídos por uma zona central hidrofóbica (PPO) e duas extremidades hidrofílicas (PEO). No caso do Pluronic[®] F68, n=75 unidades de PEO e m=30 unidades de PPO (adaptado de: Sezgin, *et al.* 2006).

filme foi posteriormente reidratado (para obter a solução micelar), com diferentes soluções, de modo a determinar a influência desta solução sobre o tamanho e carga das nanopartículas formadas. Aos respectivos balões de diluição adicionaram-se 2 ml de uma solução de PBS [*Phosphate Buffer Saline*, 137 mM de NaCl (Sigma, S7653, 10 mM de NaH₂PO₄ (Sigma, S5011) e 1,8 mM de KH₂PO₄ (Sigma, P0662)], Tween 80 (0,5%) [1,081 kg/l, Allied Signal, 61361), uma solução de SLN (1%) e uma solução de SLN (1%) às quais se adicionaram 40 µl (500 µg/ml) de Avastin[®] (25 mg/ml, gentilmente cedido pelo AIBILI, Coimbra), submetendo-se ao vórtex, durante 10 min para promover a formação das micelas. Esta fase é determinante em relação a algumas propriedades físicas das partículas, que poderão vir a influenciar a sua actividade biológica. Há indicação de que a temperatura, a agitação e o tempo envolvido na sua produção são factores envolvidos na alteração das suas características inerentes [Cho, *et al.* 2010]. No fim do procedimento, todas as soluções micelares apresentavam uma concentração final de 5 mg/ml.

b. Determinação do diâmetro médio e do potencial zeta

O diâmetro médio de nanopartículas é importante quer na avaliação da sua estabilidade, quer para determinar o seu comportamento ou adaptabilidade à via de administração utilizada. As características físico-químicas das várias formulações, com e sem fármaco encapsulado, foram determinadas e comparadas entre si.

De modo a efectuar uma caracterização total das partículas (determinação de d_m e do índice de polidispersão - IP), utilizou-se a espectrofotometria de correlação de fotões [*Photon Correlation Spectroscopy - PCS*; Autosizer Malvern Instruments IV (Reino Unido)] à temperatura de 25°C, tendo-se diluído as partículas em água desionizada (1:1). Esta técnica baseia-se na incidência de um *laser* de Hélio-Néon ($\lambda = 633$ nm), tendo uma polarização e ângulo de dispersão previamente estipulados (173°), sobre a amostra a estudar. Posteriormente, faz-se a detecção da intensidade de luz dispersa causada pelo movimento das partículas [Berne, *et al.* 1976]. Esta técnica, contrariamente à difracção *laser*, é uma boa ferramenta para avaliar nanopartículas, mas não partículas de maior tamanho, tendo um limite de detecção até cerca de 3 μm [Muller, *et al.* 2000].

A carga de superfície, traduzida pelo potencial *zeta*, é um parâmetro que reflecte a carga da partícula, que neste caso terá o contributo da matriz, do agente tensioactivo ou surfactante (usado na estabilização do sistema coloidal) e da sua interacção com o meio envolvente. A sua avaliação torna-se importante, de modo a prever a estabilidade da nanopartícula, sendo que, à partida, partículas com potenciais elevados terão uma menor tendência para agregar. No entanto, é necessário averiguar este valor e garantir que ele mantém a partícula em circulação e com uma chegada e internalização eficaz em termos de alvo biológico, como já foi mencionado anteriormente neste trabalho [Martins, *et al.* 2011]. Este parâmetro foi medido, após diluição das amostras em 1 ml de PBS (1:10) [*Phosphate Buffer Saline*, 137 mM de NaCl (Sigma, S7653), 10 mM de NaH_2PO_4 (Sigma, S5011) e 1.8 mM de KH_2PO_4 (Sigma, P0662)], usando um célula electroforética à qual se aplicou um campo eléctrico de 15,24 V/cm [Zetasizer Nano ZS, Malvern (Reino Unido)]. Escolheu-se o PBS como solução de leitura, pois o aparelho é bastante sensível a alterações de pH, sendo este tampão adequado para manter a coerência da experiência. Os resultados de cada experiência foram expressos em termos da média \pm SEM.

2. Ensaaios *in vitro*

Antes de passar para um modelo animal propriamente dito, é necessário proceder a uma avaliação *in vitro* da citotoxicidade do transportador/fármaco desenvolvidos. Desta forma, procedeu-se à avaliação da citotoxicidade do sistema escolhido perante macrófagos peritoneais de ratos e, ainda, para uma linha celular de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231). A citotoxicidade para linhas celulares teve como referência o fármaco Taxol® (forma comercial do Paclitaxel) (6 mg/ml, adquirido à Bristol-Myers Squibb Farmacêutica S.A, Portugal), amplamente estudado, por forma avaliar uma maior ou menor eficácia do transportador desenvolvido face a terapias já existentes. A viabilidade foi calculada tendo em conta poços controlo, sem qualquer tipo de tratamento. Procedeu-se ainda à avaliação da toxicidade das nanopartículas vazias, também perante ambos os tipos de células, tendo como referência o Avastin®, pois este foi o anticorpo de escolha para um possível direccionamento do transportador desenvolvido.

2.1 – Estudo de citotoxicidade para macrófagos peritoneais de rato

Sendo os macrófagos a primeira linha de defesa do sistema imunitário serão as células de primeiro contacto das nanopartículas, pelo que se torna necessário avaliar a toxicidade deste sistema para estas células. Os macrófagos são amplamente usados para testar novos sistemas terapêuticos e o seu isolamento a partir da cavidade abdominal é relativamente simples, obtendo-se um número razoável de células residentes (tipicamente entre $0,5-1 \times 10^6$ macrófagos/rato)

[Zhang, *et al.* 2008]. Para isto, é necessário isolar macrófagos peritoneais de rato, proceder à contagem de células que foram plaqueadas (de modo a aferir o volume de suspensão necessário aos restantes ensaios) e, por fim, avaliar a citotoxicidade do sistema terapêutico formulado.

a. Animais

Ratos machos adultos (\pm 400 g) da estirpe *Wistar* [produzidos por *Charles River* (Espanha)] foram mantidos em gaiolas numa sala com condições apropriadas [temperatura de 26°C e uma humidade relativa de 30%, tendo acesso livre a água e dieta (*ad libitum*)]. Os estudos foram realizados de acordo com a legislação europeia transposta para a legislação nacional sob a autorização da comissão de ética².

b. Isolamento e “cultura” de macrófagos peritoneais de rato

O procedimento usado baseia-se num protocolo já estabelecido na Unidade de Biofísica e Biomatemática da Faculdade de Medicina de Coimbra [Santos 2002], otimizado do método de Wier [Wier 1973]. O animal foi sacrificado por *overdose* anestésica via clorofórmio [grau HPLC (*High-performance Liquid Chromotography*) \geq 99.0% (Sigma, CL0201)] numa tina de vidro. De seguida, o rato foi esterilizado com etanol 75% (Merck, 107017) e colocado em decúbito dorsal, em condições estéreis, dentro da câmara de fluxo laminar, previamente esterilizada durante a noite com u.v. Com uma seringa de 10 ml e agulha de calibre 25G*5/8 [todas as seringas e agulhas foram adquiridas à BD PlasticK (Espanha) e à Terumo (Alemanha), respectivamente], injectaram-se 30 ml de tampão fosfato isotónico PBS 0,1 M [*Phosphate Buffer Saline*, 137 mM de NaCl (Sigma, S7653), 10 mM de NaH₂PO₄ (Sigma, S5011) e 1,8 mM de KH₂PO₄ (Sigma, P0662)] na zona abdominal do rato, com o bisel virado para cima, tendo o cuidado de não atingir nenhum órgão ou vaso sanguíneo. A zona abdominal foi massajada suavemente durante cerca de 1 min, seguindo-se a recolha de macrófagos residentes da zona inguinal com seringa de 1 ml e agulha 19G*1, para tubos Falcon estéreis de 15 ml (Corning pq, 430791), previamente identificados. Este processo foi repetido de forma a recuperar o maior volume possível de PBS injectado, tendo o cuidado de não perfurar vasos sanguíneos ou o intestino para não haver contaminação da suspensão. O volume recolhido foi registado e as suspensões colocadas em gelo picado. As amostras obtidas foram centrifugadas a 1 100 r.p.m, a 4°C, durante 10 min, sendo o sobrenadante obtido descartado dentro de outra câmara de fluxo laminar. O *pellet*, contendo a suspensão celular, foi ressuspenso em 1 ml de meio de cultura RPMI-1640 [*Roswell Park Memorial Institute* - 10,4 g/l, Aldrich, R6504), suplementado com Penicilina-Estreptomicina 1% (GIBCO, 15240), L-glutamina 1% (200 mM, GIBCO, 25030-081) e soro bovino fetal 10% (FBS – Sigma, F-7524), designado de agora em diante de meio RPMI-1640 completo.

Para determinar a viabilidade celular, utilizou-se o método de exclusão do corante Azul de Tripano ou *Tripán Blue dye Assay* [Coder 2001], que é um técnica simples de microscopia óptica, baseada no facto de células viáveis possuírem uma membrana intacta, excluindo o corante. Assim, esta técnica permite distinguir as células viáveis não-coradas das células não viáveis, coradas de azul. No entanto, no caso dos macrófagos, como são células com capacidade fagocitária foi necessário ter em atenção que todas as células, quer viáveis quer mortas coram de azul. A diferença é que as células mortas apresentavam uma membrana comprometida ou mesmo rebentada. Dentro da câmara de fluxo laminar, retiraram-se 10 μ l de cada amostra para *ependorfs* (microtube 1,5 ml, SARSTEDT, 72.690) estéreis, aos quais se adicionaram 10 μ l de Azul de Tripano (0,4%, Sigma-Aldrich), colocando-se cada amostra numa câmara de Neubauer (previamente limpa) para contagem por microscopia óptica de contraste de fase (Nikon, Eclipse TS 100). O número total de células viáveis foi calculado recorrendo à equação 1 [Fonseca, *et al.* 2002]:

² Directiva 2010/63/EU, SPCAL - http://www.spcal.pt/site/index.php?target=showContent&id=9&id_lingua=1&menu=15&id_pai=6

$$\text{Células Viáveis (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células viáveis}}{\text{N}^\circ \text{ total de células}} \times 100$$

Equação 1

Após a contagem, plaquearam-se cerca de 2 ml da suspensão celular em placas de 6 poços (SARSTEDT, 83.1839), devidamente identificadas, que foram mantidas numa incubadora [Binder, Shel lab CO2, 06-10960] a 37°C com uma humidade relativa de 95% e atmosfera de 5% de CO₂.

c. Avaliação da toxicidade de NP's vazias

O plaqueamento de macrófagos permitiu remover outros tipos de células, ou seja, possibilita a aderência destas células em oposição a glóbulos vermelhos/plaquetas que ficam em suspensão. Passadas 4 a 5 horas retirou-se todo o meio de cada poço, lavando-se com PBS para remover células/detrítos em suspensão. De seguida, procedeu-se à raspagem dos macrófagos, usando um raspador estéril (Corning inc., Costar[®], 353087) e recolheu-se a suspensão para um tubo falcon estéril de 15 ml (Corning pq, 430791). A suspensão foi centrifugada a 1 000 r.p.m, durante 10 min a 4°C para sedimentar os macrófagos. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 1 ml de RPMI 1640 completo, para proceder à contagem de células, pelo método descrito anteriormente. Deste modo, foi possível aferir o volume de suspensão necessário aos restantes ensaios que foram efectuados.

Cerca de 5×10⁴ células foram semeadas em placas de 96 poços (Corning inc., Costar[®], 3516), com meio RPMI-1640 completo e incubadas a 37°C com uma humidade relativa de 95% e atmosfera de 5% de CO₂. As células aderiram durante 4 h e foram incubadas com diferentes volumes/doses de nanopartículas vazias (2,5; 6,25; 12,5; 25 e 50 µl) e Avastin[®]-Beva (1,25; 3,13; 6,25; 12,5 e 25 µg/ml), durante 24 e 48 h. É de notar que os macrófagos são células que não proliferam *in vitro*, sendo importante mudar o seu meio com frequência, de modo a evitar morte celular acentuada. Desta forma, mudou-se o meio dos poços controlo (sem tratamento), para manter a reprodutibilidade dos diferentes tempos de incubação, em termos de cálculo de viabilidade celular. Para determinar a viabilidade celular, utilizou-se um método colorimétrico (MTT) desenvolvido por Mosmann em 1983 [Mosmann 1983]. Este composto é um sal de tetrazólio (de cor amarela e solúvel em água), que é convertido em cristais de formazan (insolúveis e de cor púrpura) por células metabolicamente activas, graças à acção da enzima mitocondrial succinato desidrogenase (Fig. 15).

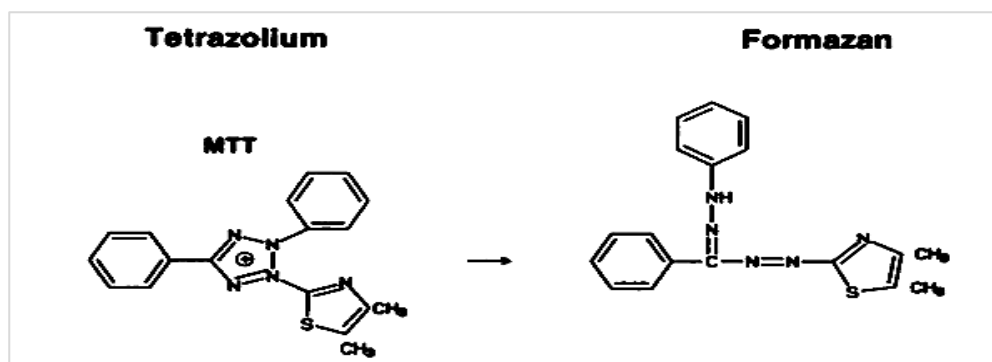


Figura 15. Conversão do sal de tetrazólio em cristais de formazan (adaptado de Scudiero, *et al.*, 1988).

Os cristais são posteriormente solubilizados por adição de um solvente orgânico e a absorvância (570 nm) da solução contida nos poços é avaliada e convertida em percentagem de células viáveis [Scudiero, *et al.* 1988]. Nos intervalos de tempo designados, aspirou-se o conteúdo dos poços e adicionaram-se 135 µl de meio novo e 15 µl de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) [5 mg/ml em PBS estéril, (Sigma – Aldrich, M 2128) e incubou-se durante 3 horas nas condições já referidas. Por fim, voltou-se aspirar o

conteúdo dos poços e adicionaram-se 150 µl de uma solução de isopropanol ácido [HCl - ácido clorídrico 37% fumante (Sigma, 258148) em isopropanol (Sigma, 278475)], de modo a provocar a ruptura membranar para a libertação e solubilização dos cristais. A leitura da absorvância foi efectuada por um espectrofotómetro microElisa SLT [SLT spectra lab-instruments, ref:F039002, Áustria] a 570 nm com uma absorvância de referência de 620 nm [Fonseca, *et al.* 2002; Santos, *et al.* 2008]. A percentagem de viabilidade/sobrevivência celular foi expressa tendo como referência as células controlo (Equação 2) [Fonseca, *et al.* 2002]:

$$\text{Viabilidade Celular (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{células teste}}}{\text{Abs}_{\text{células controlo}}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Os resultados de cada experiência foram expressos em termos da média ± SEM, tendo-se realizado duplicados para cada experiência independente (n=2).

2.2 – Efeito citotóxico frente a linhas celulares tumorais

Tendo-se avaliado a toxicidade do material que constitui o transportador, torna-se necessário ver o efeito dessas mesmas amostras de nanopartículas com e sem o fármaco encapsulado, em relação a linhas celulares hiperproliferativas que, apesar de não mimetizarem correctamente o ambiente biológico, são essenciais para uma previsão do efeito terapêutico do agente anticancerígeno a ser desenvolvido.

a. Linha celular tumoral (MDA-MB-231)

Apesar de existirem inúmeros modelos de linhas tumorais hiperproliferativas para o estudo de tumores humanos, a variante MDA-MB-231 foi a escolhida para este trabalho. Esta linha foi previamente adquirida à ATCC [Manassas, VA (cat# HTB-26)] e um tubo destas células criopreservadas foi gentilmente oferecido pelo grupo da Prof^a Doutora Mafalda Videira. Estas células são do tipo epitelial, derivadas de uma efusão pleural de adenocarcinoma de mama metastático, estabelecido pela primeira vez em 1973, de uma mulher caucasiana de 51 anos que havia sofrido uma mastectomia lateral radical [Cailleau, *et al.* 1974]. Têm uma forma de p53 mutante e são consideradas triplamente negativas, pois não expressam receptores de estrogénio, progesterona nem HER2 (receptor para factor de crescimento hormonal epidérmico), sendo portanto independentes de qualquer estimulação hormonal [Cailleau, *et al.* 1978; Iorns, *et al.* 2012; Pozo-Guisado, *et al.* 2002]. Comparativamente a outras linhas celulares de mama, esta é particularmente tumorigénica, formando adenocarcinomas pouco diferenciados de grau III em ratinhos *nude*, havendo evidências de que a sua tumorigenicidade pode derivar de uma expressão particular de metaloproteinases (que lhes confere uma elevada capacidade de invasão), sendo o local preferencial de alojamento pós-metastização o pulmão [Tester, *et al.* 2004]. Em termos morfológicos estas células do tipo aderente podem apresentar-se com uma forma esférica, granular e fusiforme, formando mesmo aglomerados celulares (Fig. 16) [Cailleau, *et al.* 1974].

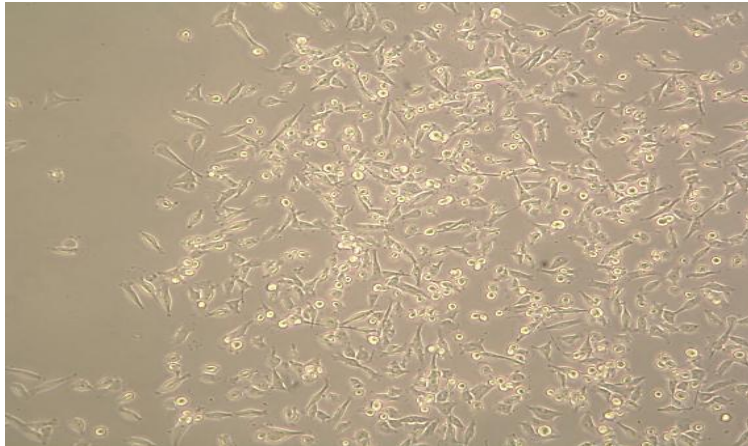


Figura 16. Imagem de células MDA-MB-231, numa zona de confluência, obtida por microscopia óptica de contraste de fase (ampliação 200 ×) (Nikon eclipse TS 100, 251051, Japão)

b. Manutenção e cultura celular

A linha celular epitelial humana MDA-MB-231 foi propagada de acordo com o protocolo de rotina e cultivada em condições estéreis em frascos de 75 cm² (SARSTEDT, 831811) em meio RPMI-1640 completo + MEM [*Non-essential Amino Acid Solution* (Sigma-Aldrich, M7145) e incubadas a 37°C com uma humidade relativa de 95% e atmosfera de 5% de CO₂. A sua manutenção (remoção do meio consumido e adição de meio novo, previamente suplementado) foi realizada de 2/3 vezes por semana, sendo a sua passagem (após confluência de cerca de 70/80%) efectuada após adição de 3 ml de tripsina-EDTA a 0,25% (Gibco, 25200). As células foram colocadas na incubadora, durante cerca de 5 min (pois a temperatura óptima de actuação da tripsina é 37°C), acelerando-se a reacção enzimática que permite desagregar as células e observou-se ao microscópio óptico de contraste de fase. Quando as células se encontravam em suspensão, adicionaram-se cerca de 3 ml de meio RPMI-1640 novo, para inibir a acção da enzima e recolheu-se a suspensão para um tubo falcon de 15 ml (Corning pq, 430791), centrifugando-se a 1 100 r.p.m, durante 10 min a 4°C, para sedimentar o *pellet* celular sem tripsina ou contaminantes. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 5 ml de meio de cultura RPMI-1640 completo + MEM, colocando-se a suspensão num novo frasco de cultura de 75 cm³.

c. Avaliação do efeito citotóxico de NP's vazias e NP's-Ptx

Cerca de 2×10⁴ células (cujá viabilidade mínima deverá ser de 90%) foram semeadas em placas de 96 poços (Corning inc, Costar[®], 3516) em meio RPMI-1640 completo e incubadas a 37°C com uma humidade relativa de 95% e atmosfera de 5% de CO₂. As células aderiram durante 24 h e foram incubadas com diferentes concentrações de nanopartículas com Paclitaxel (Ptx) encapsulado (0,42; 1,04; 2,08; 4,17 e 8,33 µg/ml) e Taxol[®] (1,25; 3,13; 6,25; 12,5 e 25 µg/ml) durante 4, 8, 24, 48 e 72 h. Tal como para os macrófagos, também se avaliou o efeito das nanopartículas vazias, usando as correspondentes doses em termos de volume (2,5; 6,25; 12,5; 25 e 50 µl) e Avastin[®]- Beva (1,25; 3,13; 6,25; 12,5 e 25 µg/ml), durante 24, 48 e 72h. Após o período de incubação, os poços foram aspirados e lavados com PBS, para remover as células não-aderentes e a solução farmacológica, e adicionaram-se 135 µl de novo meio RPMI-1640 completo + MEM [*Non-essential Amino Acid Solution* (Sigma-Aldrich, M7145) e 15 µl de reagente para efectuar o teste de MTT, durante 3 h a 37°C. De seguida, os poços foram novamente aspirados e adicionaram-se 150 µl de uma solução de isopropanol ácido para disromper a membrana e dissolver os cristais de formazan. A absorvância desta solução foi medida por um espectrofotómetro microElisa SLT [SLT spectra lab-instruments, ref:F039002, (Áustria)] a 570 nm, tendo como referência 620 nm e, mais uma vez, a percentagem de viabilidade celular foi expressa em termos de células controlo.

2.2.1 – Estudos de Internalização de nanopartículas para a linha celular tumoral

a. Avaliação da internalização de NP's por Microscopia Confocal

Para monitorizar a internalização das NP's, incubadas com uma linha celular tumoral, utilizaram-se protocolos modificados da literatura [Mandal, *et al.* 2009; Yan, *et al.* 2010]. As formulações de SLN (1%) e SLN-PEG (1%) foram marcadas com a sonda lipofílica DiL (dialcilcarbocianina). Estas partículas foram novamente produzidas por um método de emulsificação/solidificação, já mencionado e gentilmente oferecidas pelo grupo da Prof^a Doutora Mafalda Videira do iMed, Lisboa.

Plaquearam-se 2×10^4 células MDA-MB-231 em lâminas de vidro, previamente colocadas em caixas de 12 poços (Corning inc. Costar[®] 3336) com 300 μ l de meio RPMI-1640 completo + MEM [*Non-essential Amino Acid Solution* (Sigma-Aldrich, M7145)]. As células aderiram durante 24 h e foram posteriormente incubadas com 50 μ l de SLN-DiL, SLN-PEG-DiL, SLN-Ptx-DiL e SLN-Ptx-PEG-DiL a 37°C durante 0, 30, 60 e 120 min. Mais uma vez, usaram-se como poços controlo células MDA-MB-231 sem qualquer tipo de tratamento.

Após os intervalos de tempo referidos, o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados com 1 ml de PBS frio [137 mM de NaCl (Sigma, S7653), 10 mM de NaH₂PO₄ (Sigma, S5011) e 1,8 mM de KH₂PO₄ (Sigma, P0662)], para retirar marcação não-específica ou sondas que não foram internalizadas. As células foram, posteriormente, fixadas com 1 ml/poço de uma solução fria de metanol/acetona (1:1) (Sigma-Aldrich, 32213 e 34850, respectivamente) durante 10 min à temperatura ambiente e novamente lavadas com 1 ml de PBS frio. De modo a diferenciar estruturas celulares para determinar a localização de nanopartículas internalizadas, as células foram marcadas com 800 μ l (5 μ g/ml) de Hoechst 33258 [2- [2-(4-hidroxifenil)-6-benzimidazolil]-6- (1-metil-4-piperazil)-benzimidazole] (Fig. 17) (Invitrogen, H3569), 10 mg/ml) em solução aquosa, durante 5 min à temperatura ambiente no escuro (cobriram-se as caixas com papel de alumínio). Esta sonda está bem descrita e é amplamente usada em estudos bioquímicos, sendo a sua principal função a marcação de núcleos celulares. Estudos de caracterização e cristalografia indicaram que esta sonda se liga aos cromosomas, especificamente aos pares de adenina e timina do sulco menor da dupla hélice de ADN [Saito, *et al.* 2004].

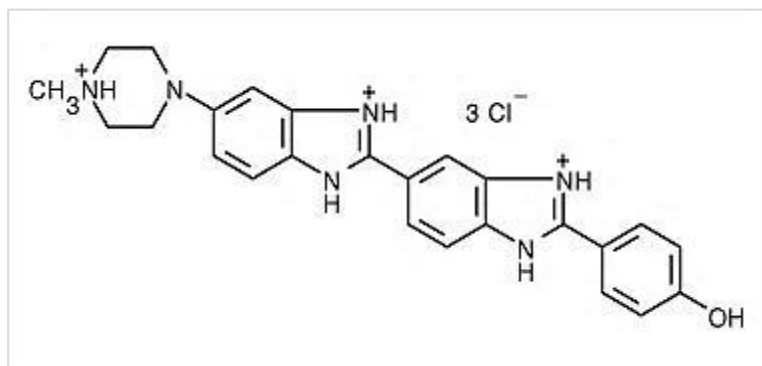


Figura 17. Estrutura química do corante nuclear Hoescht 33258 (retirado de Saito, *et al.* 2004).

Após a marcação, as células foram, novamente, lavadas com PBS frio, de modo a retirar o excesso de marcação/sonda e procedeu-se à lavagem das lamelas de vidro, para observação ao microscópio confocal. Com o auxílio de uma pinça, retirou-se cada lamela com suspensão celular marcada, colocando a face com células aderentes virada para baixo sobre a lâmina de vidro e montadas/seladas com DPX para preparações histológicas (Sigma-Aldrich, 44581). Por fim, observaram-se as lâminas usando um microscópio confocal (Zeiss LSM 710) e as imagens foram processadas usando o *software* Carl Zeiss (ZEN, *Blue Edition*). As nanopartículas marcadas com DiL apresentavam fluorescência de cor vermelha e os núcleos celulares, marcados com Hoechst, cor azul. Os espectros de excitação/emissão do DiL e do Hoechst foram 549/565 e 591/618, respectivamente. Todas as experiências foram realizadas em duplicado, tendo o respectivo controlo (marcados somente no núcleo) para os diferentes intervalos de incubação designados (n=2).

É de notar que as lâminas podem ser guardadas a 4°C, a fluorescência é muito forte, mas deve ser conservada no frio e no escuro.

b. Estudo quantitativo da internalização celular de nanopartículas

Para quantificar a eficiência de internalização das NP's adaptou-se um protocolo descrito anteriormente [Yan, *et al.* 2010]. Plaquearam-se 2×10^4 células MDA-MB-231 em 300 μ l de meio RPMI-1640 completo + MEM, numa caixa de 96 de fundo preto (Corning inc, Costar[®], 3842). As células aderiram durante 24 h e foram incubadas com 50 μ l de SLN-DiL, SLN-Ptx-DiL, SLN-PEG-DiL e SLN-PEG-Ptx-DiL, durante 2 h e com 100 μ l das respectivas formulações durante 2 e 4 h. No final dos tempos de incubação, o meio foi removido e os poços foram lavados três vezes com 50 μ l de PBS frio, adicionando-se, posteriormente, 50 μ l de Triton X-100 (0,5%) (Merck, 108643) em 0,2 N de NaOH (Merck, 109137) para lisar a membrana das células. A fluorescência foi medida usando um leitor de placas (*Synergy HT*, Biotek[®]) com uma excitação de 530/20 nm e uma emissão de 590/30 nm. Todas as experiências foram realizadas em triplicado (n=3), tendo-se como referência, para o cálculo da eficiência de internalização, os poços controlo (células sem qualquer tipo de tratamento ou marcação).

c. Avaliação da percentagem de apoptose

A apoptose é definida como a morte celular programada que é importante para a manutenção da homeostasia celular. É caracterizada por alterações morfológicas específicas como a assimetria membranar (provocada pela translocação e exposição da fosfatidiliserina (PS) no folheto externo da membrana plasmática), condensação do núcleo e citoplasma e clivagem internuclear do ADN. É um processo regulado, que pode ser sinalizado por factores externos, que envolve a activação de proteínas específicas (caspases) ou por um mecanismo interno, iniciado pela libertação de factores pro-apoptóticos pela mitocôndria. Já a necrose é definida por uma morte celular pronunciada, caracterizada por danos extremos da membrana com disrupção dos organitos intracelulares e do material genético. Muitos fármacos anticancerígenos têm a capacidade de induzir morte celular por um mecanismo de apoptose ou por disrupção do ciclo celular [Span, *et al.* 2002; Yuan, *et al.* 2010].

De modo avaliar a percentagem de apoptose das células MDA-MB-231, após tratamentos específicos com formulações de NP's, procedeu-se ao ensaio da dupla marcação celular com anexina V/iodeto de propídeo (PI) [Biosciences 2011]. Cerca de 5×10^5 células MDA-MB-231 foram incubadas em frascos de 25 cm³ SARSTEDT, 83.1810) com 5 ml de meio RPMI-1640 completo + MEM e incubadas a 37°C com uma humidade relativa de 95% e atmosfera de 5% de CO₂. As células aderiram durante 24 h e foram incubadas com os respectivos valores de IC50 para SLN-Ptx (3,8 μ g/ml) e SLN-Ptx-PEG (0,3 μ g/ml), durante 24 h. Recolheu-se o sobrenadante para diferentes falcons de 15 ml e as células foram lavadas com 3 ml de PBS. Posteriormente, adicionaram-se 2 ml de tripsina-EDTA a 0,25% (Gibco, 25200), para quebrar a aderência celular e as suspensões foram recolhidas para tubos falcon contendo os respectivos sobrenadantes. A suspensão foi centrifugada a 2 000 r.p.m, durante 5 min a 4°C (para depositar células viáveis e não-viáveis), o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 2 ml de PBS. Procedeu-se a uma nova centrifugação a 2 500 r.p.m, durante 5 min a 4°C e adicionaram-se 100 μ l de tampão de ligação [*Annexin Binding buffer* 10 \times , suplementado com 2,5 mM de CaCl₂, (BD Biosciences, 131109). De seguida, adicionaram-se 2,5 μ l de AnexinaV em APC (1,0 ml; BD Biosciences, 550475) e 2 μ l de PI (2 ml, BD Biosciences, 131109) e homogeneizou-se a solução num vórtex. As células foram diluídas em 400 μ l de tampão de ligação e a solução foi mantida no escuro, à temperatura ambiente, durante 15 min para garantir a marcação, sem se perder a fluorescência. As amostras foram posteriormente quantificadas por citometria de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson).

2.3 – Co-cultura

De modo a estabelecer um microambiente *in vitro* que se aproxime ao ambiente biológico, iniciaram-se estudos preliminares de citotoxicidade frente a uma co-cultura de macrófagos e células MDA-MB-231. No início deste trabalho, mencionou-se a elevada infiltração de macrófagos em tumores da mama e pulmão, sendo que estes podem não só ter um duplo papel na morte ou proliferação do tumor, mas também influenciar o efeito terapêutico de nanopartículas colocadas no microambiente tumoral. Sendo assim, testaram-se as condições mais favoráveis para a cultura celular destas células em conjunto e realizaram-se alguns estudos iniciais de citotoxicidade, bem como da possível influência de macrófagos na viabilidade de células tumorais, na ausência e presença de NP's.

a. Estudo de condições de plaqueamento e manutenção celular

Segundo a literatura há uma proporção de cerca de 10 macrófagos por cada célula tumoral, no entanto, para garantir um número suficiente de células foram plaqueados cerca de 5×10^4 /ml macrófagos isolados da zona peritoneal de rato, pelo protocolo descrito anteriormente, e cerca de $1,3 \times 10^4$ /ml células MDA-MB-231, num total de 2 ml em caixas de 6 poços (SARSTEDT, 83.1839). De modo a testar quais as melhores condições de manutenção celular da experiência, decidiu-se variar o meio de cultura celular, bem como o modo como as células seriam colocadas em cultura. Numa caixa de 6 poços, colocou-se uma suspensão contendo $1,3 \times 10^4$ /2 ml de células MDA-MB-231, uma suspensão contendo uma mistura de macrófagos e células (nas concentrações referidas acima) e uma suspensão contendo somente 5×10^4 /2 ml de macrófagos, respectivamente nos poços 1, 2 e 3, usando meio RPMI-1640 completo + MEM. Na 2ª fila, procedeu-se exactamente a uma cultura de células equivalente à descrita acima, nos poços 6, 7 e 8, respectivamente, foi somente efectuada a cultura em meio HAM F10 [*HAM F10 Nutrient Mix* (Invitrogen, 11550-043), com HEPES e vermelho de fenol (500 ml), suplementado com 10% FBS. É de notar que os poços contendo somente a suspensão celular MDA-MB-231 ou somente macrófagos foram incubados durante 24 h e 4 h (respectivamente), a 37°C com uma humidade relativa de 95% e atmosfera de 5% de CO₂, para garantir a adesão celular. Após este período, adicionou-se a suspensão contendo 5×10^4 /ml de macrófagos aos poços 1 e 4 ou a suspensão contendo $1,3 \times 10^4$ /ml de células tumorais, aos poços 3 e 6. No caso da suspensão mista, esta foi preparada em simultâneo, tendo sido incubada durante 24 h, nos poços 2 e 5. Estas condições encontram-se resumidas na Fig. 18.

Por fim, 24 h após incubação de todas as condições, removeu-se o meio de cultura de cada poço e as células foram lavadas com 2 ml de PBS, para remover células não-aderentes. Adicionaram-se 900 µl de meio novo, RPMI-1640 completo e F10, consoante os poços, e 100 µl de MTT, incubando-se durante 3 h a 37°C. Removeu-se novamente o meio e adicionou-se 1 ml de isopropanol ácido para dissolver os cristais de formazan e a absorvância foi medida usando um leitor de placas (Biotek® *Synergy HT*) a 570 nm com referência de 620 nm.

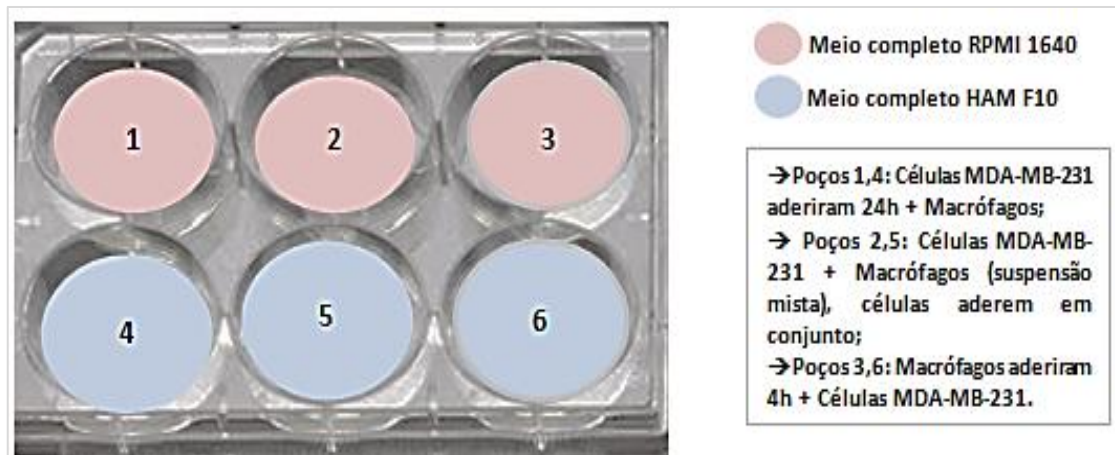


Figura 18. Esquema representativo da experiência de co-cultura. As células MDA-MB-231 e macrófagos, foram semeadas em dois meios de cultura diferentes: meio RPMI 1640 completo (evidenciado pela cor rosa) e meio HAM F10 (evidenciado pela cor azul). Três condições diferentes foram testadas, de modo a otimizar o processo de plaqueamento da co-cultura: células tumorais que aderiram durante 24 h ao qual se adicionou, posteriormente a suspensão de macrófagos; macrófagos que aderiram durante 4 h ao qual se adicionou, posteriormente a suspensão celular; e uma suspensão mista em que ambas as células aderiram em conjunto.

b. Avaliação do efeito citotóxico de NP's-Ptx

Tendo-se averiguado as melhores condições de cultura celular, procedeu-se à avaliação da citotoxicidade das formulações SLN-Ptx e SLN-Ptx-PEG, comparativamente ao fármaco livre Taxol[®]. Cerca de $1,3 \times 10^4$ células MDA-MB-231, 5×10^4 macrófagos e uma suspensão mista, foram plaqueadas em caixas de 48 poços (Corning inc., Costar[®], 3548) em 2 ml de meio RPMI 1640 completo + MEM. As células foram incubadas durante 24 h, a 37°C com uma humidade relativa de 95% e atmosfera de 5% de CO₂, para garantir a adesão celular. De seguida, removeu-se o meio e as células foram incubadas com SLN-Ptx, SLN-Ptx-PEG (4,17 e 8,33 µg/ml) e Taxol[®] (12,5 e 25 µg/ml), num volume final de 250 µl de meio RPMI-1640 completo + MEM, durante 24 e 48 h. No final dos respectivos períodos de tratamento, removeu-se o meio de cada poço e adicionaram-se 225 µl de meio de cultura novo e 25 µl de MTT e incubou-se durante 3 h a 37°C. Por fim, adicionaram-se 250 µl de isopropanol ácido (Sigma, 278475) e mediu-se a absorvância de cada poço usando um espectrofotómetro microElisa SLT [SLT Spectra lab-instruments, F039002 (Áustria)] a 570 nm, tendo como referência 620 nm.

Todas as experiências foram realizadas em triplicado (n=3) e a percentagem de viabilidade celular foi expressa em termos de média ± SEM, tendo em conta as células controlo MDA-MB-231, macrófagos ou co-cultura, sem qualquer tipo de tratamento e plaqueados em poços independentes.

2.4 – Estudos *in vivo*

De modo a completar os estudos anteriores e permitir uma maior fiabilidade e reprodutibilidade do efeito terapêutico das várias formulações testadas, procedeu-se a um estudo preliminar num modelo animal. Tal permitiu ajustar as melhores condições para testar, posteriormente, a eficácia terapêutica *in vivo* das NP's que mostraram melhores resultados nos estudos em linhas celulares, descritos anteriormente.

O trabalho realizado no âmbito deste projecto vem completar um estudo realizado com SLN's para terapêutica de uma neoplasia associada a células não-pequenas do pulmão, sendo este altamente infiltrado por metastizações provenientes da mama [Videira 2008]. Tendo isto em conta, torna-se necessário testar o efeito terapêutico destas partículas perante um adenocarcinoma sólido de mama e, ainda, micrometástases com esta origem. Assim, procedeu-se a um ensaio *in vivo* de modo a prever qual o melhor protocolo para a produção de metástases e de um tumor sólido para um teste preliminar da eficácia terapêutica destes novos sistemas.

a. Animais

6 ratinhos Balb/C nu/nu, fêmea (6-8 semanas de idade, $\approx 19/20$ g) e 6 ratinhos Balb/C, fêmea (6-8 semanas, ≈ 22 g) [produzidos por Charles River (Espanha)] foram mantidos em gaiolas e condições estéreis específicas, tendo acesso livre a água e dieta (*ad libitum*), a uma temperatura de 26°C e uma humidade relativa de 30. Os estudos foram realizados de acordo com a legislação europeia transposta para a legislação nacional, sob a autorização da comissão de ética³.

b. Preparação das células tumorais para injeção

A linha celular MDA-MB-231 foi cultivada em frascos de 75 cm² (SARSTEDT, 831811) em meio RPMI-1640 completo + MEM e incubadas a 37°C com uma humidade relativa de 95% e atmosfera de 5% de CO₂. Quando as células atingiram um estado de confluência de 70%, descartou-se o meio contendo células mortas em suspensão e adicionaram-se cerca de 3 ml de tripsina-EDTA a 0,25% (Gibco, 25200). As células foram colocadas na incubadora, durante 5 min e observaram-se ao microscópio óptico de contraste de fase para garantir que todas as células se encontravam em suspensão. Para inibir o efeito da enzima, adicionaram-se cerca de 3 ml de meio RPMI-1640 novo e a suspensão foi recolhida para um tubo falcon de 15 ml (Corning pq, 430791), centrifugando-se a 1 100 r.p.m, durante 10 min a 4°C, para sedimentar o *pellet* celular sem tripsina ou contaminantes. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 1 ml de meio novo. Retiraram-se 10 μ l de amostra para um *ependorf* e adicionaram-se 10 μ l de *Trypan Blue*, para proceder à contagem das células num hemocitómetro, descrito previamente.

Preparam-se 6 injeções com cerca de $3,2 \times 10^6$ células MDA-MB-231, que foram ressuspendidas em 0,3 ml de PBS, para inoculação dos ratinhos Balb/C nu/nu; e mais 6 injeções com cerca de 5×10^6 células MDA-MB231, que foram novamente ressuspendidas em 0,3 ml de PBS, para inoculação dos ratinhos Balb/C. Todas as inoculações/injeções foram usadas dentro de uma hora após a sua preparação.

c. Desenvolvimento de um modelo animal ectópico e monitorização tumoral

12 ratinhas da estirpe Balb/C (entre eles 6 fêmeas atímicas) foram anestesiadas na veia da cauda, usando uma injeção com uma mistura 3:1 de Cetamina injectável (Ketalar[®] 50 mg/ml, Pfizer, 8278907) e Clorpromazina i.m. (intramuscular) [Largactil[®] 0,5% (25 mg), Laboratórios Vitória, 44)], para promover a anestesia e o relaxamento muscular do animal. As injeções de 0,3 ml de células MDA-MB-231 (cerca de $3,2 \times 10^6$ para os ratinhos atímicos e 5×10^6 células para os ratinhos timo-competentes) foram inoculadas subcutaneamente no flanco/coxa direito de cada ratinho, usando uma seringa de 1 ml com uma agulha de calibre 25G*5/8.

Todos os animais foram monitorizados para o desenvolvimento tumoral, tendo-se efectuado palpação directa na zona da inoculação. Os animais foram pesados cerca de duas/três vezes por semana, tendo-se mais 4 ratinhos aos quais não se injectaram células tumorais que foram usados como controlo de peso. O volume tumoral foi medido, usando uma craveira digital, considerando-se duas medidas tumorais diferentes (horizontal e vertical) e o volume foi calculado usando a fórmula $V=ab^2/2$, em que a=medida do diâmetro maior e b=medida do diâmetro mais curto [Abbasalipourkibir, *et al.* 2010]. Aos animais, que entretanto sucumbiram ao desenvolvimento tumoral ou que foram eventualmente sacrificados no final da experiência, retiraram-se os tumores para avaliação histológica.

³ Directiva 2010/63/EU, SPCAL - http://www.spcal.pt/site/index.php?target=showContent&id=9&id_lingua=1&menu=15&id_pai=6

2.5 – Análise estatística

Os resultados foram apresentados em termos de média \pm SEM. A análise estatística foi realizada usando o teste *One-way ANOVA*, complementado com o teste de comparação múltipla de *Tukey* para a avaliação significativa dos valores de IC50, calculados usando uma regressão não-linear (*GraphPad Prism 5.0 Software*). Em termos de comparação de grupos e das diferentes formulações, e da avaliação da variância ou possível interação entre as diferentes doses e tempos de incubação, recorreu-se ao teste *Two-way ANOVA* com um pós-teste de Bonferroni. (*GraphPad Prism 5.0 Software*).

RESULTADOS

1. Produção e caracterização das NP's formuladas

De modo a perceber-se a actividade biológica e a estabilidade de um novo transportador farmacológico é necessário proceder à sua caracterização físico-química. As micelas poliméricas foram preparadas por uma simples técnica de evaporação de clorofórmio, seguida da reidratação do filme polimérico com diferentes soluções. Tanto o processo de evaporação, temperatura de banho e tempo de evaporação influenciam a formação do filme polimérico, como as características da solução de hidratação e a homogeneização da solução final. As soluções finais contendo o Poloxamer 68 apresentavam algumas diferenças interessantes, apesar de todas terem sido produzidas sob as mesmas condições de temperatura, volume de clorofórmio e homogeneização durante a formação do filme micelar. Os filmes foram reidratados com PBS, uma solução tampão (apresentando um aspecto transparente e límpido) e com um surfactante não-iónico: o Tween 80 (0,5%) que, apesar da presença de alguma espuma durante o processo de vortexação (devido à presença do detergente), apresentava um aspecto macroscópico semelhante à solução contendo PBS. Por outro lado, após a reidratação com uma solução previamente preparada de NP's de lípidos sólidos contendo o anticorpo Bevacizumab, observou-se uma certa turbidez associada à solução (Fig.19).



Figura 15. Aspecto final das formulações de nanopartículas produzidas pelo método da evaporação do solvente. O aspecto final das preparações é função quer da natureza do material utilizado na produção da matriz polimérica, quer da solução de hidratação utilizada. Na imagem é possível observar, da esquerda para a direita, formulações reidratadas com uma solução de SLN-Beva, Tween (0,5%) e PBS (pH 7,4). A solução contendo SLN-Beva apresentava turbidez, sendo as restantes translúcidas.

Estas soluções foram posteriormente caracterizadas em termos de diâmetro médio e carga de superfície, usando as técnicas de espectroscopia de correlação de fotões e de medição da condutividade eléctrica. As formulações apresentaram diferenças significativas em termos de tamanho, quando comparadas as formulações de SLN-Polox 68, com e sem Beva, relativamente às micelas simples de Polox 68 ($p < 0,05$). As formulações de NP's produzidas a partir de um híbrido lípido/polímero apresentaram um tamanho médio relativo de cerca de 100 nm [SLN-Polox 68 ($114,57 \pm 0,86$ nm) e SLN-Polox 68-Beva ($112,67 \pm 4,66$ nm)]. Os índices de polidispersão obtidos foram muito semelhantes para ambas as formulações (cerca de 0,24%), indicando a produção de populações homogéneas estáveis, ao invés de aglomerados de partículas. Ambas as formulações foram reidratadas com Tween 80 (0,5%). Relativamente às micelas poliméricas anfifílicas simples, produzidas a partir do Pluronic F68, foi possível concluir que o dm obtido apresentava valores semelhantes, quer a hidratação tenha sido com o surfactante não-iónico ($253,65 \pm 9,95$ nm) ou com o tampão fosfato ($230,75 \pm 3,15$ nm). O índice de polidispersão foi diferente para as condições de hidratação mencionadas, mas este não se apresentou significativo entre as micelas poliméricas simples. Todavia, este valor de dispersão foi significativamente diferente, principalmente para a solução de PBS, relativamente às formulações contendo matriz lipídica ($IP=0,789 \pm 0,106$ %, $p < 0,05$), indicando uma

Resultados

tendência para a formação de populações heterogêneas. A confirmar este resultado, os gráficos obtidos após reidratação com PBS indicavam a formação de partículas de grande dimensão e altamente dispersas na solução, com tendência para a formação de aglomerados micelares (dados não apresentados). A reidratação com Tween 80 permitiu uma maior estabilização da micela, apresentando um índice relativamente mais baixo ($0,436 \pm 0,026\%$), comparativamente à solução anterior. Quanto à carga de superfície, avaliada pelo valor do potencial *zeta*, não variou de forma significativa entre as diversas formulações, tendo um valor médio de $-5,36$ mV. Os valores relativos às dimensões, índice de polidispersão e potencial *zeta* das diversas soluções produzidas encontram-se resumidos no Tabela 2.

As SLN simples e/ou pegiladas já se encontravam caracterizadas e apresentavam um dm, IP e potencial *zeta* semelhantes ao SLN-Polox 68 e SLN-Polox-Beva.

Tabela 2. Caracterização físico-química das partículas produzidas. Valores do diâmetro médio (dm), índice de polidispersão (IP), e do potencial *zeta* (ξ) das diferentes formulações de micelas poliméricas e NP's de lípido/polímero. Os valores foram obtidos por PCS (dm) e após medição da condutividade electroforética (ξ), a 25°C, tendo-se avaliado diferentes soluções de hidratação. Os valores representam a média \pm SEM, n=3, *One-way ANOVA*. *p <0,05, comparativamente a SLN-Polox 68 e SLN-Polox 68-Beva; ###p <0,001, comparativamente a SLN-Polox 68, SLN-Polox 68-Beva e Polox 68 (Tween 0.5%).

| Formulação | dm (nm) | IP (%) | ξ (mV) |
|------------------------|---------------------|-------------------------|------------------|
| SLN-Polox 68 | $114,57 \pm 0,86$ | $0,237 \pm 0,005$ | $-2,31 \pm 0,09$ |
| SLN-Polox 68 -Beva | $112,67 \pm 4,66$ | $0,249 \pm 0,003$ | $-4,33 \pm 0,17$ |
| Polox 68 (Tween 0.5%) | $253,65 \pm 9,95$ | $0,436 \pm 0,026$ | $-5,63 \pm 0,12$ |
| Polox 68 (PBS, pH 7.4) | $230,75 \pm 3,15^*$ | $0,789 \pm 0,106^{###}$ | $-9,09 \pm 0,48$ |

2. Avaliação da toxicidade das NP's para macrófagos peritoneais de rato

As propriedades físico-químicas inerentes a novas formulações são importante para modular a sua actividade biológica, no entanto, uma das características associadas a um transportador farmacológico eficaz é a sua não-toxicidade para as células ditas normais ou não-tumorais, ou seja, a sua biocompatibilidade. Esta propriedade é conferida pelos materiais ou moléculas constituintes da matriz interna e externa das nanopartículas e já existem diversos polímeros e lípidos aprovados para tal utilização, sendo os triacilgliceróis usados na produção de SLN, o PEG e os poloxâmeros exemplos desses materiais.

Os macrófagos são a primeira linha de defesa contactada por qualquer solução injectável, sendo estas células boas indicadoras de toxicidade primária ou sistémica de novas partículas. Estas células foram incubadas com as várias formulações de NP's, usando-se diferentes diluições das mesmas durante 24 e 48 h (Fig.20).

Para cada tempo de incubação individual não existiu uma interacção significativa entre a formulação usada e a dose de nanopartículas ($p=0,12$), no entanto a dose contribuiu para cerca de 84% da variância total dos resultados obtidos ($p <0,001$). Quando as experiências foram consideradas conjuntamente o factor tempo contribuiu para que existisse uma interacção significativa entre os dois parâmetros ($p=0,0017$), sendo a dose, uma vez mais, a condição maioritária para as diferenças observadas. Após incubação de 24 h foi possível observar que não existiam diferenças significativas entre as várias formulações testadas (considerando a mesma dose) até à dose intermédia de $12,50 \mu\text{l}$, não havendo redução da viabilidade ($\sim 80\%$). Todavia, para doses mais elevadas (25 e $50 \mu\text{l}$) ocorreu uma redução drástica da viabilidade celular, até cerca de 40 e 20%, respectivamente. Para a dose de $25 \mu\text{l}$ as diferenças mais notáveis foram entre as formulações de Polox 68 simples e SLN-PEG, comparativamente a SLN-Polox-68 ($p <0,05$). Para esta mesma dose e para a dose máxima foi possível observar uma diminuição geral da viabilidade, tendo-se detectado diferenças significativas comparando as diversas formulações entre

si, considerando as doses mais baixas doses mais baixas ($p < 0,001$, comparativamente às doses de 2,5 e 6,25 μl). A toxicidade deveu-se então à dose específica de cada formulação e não ao tipo de formulação usada (Fig. 20A). Após a incubação de 48 h observou-se uma maior redução da viabilidade mesmo para doses mais baixas, comparativamente às 24 h, mas mais uma vez esta redução só se tornou significativa para doses $\geq 12,5 \mu\text{l}$ (p variável consoante as comparações efectuadas, tendo um valor $p < 0,001$ para as doses máximas). Houve interacção entre as variáveis dose e formulação, sendo a dose o parâmetro que mais contribuiu para a redução da viabilidade celular. Para a dose intermédia de 6,25 μl , a formulação SLN-Ptx-Beva foi a que mostrou uma maior toxicidade, comparativamente às restantes formulações para a mesma dose ($p < 0,001$). Para 12,5 μl a formulação de SLN-Polox 68 não mostrou alterações a nível de viabilidade celular, relativamente às doses inferiores, mas as restantes formulações testadas promoveram uma maior toxicidade do que as doses inferiores [SLN-Ptx, Polox 68 e SLN-Polox 68-Beva ($p < 0,05$); SLN-PEG ($p < 0,01$)]. Tal como para as 24 h foi com as doses superiores que se obteve maior toxicidade por parte de todas as formulações, comparativamente às doses mais baixas ($p < 0,001$, havendo valores igualmente significativos, mas com menor valor de p , comparativamente à dose de 12,5 μl) (Fig. 20B).

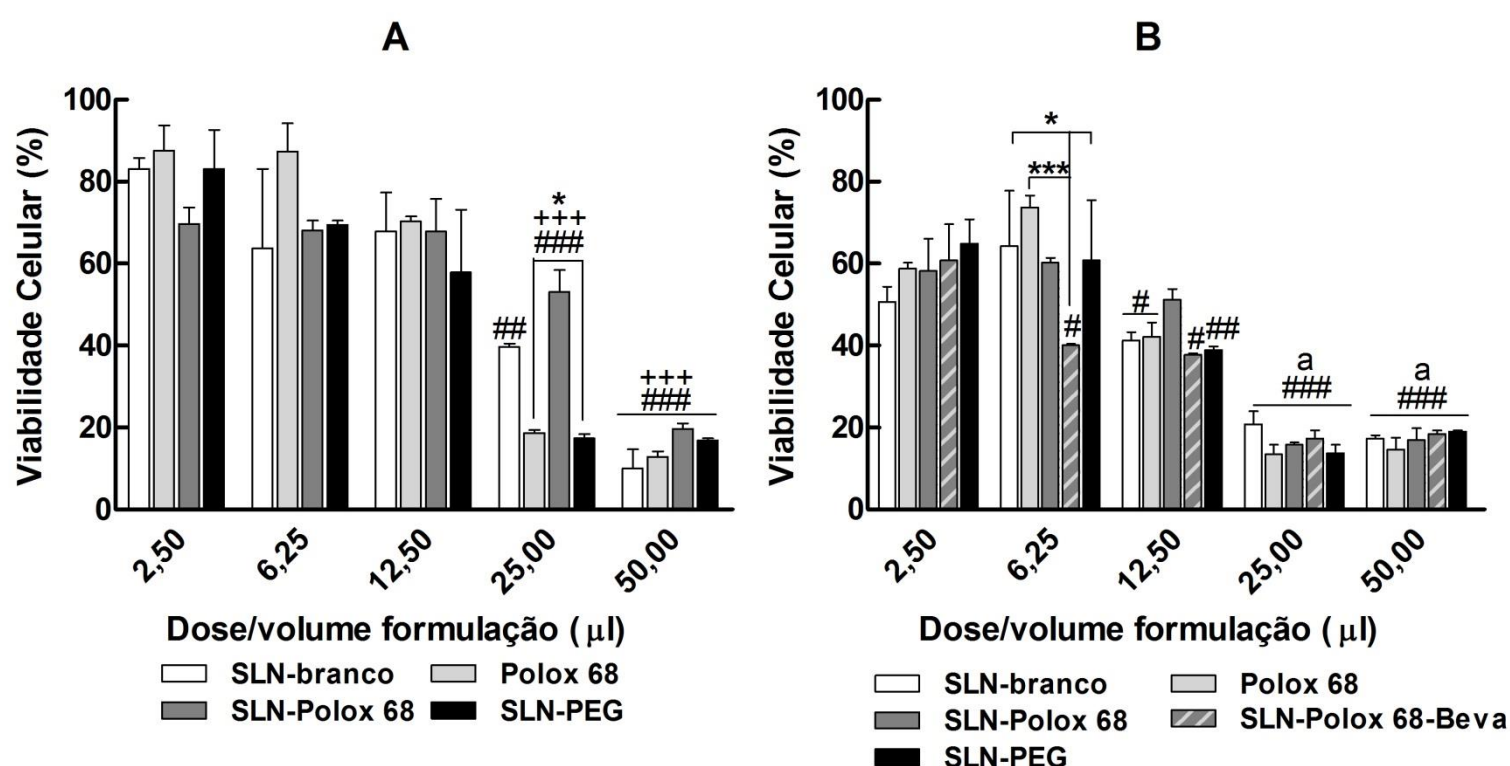


Figura 20. Viabilidade de macrófagos peritoneais de rato, após tratamento com diferentes volumes de nanopartículas vazias. As células foram incubadas com as mesmas doses (2,5; 6,25; 12,5; 25 e 50 μl), durante 24 h (A) e 48 h (B). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT, usando-se células não-tratadas como controlo negativo. Os resultados foram expressos como média \pm SEM, $n=2$, *Two-way ANOVA*. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, comparativamente a SLN-Polox-68 (24 h) e SLN-Polox 68-Beva (48 h) na mesma dose; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, comparativamente à dose de 2,50 μl e 6,25 μl ; +++ $p < 0,001$, comparativamente à dose de 12,5 μl ; a, valor estatístico variável para cada formulação, comparando-se com a dose de 12,5 μl (48 h).

Como controlo positivo avaliou-se a possível toxicidade do anticorpo (Bevacizumab), usado na funcionalização da superfície de algumas das nanopartículas, tendo-se escolhido o mesmo volume/dose e períodos de incubação. Foi possível observar que não houve qualquer redução significativa da viabilidade celular, quer às 24 h quer às 48 h ($p=0,76$). Mesmo nas doses mais elevadas, a viabilidade dos macrófagos manteve-se sempre superior a 80%, não havendo toxicidade associado a esta molécula (dados não apresentados). Este facto foi comprovado pelas imagens obtidas por microscopia óptica de contraste de fase em que, após incubação com Beva simples ou associado às nanopartículas, se observou uma mudança na morfologia das células. Estas adoptaram uma morfologia “estrelada” (Fig. 21A), onde os pseudópodes se

alongaram de forma evidente, comparativamente a outras formulações onde os macrófagos mantiveram a sua forma esférica (Fig. 21B).

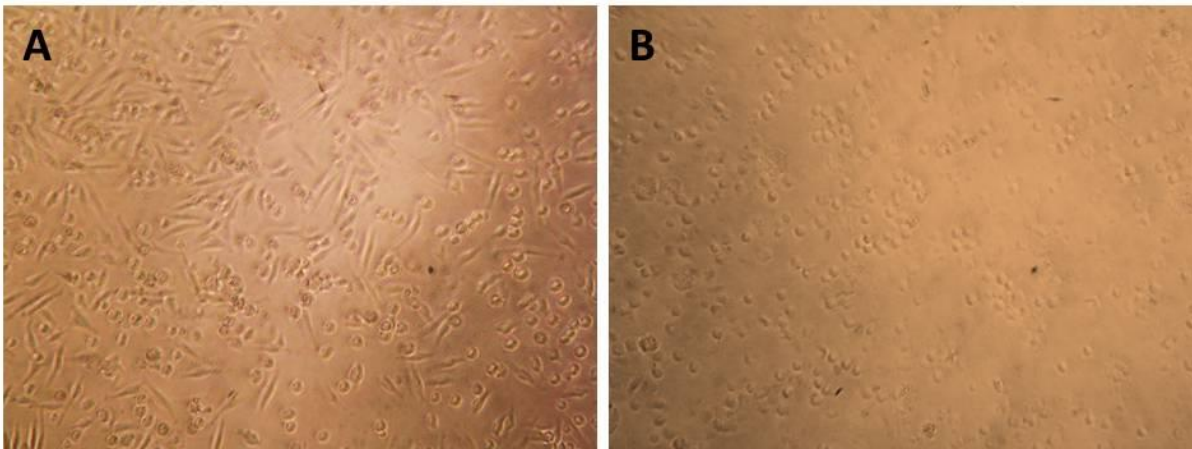


Figura 16. Imagens de macrófagos peritoneais de rato obtidas por microscopia óptica de contraste de fase (ampliação 200 ×). As células foram incubadas com uma solução comercial de Bevacizumab (A) e com a formulação de SLN-PEG (B). Observou-se uma alteração de morfologia das células fagocitárias, quando incubadas com o anticorpo humanizado, comparativamente a formulações que não contêm esta molécula.

3. Avaliação do efeito terapêutico para a linha celular MDA-MB-231

De modo a avaliar a possível actividade biológica das formulações desenvolvidas, tendo em conta que o seu efeito será na terapêutica de cancro de mama avançado metastático, com possível disseminação pulmonar, procedeu-se ao estudo de toxicidade das partículas vazias e efeito terapêutico das partículas, contendo Paclitaxel encapsulado, para a linha celular de adenocarcinoma mama tripla negativo – MDA-MB-231. Estes estudos permitiram avaliar a biocompatibilidade e a eficácia de internalização dos sistemas em comparação com células tumorais, de modo a confirmar o potenciamento terapêutico do novo DDS e, ainda, calcular a concentração de nanopartículas com fármaco encapsulado necessária para reduzir a viabilidade celular em 50% (IC50) que, quando comparada à solução i.v. de Paclitaxel, permitiu aferir a actividade biológica do sistema.

3.1 – Estudos de toxicidade de nanopartículas vazias

As células MDA-MB-231 foram incubadas com diferentes concentrações das diversas formulações de nanopartículas durante 24, 48 e 72 h. Os factores tempo, tipo de formulação e dose utilizada contribuíram de forma extremamente significativa para a variância total dos resultados obtidos ($p < 0,0001$) e somente às 24 h é que a formulação não teve um efeito significativo sobre as diferenças observadas entre os grupos ($p = 0,45$). Às 24 h não se observaram diferenças entre as diversas formulações usadas, sendo a dose individual de cada formulação o único parâmetro que teve influência sobre a viabilidade celular. É de notar, no entanto, que para a dose mais baixa, a única formulação que não contribuiu para a proliferação celular (valores de viabilidade superiores a 100%) foi a SLN-Branco ($p < 0,001$). Na dose de 6,25 μl , este efeito foi revertido, tendo havido um aumento da viabilidade com a dose mencionada ($p < 0,001$), observando-se o efeito inverso para a formulação de Polox 68 ($p < 0,05$). Este padrão manteve-se para a dose intermédia, sendo a única diferença notável entre as NP's testadas ocorrido para as SLN-Polox 68, em que a viabilidade reduziu para cerca de 40% ($p < 0,001$). Mais uma vez, a variância maior resulta de doses superiores, sendo a viabilidade foi reduzida de forma significativa ($p < 0,001$). De um modo geral, concluiu-se que estas diferenças na viabilidade, apesar de serem consideradas significativas (comparativamente ao limiar da viabilidade de 100%), devem-se essencialmente ao facto de doses baixas terem induzido proliferação celular em cerca de 50% e, mesmo para as doses mais elevadas, a viabilidade nunca diminuiu abaixo dos 40/50% (Fig. 22A).

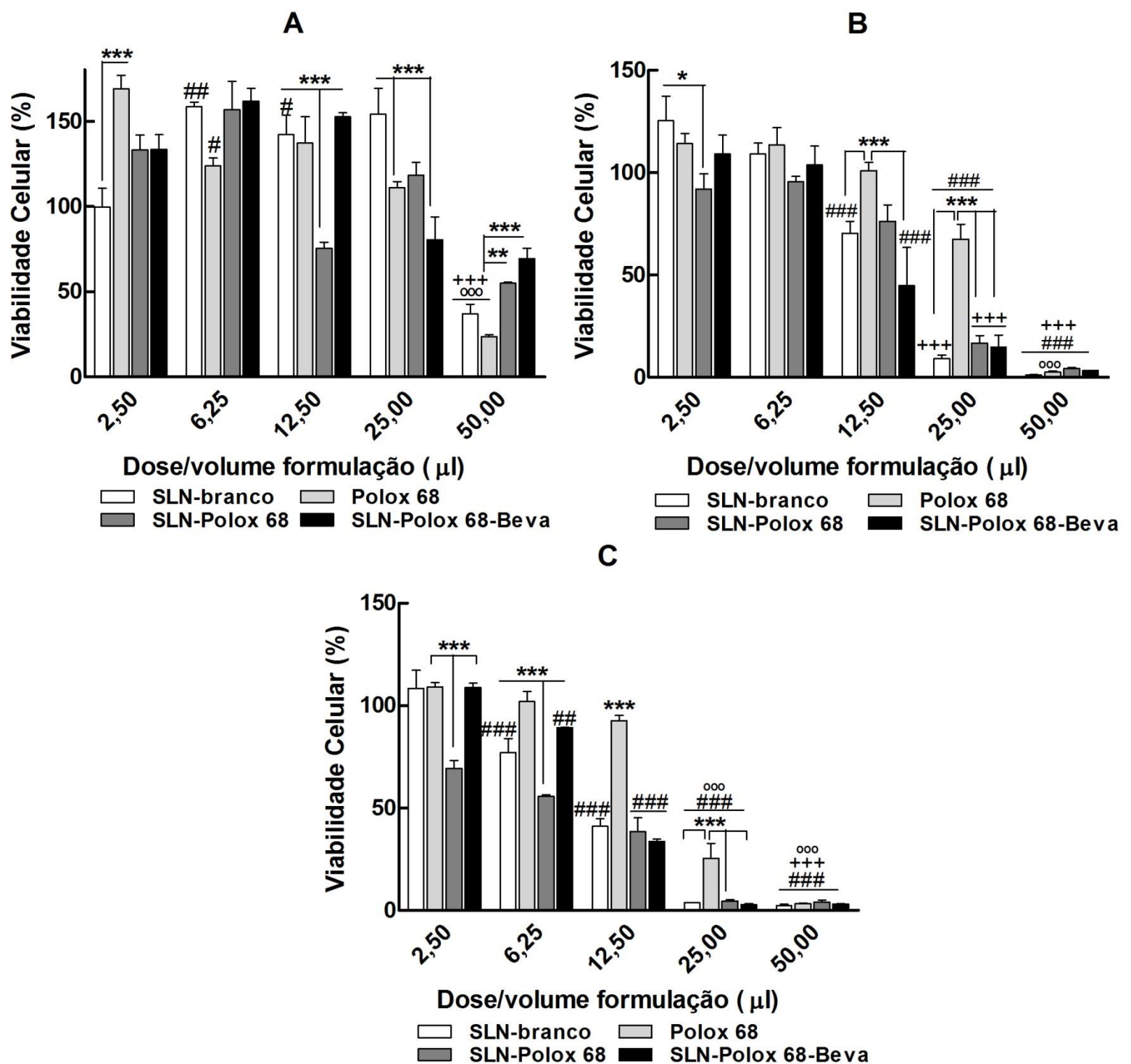


Figura 17. Viabilidade das células MDA-MB-231 após tratamento com diferentes volumes de nanopartículas vazias. As células foram incubadas com as mesmas doses (2,5; 6,25; 12,5; 25 e 50 μl), durante 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C), tendo-se avaliado também o efeito do Bevacizumab livre (1,25; 3,13; 6,25; 12,5 e 25 μg/ml), para os mesmos períodos de tempo (D). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT, usando-se células não-tratadas como controlo negativo. Os resultados foram expressos como média ± SEM, n=3, *Two-way ANOVA*. * p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001, expressam comparações efectuadas entre formulações para a mesma dose; ##p < 0,01, ###p < 0,001, comparativamente à dose de 2,50 μl e 6,25 μl, somente às 48 h; +++p < 0,001, comparativamente à dose de 12,5 μl e °°°p < 0,001, comparativamente à dose de 2,5 μl.

Relativamente a tempos de incubação superiores (48 e 72 h) o factor tempo tornou-se relevante para as diferenças observadas, sendo a dose individual de cada formulação o parâmetro que teve maior impacto na variância dos grupos; o seu efeito mais proeminente observou-se para a incubação de 72 h (p < 0,0001). Para estes dois períodos, observou-se um efeito menos acentuado em termos de proliferação celular, comparativamente ao período de 24 h, no entanto até à dose intermédia de 12,5 μl, a viabilidade manteve-se acima dos 60% para a maioria das formulações. As diferenças observaram-se mais uma vez para doses elevadas, sendo as formulações SLN-branco, SLN-Polox 68 e SLN-Polox 68-Beva responsáveis por uma redução muito significativa da viabilidade celular (abaixo dos 10%) para doses intermédias e altas (p < 0,001). Todas as

formulações apresentaram um padrão de toxicidade para estes períodos de incubação, excepto o Polox 68 simples que só reduziu a viabilidade na dose máxima testada, 50 µl, quer às 48 h quer às 72 h ($p < 0,001$). Para a maioria das doses mais baixas a variância obtida para a mesma dose só se observou exactamente entre o Polox 68 e as restantes formulações (Fig. 22B e 22C). Tal como para os macrófagos, avaliou-se a toxicidade da solução comercial de Bevacizumab, tendo-se concluído, mais uma vez, que este anticorpo não teve qualquer efeito na redução da viabilidade celular (valores superiores a 90%), mesmo para períodos de incubação longos. A dose desta molécula não influenciou o seu efeito ($p=0,06$), havendo somente pequenas variações da viabilidade ao longo do tempo (dados não apresentados).

3.2 – Estudos de citotoxicidade de nanopartículas contendo Paclitaxel

De modo a avaliar o possível efeito terapêutico das várias formulações, procedeu-se à incubação das células com as nanopartículas, devidamente diluídas, durante 4, 8, 24, 28 e 72 h. Apesar das diferentes formulações terem apresentado resultados variáveis, para cada uma individualmente, houve interacção significativa entre os factores dose e tempo de exposição ao tratamento, tendo estes um efeito significativo sobre as diferenças observadas entre os vários grupos ($p < 0,0001$). No caso das SLN-Ptx observou-se que as doses baixas (0,42 e 1,04 µg/ml) e a dose intermédia (2,08 µg/ml) não alteraram de forma significativa a viabilidade celular (viabilidade $\geq 50\%$). Em contrapartida, doses mais elevadas (4,17 e 8,33 µg/ml) reduziram a viabilidade para cerca de 40% após 48 h de incubação, tendo um efeito significativo, comparativamente às restantes doses ($p < 0,001$) (Fig. 23A). A formulação anterior foi modificada, adicionando-se polietilenoglicol à sua superfície, estão que é um efeito potenciador em termos de morte celular, pois mesmo em doses mais baixas provoca uma redução significativa a partir das 8 h de exposição ($p < 0,001$). Para tempos de incubação superiores a 24 h e para as doses mais elevadas, a viabilidade celular foi reduzida para 20%, mantendo-se diferenças significativas para os resultados entre as 24 h e as 48 h ($p < 0,001$) e mesmo entre as 48 h e as 72 h ($p < 0,001$), observando-se que a morte celular foi superior a 90% (Fig. 23B). O Polox 68 é um polímero anfílico que também foi adicionado à formulação lipídica de base e, comparativamente à anterior, apresentou uma redução da viabilidade de cerca de 20%, imediatamente para doses mais baixas e para períodos de incubação curtos. Estes tempos de incubação não apresentaram diferenças significativas entre si, mas a dose começou a influenciar a morte celular para períodos superiores a 8 h. Para tempos de incubação maiores (24 h), as doses intermédias-altas tiveram um efeito significativo sobre a viabilidade celular ($p < 0,001$), havendo uma indução de cerca de 90% de morte celular (Fig. 23C). Tendo em vista um possível direccionamento das partículas, estas foram também modificadas com um anticorpo monoclonal humanizado – Bevacizumab.

A formulação SLN-Ptx-Beva não apresentou grande variabilidade entre os parâmetros avaliados, não tendo havido interacção entre as variáveis tempo e dose ($p=0,089$). Para doses até 4,17 µg/ml a viabilidade celular não foi muito diferente e, mesmo para tempos de exposição longos, manteve-se sempre superior a 50%. As diferenças foram notáveis para a dose máxima de 8,33 µg/ml que, a partir das 8 h levou a uma redução significativa da viabilidade celular ($p < 0,001$) (Fig. 23D). A formulação lipídica base foi totalmente modificada com todas as moléculas já mencionadas, dando origem à SLN-Ptx-Polox 68-Beva, que se apresentou como sendo a formulação menos eficaz em termos de efeito citotóxico. As doses mais baixas e a intermédia tiveram um efeito bastante semelhante e constante ao longo do tempo, mantendo-se a viabilidade celular superior a 50%, mesmo para as doses mais elevadas. A dose máxima foi a que induziu uma morte celular superior, apresentando uma redução de cerca de 40% da viabilidade, a partir das 48 h ($p < 0,0001$). Esta dose, entretanto, esgotou-se, não sendo possível avaliar o seu efeito para tempos de exposição superiores a 24 h. De acordo com os dados obtidos, se se mantivesse a tendência observada previa-se que esta dose máxima continuaria a ter o efeito mais proeminente para esta formulação (Fig. 23E). Tal como para as nanopartículas, também para este fármaco os parâmetros dose e tempo de exposição, bem como a sua interacção, mostraram-se determinantes em termos de efeito terapêutico ($p < 0,0001$).

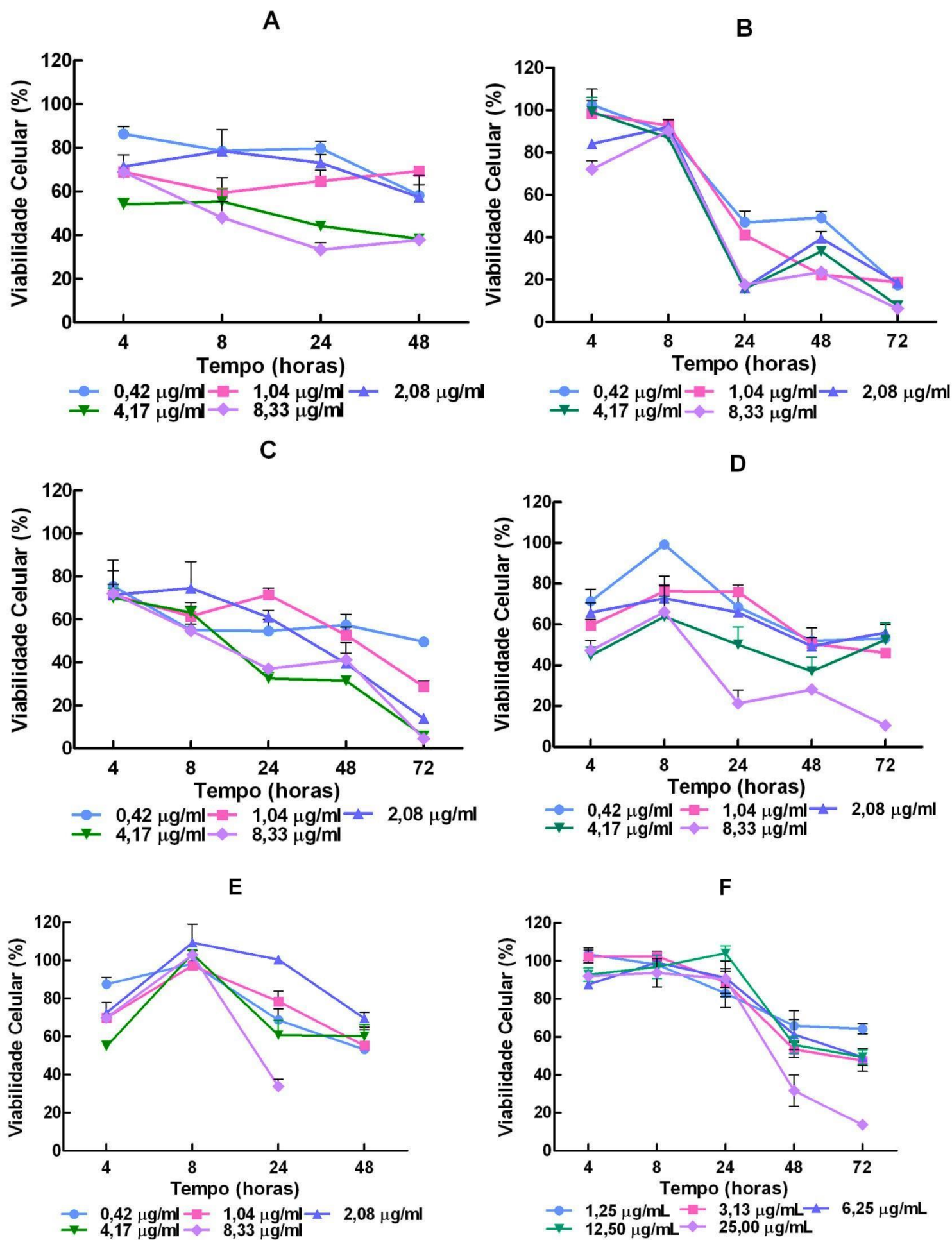


Figura 18. Viabilidade das células MDA-MB-231 após tratamento com diferentes formulações de nanopartículas contendo Paclitaxel encapsulado: SLN-Ptx (A), SLN-Ptx-PEG (B), SLN-Ptx-Polox 68 (C), SLN-Ptx-Beva (D) e SLN-Ptx-Polox 68-Beva (E). As células foram incubadas com as mesmas concentrações de Paclitaxel encapsulado (0,42; 1,04; 2,08; 4,17 e 8,33 µg/ml), durante 4, 8, 24, 48 e 72 h. Usou-se como controle positivo a solução comercial de Paclitaxel livre (1,25; 3,13; 6,25; 12,5 e 25 µg/ml), tendo-se incubado as células com esta solução para os mesmos períodos de tempo (F). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT, usando-se células não-tratadas como controle negativo. Os resultados foram expressos como média \pm SEM (*Two-way ANOVA*) para cada experiência das diferentes formulações de NP's (n=3) e para o Paclitaxel (n=6).

Resultados

Até às 24 h não se observaram diferenças significativas para qualquer uma das doses utilizadas. Somente a partir das 24 h é que a viabilidade celular diminuiu, de forma significativa, e a dose máxima foi responsável por uma redução de cerca de 80% da viabilidade celular ao final de 72 h ($p < 0,001$). Para esta solução o tempo revelou-se o factor com maior impacto na variabilidade dos resultados (sendo responsável por 65% da variância total) e as diferenças são observadas comparando-se tempos de exposição mais curtos, relativamente a tempos de exposição mais longos ($p < 0,001$), não havendo variabilidade entre as 48 e as 72 h (Fig. 23F). Com os dados obtidos, foi possível calcular a concentração de cada formulação capaz de reduzir a viabilidade celular em 50%. Através de uma regressão linear de cada gráfico individual, obtiveram-se os vários valores de IC50, para as diferentes formulações testadas nos diversos períodos de tempo, tendo sido possível comparar estes valores com os obtidos para a solução de Paclitaxel livre, aferindo-se a potencialidade das novas formulações (Tabela 3). Tendo em conta que a solução de Paclitaxel só teve um efeito significativo para períodos de incubação superiores a 24 h, os valores de IC50 calculados para este fármaco só se encontram tabelados para as 48 h e 72 h. Pela observação do Tabela 3, foi possível concluir que todas as formulações apresentaram valores de IC50 relativamente baixos, tendo a formulação de SLN-PEG o valor significativamente mais baixo ($p < 0,001$). Mais uma vez, a formulação que mostrou menor eficácia terapêutica ou potenciação farmacológica foi a SLN-Ptx-Polox 68-Beva (IC50=6,42 ± 1,52 µg/ml). Às 48 h foi possível comparar a eficácia terapêutica *in vitro* de várias formulações em relação à solução de fármaco livre, tendo-se concluído que a formulação SLN-Ptx apresentou um valor de IC50 de cerca de metade do valor obtido para o Paclitaxel (IC50=9,12 ± 1,58 µg/ml). No entanto, somente as formulações de SLN-Ptx-PEG, SLN-Ptx-Beva e SLN-Ptx-Polox 68 apresentam valores significativamente mais baixos ($p < 0,001$), sendo estes 5 (SLN-Ptx-Beva) a 26 vezes (SLN-Ptx-PEG e SLN-Ptx-Polox 68) inferiores à concentração de fármaco livre. Estes valores foram-se tornando progressivamente inferiores à medida que o tempo de exposição aumentou, um facto já comprovado, anteriormente, pela importância do tempo de exposição sobre o efeito terapêutico obtido.

Tabela 3. Valor de IC50 para a linha celular MDA-MB-231 após incubação com Paclitaxel livre e diferentes formulações de nanopartículas, durante 24, 48 e 72 h. Os resultados foram expressos como média ± SEM (*One-Way ANOVA*), obtidos após regressão não-linear dos gráficos de viabilidade celular representados na Figura 19 (*GraphPad Prism 5.0 Software*). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, comparativamente a SLN-Ptx-Beva; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, comparativamente a Paclitaxel.

| Formulação | IC50 (µg/mL) | | |
|------------------------|----------------|----------------|-----------------|
| | 24 h | 48 h | 72 h |
| Paclitaxel | - | 9,12 ± 1,58 | 4,09 ± 0,74 |
| SLN-Ptx | 3,80 ± 0,37 | 3,64 ± 0,56 | - |
| SLN-Ptx-PEG | 0,32 ± 0,07 ** | 0,35 ± 0,26 ## | 0,005 ± 0,002 # |
| SLN-Ptx-Beva | 3,25 ± 0,47 | 1,74 ± 0,67 ## | 1,56 ± 1,14 |
| SLN-Ptx-Polox 68 | 1,91 ± 1,09 * | 0,39 ± 0,02 ## | 0,39 ± 1,06 # |
| SLN-Ptx-Polox 68- Beva | 6,42 ± 1,52 | - | - |

Mais uma vez, às 72 h as formulações apresentaram valores de IC50 muito inferiores ao valor obtido para a solução de Ptx livre (4,09 ± 0,74 µg/ml), sendo que até este ponto se considerou a SLN-Ptx-PEG como a formulação mais eficaz em termos de potenciação farmacológica, tendo apresentado um valor de IC50 de 5 ng/ml após 72 h de incubação ($p < 0,05$, comparativamente ao fármaco livre).

Para completar os resultados obtidos na Fig. 23 procedeu-se à comparação de todas as formulações e respectivas

diluições, para cada período de tempo individual. Os resultados obtidos comprovam aqueles já mencionados anteriormente. Para períodos de incubação mais curtos (4 e 8 h), a viabilidade celular manteve-se acima de 70%, para doses baixas e intermédias de todas as formulações testadas. As principais diferenças começaram a notar-se para as doses de 4,17 e 8,33 µg/ml, principalmente das formulações de SLN-Ptx e SLN-Ptx-Polox 68 ($p < 0,01$ e $p < 0,001$), comparativamente à formulação SLN-Ptx-Polox 68-Beva, que não manifestou diferenças para qualquer das doses testadas neste período de tempo (viabilidade celular superior a 85%) (Fig. 24A e 24B). A variância total dos resultados começou a destacar-se nos períodos que sucederam as 24 h de incubação. Neste período, voltaram a se não notar diferenças significativas para a SLN-Ptx-Polox 68-Beva, excepto para a dose máxima, onde a redução da viabilidade já se demonstrou significativa ($p < 0,001$).

As formulações SLN-Ptx e SLN-Ptx-Polox 68 mantiveram o seu efeito citotóxico para as células MDA-MB-231, principalmente para as doses mais elevadas, novamente ($p < 0,01$ e $p < 0,001$), mas a formulação que realmente se destacou neste período de incubação foi a SLN-Ptx-PEG. Mesmo nas doses mais baixas, esta nanopartícula reduziu a viabilidade celular em cerca de 50% e nas para doses superiores a 2,08 µg/ml, esta redução foi potenciada, reduzindo a viabilidade celular para cerca de 20% ($p < 0,001$) (Fig. 24C). Às 48 h, observou-se um padrão semelhante ao já mencionado para o período de incubação anterior, tendo-se concluído que SLN-Ptx-Polox 68-Beva e SLN-Ptx-PEG são as formulações menos e mais promissoras deste trabalho, em termos de potencial terapêutico, respectivamente (Fig. 24D). Para o período de incubação mais longo testaram-se apenas as formulações que mantiveram uma indução significativa da morte celular, tendo-se observado que todas mantiveram a viabilidade abaixo dos 50%. Mais uma vez, somente as formulações SLN-Ptx-PEG e SLN-Ptx-Polox 68 se destacaram em termos de efeitos citotóxicos ($p < 0,001$), sendo que na dose mais elevada induziram a morte celular em mais de 90%. Neste período foi possível concluir que ambas as formulações mantiveram um padrão mais ou menos semelhante em termos de potencial terapêutico, diferindo apenas para doses mais baixas. Isto poderá ser explicado por ambas terem sido modificadas na superfície com polímeros extremamente hidrofílicos (Fig. 24E).

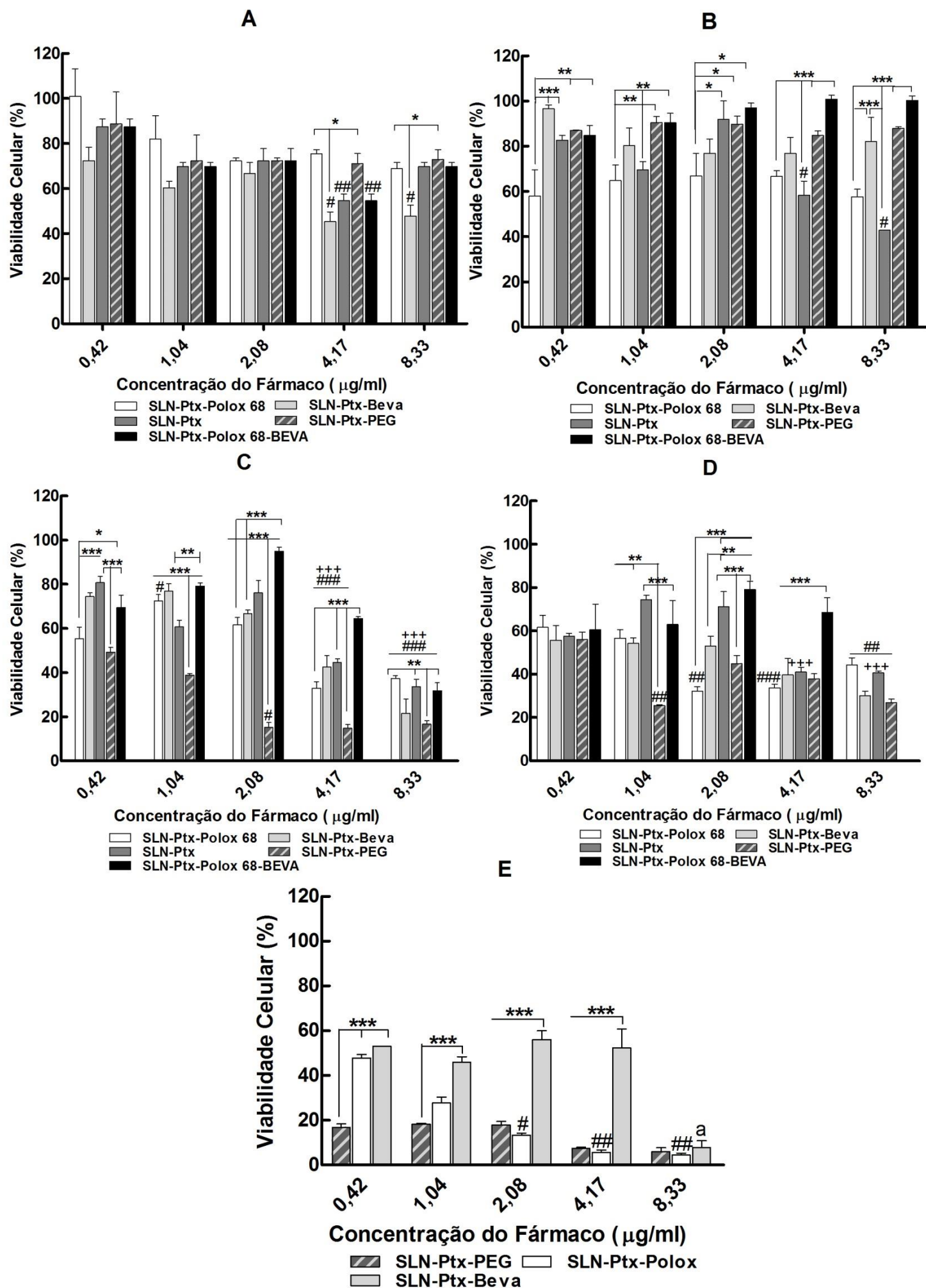


Figura 24. Comparação do efeito citotóxico das diferentes formulações de nanopartículas contendo Paclitaxel encapsulado, frente à linha celular MDA-MB-231. As células foram incubadas com as mesmas concentrações de Paclitaxel encapsulado (0,42; 1,04; 2,08; 4,17 e 8,33 µg/ml), durante 4 (A), 8 (B), 24 (C), 48 (D) e 72 h (E). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT, usando-se células não tratadas como controlo negativo. Os resultados foram expressos como média ± SEM, n=3, *Two-way ANOVA*. * p <0,05; **p <0,01 e ***p <0,001, expressam comparações efectuadas entre formulações para a mesma dose; #p <0,05; ##p <0,01; ###p <0,001, comparativamente à dose de 0,42 µg/ml e 1,08 µg/ml (às 24 h); +++p <0,001, comparativamente à dose de 2,08 µg/ml e 1,08 µg/ml (às 48 h); a: p <0,001, comparativamente a SLN-Ptx-Beva (0,42; 1,04; 2,08 e 4,17 µg/ml).

3.3 – Internalização das nanopartículas

No desenvolvimento de novos DDS torna-se importante conhecer e perceber as suas propriedades físico-químicas, pois todo o processo que envolve a sua eficiência de internalização e, conseqüentemente, a sua eficácia terapêutica advém desses factores. A internalização celular foi avaliada, durante um período de 2 h, para 50 µl das formulações contendo a sonda lipofílica DiL, já mencionada noutro capítulo deste trabalho. Nesta fase do trabalho, avaliou-se somente a internalização de NP's de base lipídica, modificadas ou não na sua superfície, de modo a avaliar possíveis diferenças e marcaram-se os núcleos das células MDA-MB-231 de modo a efectuar uma identificação preliminar do destino intracelular destas partículas.

A avaliação qualitativa da internalização das partículas foi efectuada por microscopia confocal. As imagens demonstraram que aos 0 min de incubação a fluorescência emitida pelas nanopartículas era nula, provando a inexistência destas na suspensão celular. Todas as formulações mostraram um aumento da fluorescência após 30 min de internalização, mas a co-localização só se tornou nítida para períodos superiores a 1 h, indicando que se terá iniciado uma possível entrada na célula (Fig. 25A-D).

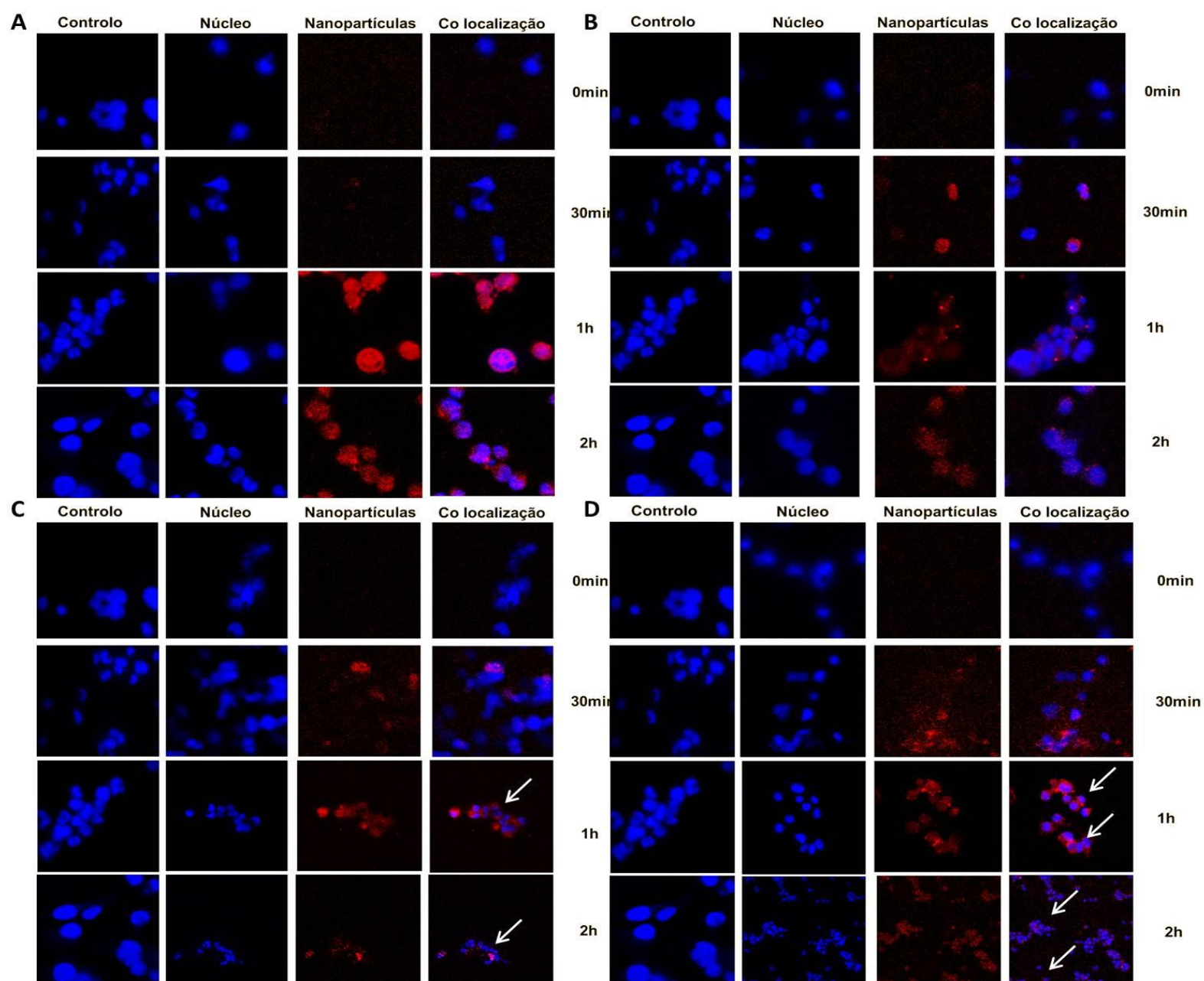


Figura 19. Imagens representativas da internalização de nanopartículas obtidas por microscopia confocal (ampliação 40×), após incubação das células MDA-MB-231 com SLN-DiL (A), SLN-Ptx-DiL (B), SLN-PEG-DiL (C) e SLN-Ptx-PEG-DiL (D), durante 0, 30, 60 e 120 min a 37°C. As nanopartículas foram previamente marcadas com uma sonda lipofílica (DiL), representada pela cor vermelha e os núcleos das células foram posteriormente coradas com Hoechst, representado pela cor azul. As imagens foram obtidas para os diferentes períodos de incubação, tendo-se registado imagens individuais e com co-localização para avaliar a internalização das partículas (n=2). Células não-tratadas foram utilizadas como controlo, tendo-se somente marcado o núcleo. As setas indicam alterações na morfologia nuclear

Apesar deste padrão comum entre as diferentes formulações existiram algumas variâncias entre os resultados obtidos. Para as formulações SLN-DiL (nanopartícula simples de base lipídica) e SLN-Ptx-DiL observou-se alguma fluorescência aos 30 min e, comparativamente à marcação nuclear, parecia que as NP's estariam localizadas no citoplasma das células e muitas na/volta da zona nuclear (facto observado nas imagens obtidas por co-localização). Para períodos de 1 e 2 h as NP's localizavam-se maioritariamente na zona à volta do núcleo e estes mostravam uma morfologia arredondada equiparável ao controlo (Fig. 25A e 25B). As restantes formulações foram pegiladas, tendo ou não Paclitaxel encapsulado (SLN-PEG-DiL e SLN-Ptx-PEG-DiL, respectivamente). Observou-se que mostraram uma fluorescência nítida a partir dos 30 min, mas esta era indicativa de uma menor localização celular específica por parte das NP's (fluorescência mais dispersa), colocando-se a hipótese de que a maioria das partículas ainda se encontrava numa zona extracelular ou citoplasmática. Para períodos de incubação maiores (1-2 h) a fluorescência tornou-se mais concentrada numa zona nuclear, tal como aconteceu para as formulações anteriores, todavia a morfologia celular estava alterada. Após tratamento com as formulações pegiladas foi possível observar que, comparativamente ao controlo, os núcleos apresentavam uma morfologia alterada, tendo reduzido em termos de tamanho, indicando uma possível fragmentação destes (Fig. 25C e 25D).

Para complementar os resultados obtidos por microscopia confocal procedeu-se à quantificação da fluorescência relativa, não-normalizada, não só para as condições utilizadas na análise qualitativa, mas também para tentar perceber o efeito da dose e das partículas na sua eficiência de internalização, já que a via maioritariamente descrita para a entrada destas partículas será a endocítica. As células foram então incubadas com 25, 50 e 100 μ l das várias formulações, durante um período de 2 h que foi o descrito na análise qualitativa, mas também se avaliou a dose máxima para um período de 4 h. As doses mais baixas (25 e 50 μ l), não mostraram alterações significativas de fluorescência entre si, indicando uma igual quantidade de NP's e velocidade de internalização semelhante para as duas doses.

No entanto, a dose de 50 μ l indicou que as formulações pegiladas apresentavam uma fluorescência significativamente mais baixa ($p < 0,01$), comparativamente à formulação lipídica simples (SLN-DiL) (Fig. 26A). Para a dose máxima os resultados obtidos foram variáveis, tendo havido um aumento significativo da fluorescência por parte da formulação de SLN-Ptx-DiL, comparativamente às restantes ($p < 0,001$) e ainda da SLN-DiL, comparativamente às formulações SLN-PEG-DiL ($p < 0,05$) e SLN-Ptx-PEG-DiL ($p < 0,01$). Observou-se também que esta dose apresentou um aumento significativo, em termos de quantidade de fluorescência, para as formulações SLN-DiL ($p < 0,01$), SLN-Ptx-DiL ($p < 0,001$), SLN-PEG-DiL ($p < 0,05$) comparativamente às doses mais baixas, enquanto a formulação pegilada SLN-Ptx-PEG-DiL não apresentou diferenças significativas em termos de dose (Fig. 26B). Os resultados descritos referem-se apenas ao período de incubação de 4 h, no entanto, estudou-se também o efeito do tempo sobre a internalização das partículas. Este factor teve um efeito significativo em termos de variância dos resultados ($p = 0,0008$), havendo interacção entre este parâmetro e o tipo de formulação testada ($p = 0,032$).

Pela observação da figura, concluiu-se que, mais uma vez, a formulação pegilada (SLN-Ptx-PEG-DiL) apresenta uma quantidade de fluorescência significativamente mais baixa, relativamente às restantes formulações, mesmo às 4 h ($p < 0,05$).

A internalização de todas as partículas diminuiu significativamente, para o período mais longo de incubação, principalmente em relação à SLN-Ptx-DiL ($p < 0,001$), indicando uma possível saturação dos transportadores membranares de endocitose (Fig. 26B). Como conclusão geral, é possível dizer-se que o tipo de formulação e as suas propriedades físico-químicas influenciam a capacidade e velocidade de internalização celular, sendo a dose e o tempo de exposição factores que influenciam a eficácia de entrada das nanopartículas. A formulação modificada na superfície com PEG parece ter uma velocidade de internalização mais lenta, no entanto está associada a modificações nucleares evidentes, indicadores de uma fase apoptótica inicial ou tardia das células MDA-MB-231.

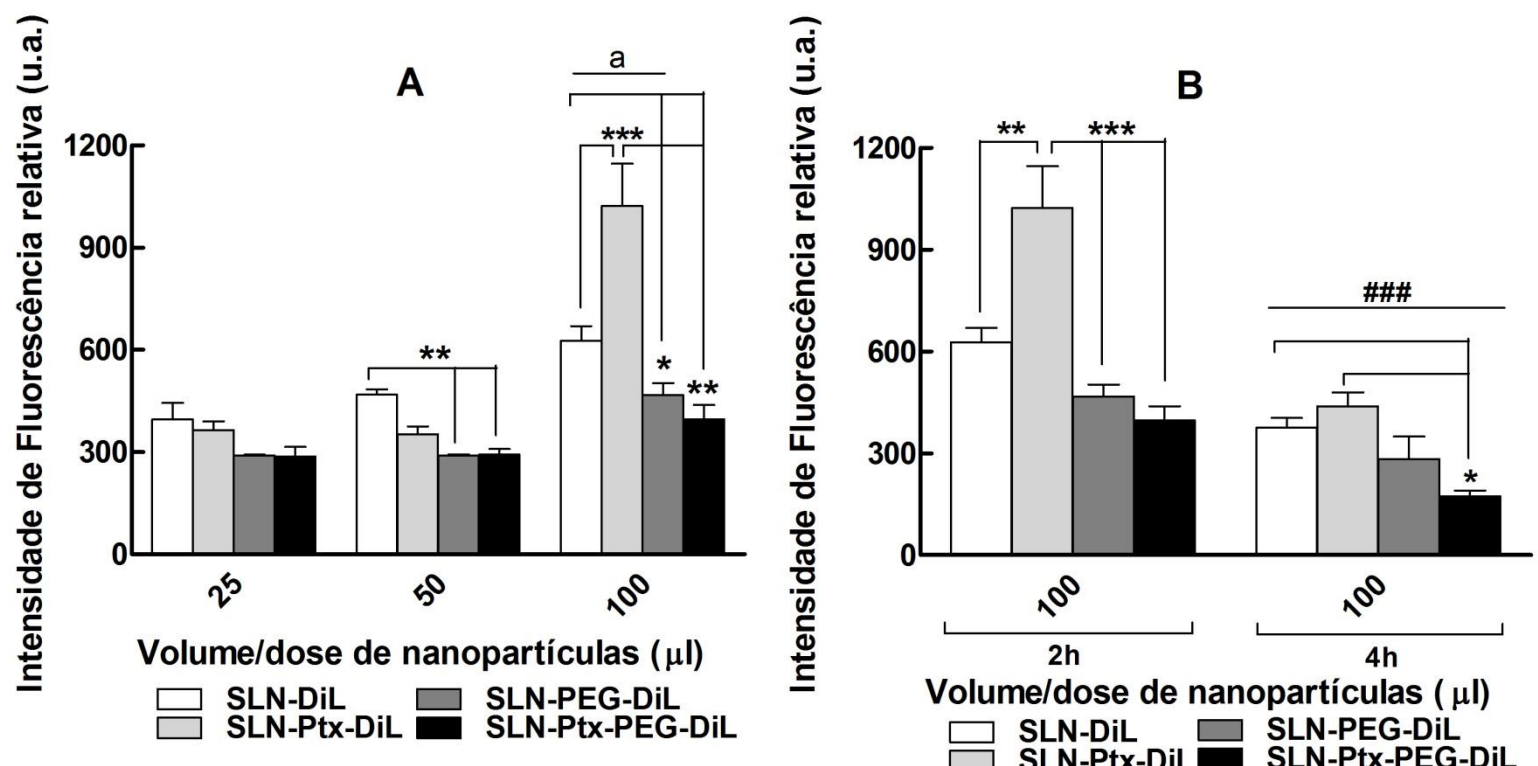


Figura 26. Quantificação da internalização após incubação das células MDA-MB-231 com diferentes volumes de nanopartículas marcadas (25, 50 e 100 µl), durante 2 (A) e 4 h (B), medindo-se a intensidade de fluorescência (em unidades arbitrárias – u.a.) correspondente a cada tratamento. Os resultados foram expressos em termos de média ± SEM, n=3 (*Two-way ANOVA*). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 comparativamente a SLN-DiL e SLN-Ptx-DiL dentro da mesma dose; ###p < 0,001, comparativamente a SLN-Ptx-DiL (100 µl), 2 h; a: valor de p variável, comparativamente às doses de 25 e 50 µl.

3.4 – Avaliação da percentagem de apoptose induzida por diferentes formulações

De modo a complementar/confirmar a hipótese colocada no resultado anterior - de um possível potenciamento terapêutico por parte da formulação pegilada - avaliou-se a percentagem de apoptose das formulações estudadas anteriormente no ensaio de internalização. Através da técnica de citometria de ligação de AnexinaV e exclusão de iodeto de propídeo foi possível avaliar o tipo de morte celular, após tratamento com as diversas nanopartículas. É de notar que devido à escassez de soluções de nanopartículas se utilizaram as respectivas doses de IC50, correspondentes a cada formulação, para um período de 24 h, tendo-se obtido resultados que não podem ser comparados directamente aos de microscopia confocal, mas que poderão ser complementares.

As imagens obtidas por citometria de fluxo (gentilmente cedidas pela Dra. Cristina Gonçalves da Unidade de Bioquímica do IBILI/FMUC – Directora: Prof^a Doutora Ana Bela Sarmiento) foram quantificadas, obtendo-se a percentagem de células viáveis (AnexinaV-/IP-), em apoptose (AnexinaV+/IP-), apoptose tardia (AnexinaV+/IP+) e necrose (AnexinaV-/IP+) após tratamento com as formulações SLN-Ptx- e SLN-Ptx-PEG (Fig. 27). As Figuras 27A, B e C ilustraram que a fluorescência vermelha (associada à ligação da AnexinaV à fosfatidiliserina da membrana de células apoptóticas) foi aumentando desde do controlo (A) até à formulação pegilada (C). Os valores obtidos foram então quantificados, tendo havido uma diminuição da viabilidade celular de 90% (controlo) para cerca de 76% para a formulação SLN-Ptx e 65% para a SLN-Ptx-PEG. A morte celular por necrose foi descartada, pois apresentou um valor quase nulo, sendo que a morte celular por apoptose aumentou de um valor de 1% (controlo) para cerca de 11 e 21% para as NP's SLN-Ptx e SLN-Ptx-PEG, respectivamente (Fig. 27D). Para facilitar a interpretação dos resultados somaram-se os valores obtidos para a apoptose de estágio inicial e tardio, tendo-se obtido os valores de percentagem de apoptose total, para cada um dos tratamentos. Concluiu-se então que a formulação não-pegilada não aumentou a taxa de apoptose de forma significativa,

Resultados

comparativamente ao controlo, mas a formulação pegelada sim ($p < 0,05$). Este resultado pode então confirmar o obtido anteriormente nas imagens de confocal, justificando a fragmentação nuclear obtida após tratamento com a formulação contendo PEG. Todavia, não existiu variância significativa entre as duas nanopartículas usadas, em termos de morte celular, pelo que a dose e o tempo de exposição pode não ser suficiente para comprovar as possíveis diferenças entre estas. Estes resultados podem então fomentar a hipótese de que SLN-Ptx-PEG podem ter uma entrada mais lenta na célula (resultados comprovados pela quantidade de fluorescência), no entanto pode apresentar um maior efeito terapêutico, pois quando se encontra no espaço intracelular potencia a morte por apoptose.

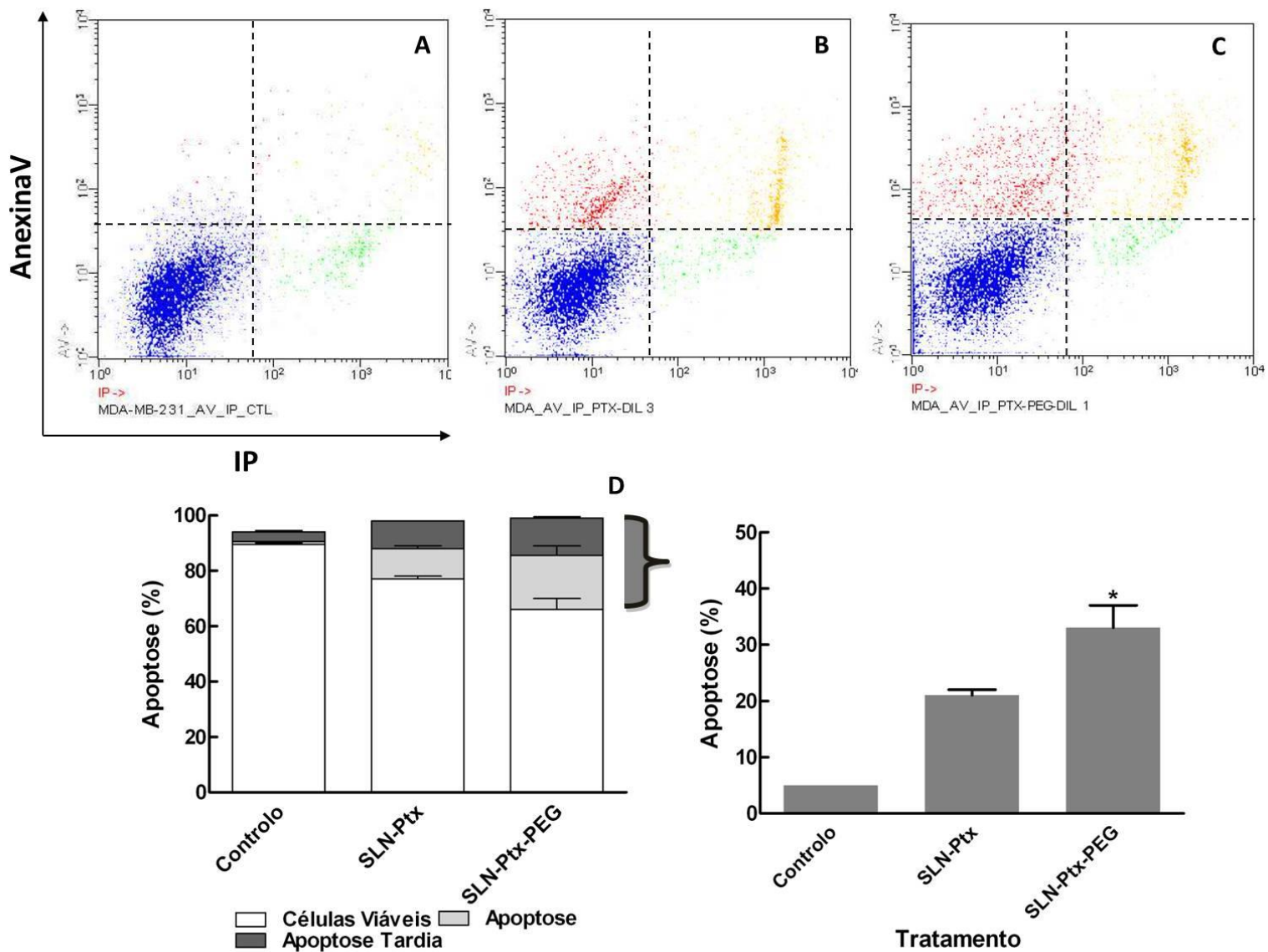


Figura 20. Análise por citometria de fluxo de células MDA-MB-231 não-tratadas, usadas como controlo (A), e células incubadas com 7,6 μ l (3,8 μ g/ml) de SLN-Ptx (B) e 0,62 μ l (0,32 μ g/ml) de SLN-Ptx-PEG (C). Após a incubação a suspensão celular foi incubada com AnexinaV e Iodeto de Propídeo (IP) para distinguir apoptose e necrose, respectivamente. As parcelas obtidas encontram-se divididas em quatro secções diferentes, estando as células viáveis (AnexinaV⁻/IP⁻) representadas no quadrante inferior esquerdo (azul), as células em apoptose (AnexinaV⁺/IP⁻) no quadrante superior esquerdo (vermelho), as células em necrose (AnexinaV⁻/IP⁺) no quadrante inferior direito (verde) e as células em apoptose/apoptose tardia (AnexinaV⁺/IP⁺) no quadrante superior direito (amarelo). Assim, foi possível averiguar a percentagem de células viáveis e células com diferentes tipos de morte celular, tendo-se avaliado a percentagem de células em apoptose, induzida pelos diferentes tipos de tratamentos (D). Os resultados foram expressos como média \pm SEM, n=2, *One-Way ANOVA*. * $p < 0,05$, comparativamente ao controlo.

4. Avaliação da citotoxicidade perante uma co-cultura de macrófagos e células MDA-MB-231

De modo a mimetizar um ambiente biológico, tendo em conta diferentes interações celulares e a presença de macrófagos junto de tumores, procedeu-se à optimização de um protocolo preliminar para o cultivo de uma co-cultura, para posteriormente avaliar quais as diferenças a nível de efeito citotóxico das diferentes formulações, perante uma suspensão celular mista de MDA-MB-231 e macrófagos peritoneais de rato.

As células foram cultivadas em diferentes meios celulares (RPMI completo e HAM-F10 completo), tendo-se avaliado também quais as diferenças que decorriam da cultura em separado das células e adição posterior da outra linha celular ou preparando uma suspensão mista, que foi plaqueada simultaneamente. Os resultados obtidos foram variáveis e foi macroscopicamente visível que o Poço 2, onde se utilizou o meio RPMI e se colocou a suspensão celular mista, era o que apresentava coloração roxa mais acentuada (Fig. 28a). Os restantes poços onde se colocaram as células separadamente e o meio HAM-F10 apresentavam colorações semelhantes, menos acentuadas que o Poço 2. Para confirmar estes resultados, mediu-se a absorvância de cada poço individualmente a 570 nm, tendo-se confirmado o resultado macroscópico. Houve variância entre os resultados, sendo que tanto a forma como as células foram plaqueadas, como o meio de cultura utilizado foram factores cruciais para a viabilidade celular. O poço 2 foi o que apresentou maior viabilidade celular, tendo uma absorvância média relativa de 0,6 - significativa comparativamente às restantes condições ($p < 0,001$). Concluiu-se também que houve maior sucesso quando a cultura foi em meio RPMI completo, pois para além do poço 2, também o poço 1 apresentou viabilidade significativa relativamente aos restantes poços ($p < 0,05$ comparativamente aos poços 3 e 4; $p < 0,01$, comparativamente aos poços 5 e 6).

A cultura celular em meio F10 foi a que apresentou menores valores de absorvância, pois os poços 4-6, apresentaram valores relativos médios inferiores a 0.2. Concluiu-se então que a melhor forma de preparar a co cultura celular é através de uma suspensão mista de cerca de 1:5, em termos de células MDA-MB-231 e macrófagos peritoneais de rato, plaqueados em simultâneo em meio RPMI 1640 completo (Fig. 28).

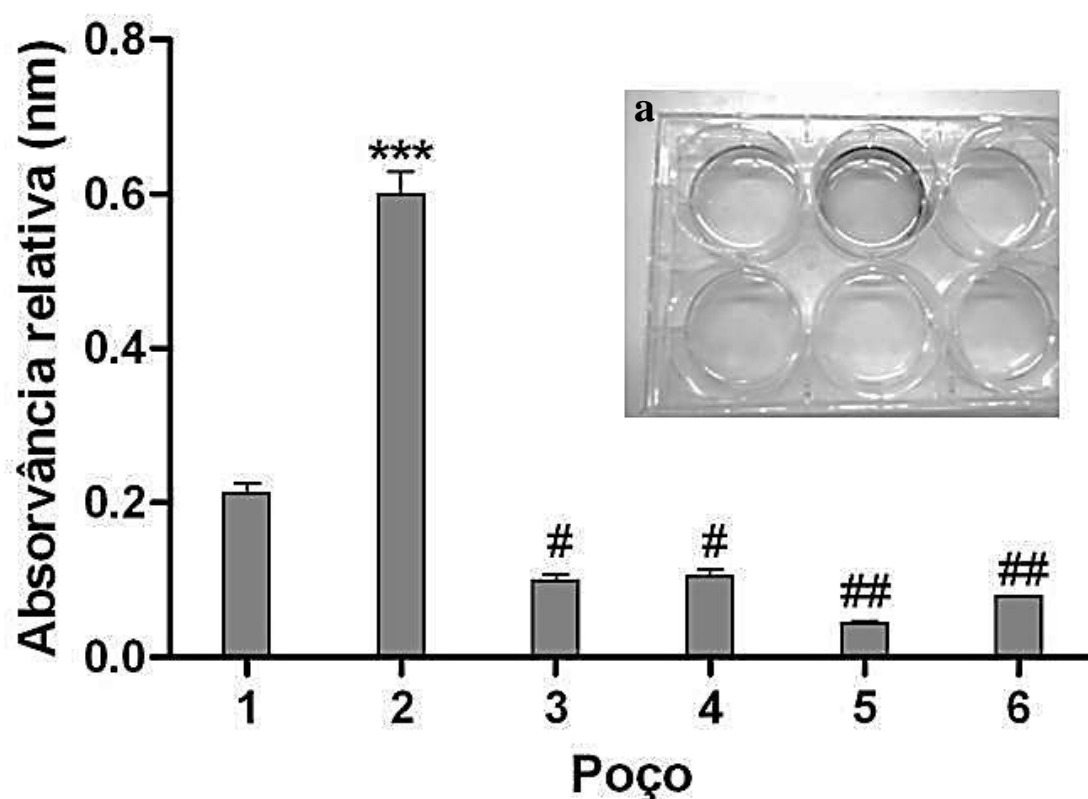


Figura 28. Absorvância relativa medida a 570 nm de uma co-cultura de células MDA-MB-231 e macrófagos peritoneais de rato, cultivadas em caixas de 6 poços, avaliando-se diferentes condições de cultura. Cerca de $1,3 \times 10^4$ células MDA-MB-231 foram colocadas a aderir durante 24 h em meio RPMI completo (Poço1) e meio HAM-F10 completo (Poço 4), ao qual se adicionaram, posteriormente, cerca de 5×10^4 macrófagos peritoneais de rato. Por outro lado, plaqueram-se primeiramente macrófagos peritoneais de rato, que aderiram durante 4 h em meio RPMI completo (Poço 3) e em meio HAM-F10 completo (Poço 6), ao qual se adicionaram posteriormente células MDA-MB-231. Foi também preparada uma suspensão celular mista que foi plaqueada simultaneamente em meio RPMI completo (Poço 2) e meio HAM-F10 completo (Poço 5). A viabilidade celular foi avaliada macroscopicamente (a) e quantitativamente pelo ensaio de MTT. Os resultados foram expressos em termos de média \pm SEM, $n=1$, *One-way ANOVA*. Este ensaio foi preliminar, de modo a avaliar quais as melhores condições para a co-cultura celular.

Resultados

Tendo-se avaliado qual a melhor forma de preparar a cultura celular, procedeu-se à avaliação do efeito citotóxico de diferentes formulações perante a co-cultura celular. Utilizaram-se duas doses diferentes das formulações SLN-Ptx, SLN-PtxPEG e Paclitaxel livre, tendo-se incubado as células MDA-MB-231 e macrófagos individualmente, que foram consideradas controlo negativo. O efeito entre as diversas formulações não apresentou diferenças significativas entre as duas doses testadas, quer para as situações controlo quer para a co-cultura. No entanto, no controlo das células tumorais, tal como já tinha sido mostrado anteriormente, as formulações induziram uma redução significativa da viabilidade celular, quer para a dose de 4,17 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,01$) quer para a dose de 8,33 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,001$), comparativamente ao fármaco livre. Este efeito foi também observado na co-cultura para a dose máxima ($p < 0,01$). A variância mais proeminente é ao nível do Paclitaxel livre que, tanto para o controlo dos macrófagos como para a co-cultura, potenciou uma redução significativa da viabilidade celular ($p < 0,001$), comparativamente à dose de Paclitaxel (4,17 $\mu\text{g/ml}$), usada no controlo das células MDA-MB-231 (Fig. 29). Estes resultados permitiriam concluir que pudesse haver um potenciamento do efeito citotóxico por parte do fármaco livre perante as células tumorais quando na presença dos macrófagos, no entanto, devido à presença de um aglomerado de células não-viáveis nos poços de cultura (dados macroscópicos) foi possível concluir que a morte celular tivesse sido causada por falta de área de aderência da suspensão celular (estas experiências foram realizadas em caixas de 48 poços, contrariamente ao protocolo anterior). Estes resultados não permitiram tirar qualquer conclusão assertiva acerca do papel das células imunitárias, na presença do tratamento oncológico, pelo que a experiência deverá ser repetida para condições de cultura que permitam uma aderência e crescimento celular eficiente, onde somente o fármaco e as NP's serão o factor que contribui para a morte celular.

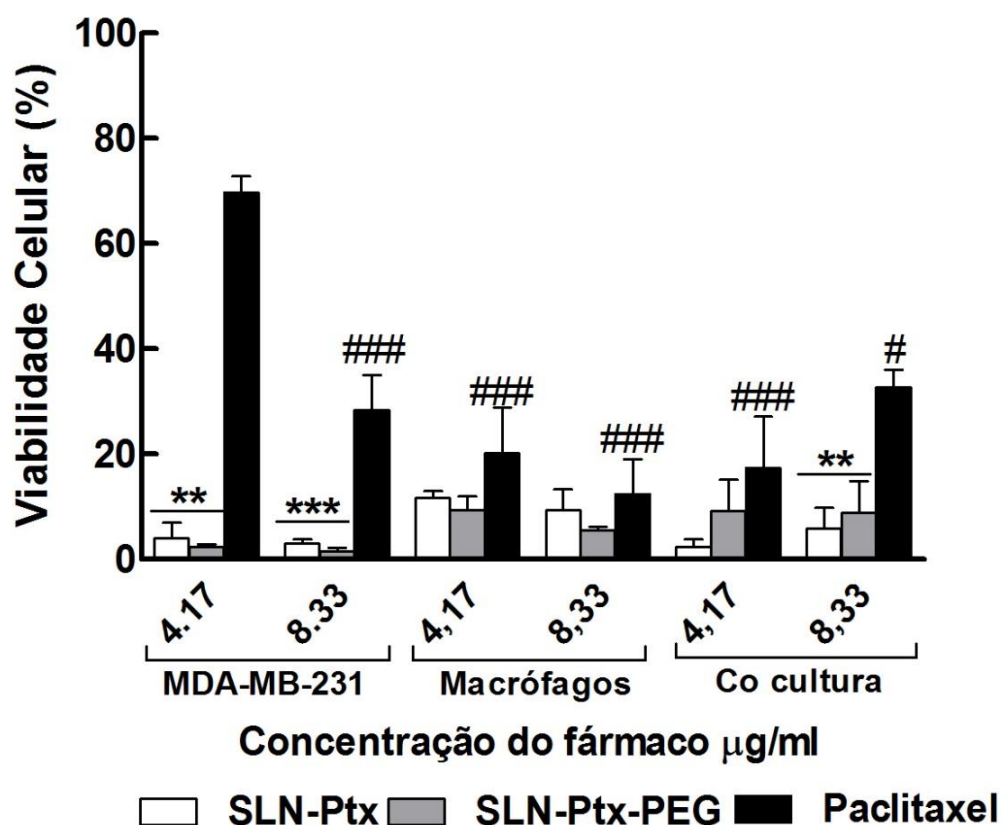


Figura 29. Viabilidade das células MDA-MB-231, macrófagos peritoneais de rato e de uma co-cultura de ambas as células, após tratamento com as formulações SLN-Ptx e SLN-Ptx-PEG (4,17 e 8,33 $\mu\text{g/ml}$), durante 48 h. Usou-se como controlo positivo a solução comercial de Paclitaxel livre (4,17 e 8,33 $\mu\text{g/ml}$), tendo-se incubado as células com esta solução para o mesmo período de tempo. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT, usando-se células não-tratadas como controlo negativo, para cada condição independente. Os resultados foram expressos como média \pm SEM, $n=3$, *Two-way ANOVA*. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, comparativamente ao Paclitaxel da mesma dose e grupo; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$, comparativamente ao Paclitaxel (4,17 $\mu\text{g/mL}$) de MDA-MB-231.

5. Estudos *in vivo*: avaliação do desenvolvimento tumoral

Os estudos *in vitro* são importantes para uma análise inicial e de previsão do possível efeito terapêutico de novos transportadores farmacológicos, no entanto, por mais completos que estes ensaios sejam, falham sempre na mimetização de todas as barreiras e interações biológicas e celulares, encontrada pelo transportados qualquer que seja a via de administração. Os modelos animais, principalmente ratinhos da estirpe Balb/C, são modelos reprodutíveis, fiáveis e de manutenção fácil, cuja manipulação experimental permite tirar conclusões assertivas acerca do potencial farmacológico de novas terapias oncológicas. Como já foi mencionado, neste trabalho elaborou-se, numa fase inicial, o desenvolvimento de tumores ectópicos subcutâneos de MDA-MB-231 em ratinhos da estirpe Balb/C e Balb/C nude (cujo sistema imunitário se encontra comprometido).

Os seis ratinhos da primeira estirpe foram injectados subcutaneamente no dorso direito com cerca de 5×10^6 células (cerca de mais 2 milhões de células do que nos ratinhos atímicos), e foram monitorizados em termos de peso e desenvolvimento tumoral nas semanas que sucederam a inoculação. Cerca de uma/duas semanas depois, observaram-se pequenas saliências na zona da inoculação, o que à primeira vista indicaria o início do desenvolvimento tumoral. Este facto não era esperado, dado que estes animais não possuem sistema imunitário comprometido, pelo que se esperava que as células tumorais fossem disseminadas. Isto realmente veio a comprovar-se, pois a protuberância observada era apenas uma reacção inflamatória local, sendo que os animais se mantiveram saudáveis com peso estável, até ao dia do sacrifício. Os pulmões e os gânglios axilares foram recolhidos para posterior análise histológica (ainda não efectuada) e o local da inoculação apresentava formação de zonas de fibrose, indicadora de uma forte reacção inflamatória (dados não apresentados).

Por outro lado, cerca de 3 milhões de células foram inoculadas subcutaneamente no dorso direito destes animais e o seu peso e o crescimento tumoral foram monitorizados de forma rotineira. Cerca de 16 dias após a injeção das células MDA-MB-231, os 6 ratinhos apresentavam nódulos ou saliências no local da inoculação. Estas protuberâncias foram crescendo de forma lenta, mantendo um volume médio de cerca de 100 mm^3 , até ao dia 30 (Fig. 30A). O peso dos animais foi também monitorizado, tendo-se observado que neste período de 16 dias, houve uma oscilação de peso entre os vários ratinhos, possível indicador de reacções inflamatórias (Fig. 30B). Ao fim de 30 dias, apenas o ratinho 2 continuou a mostrar de forma visível e palpável um tumor subcutâneo, cujo volume foi medido até ao sacrifício do animal, cerca de 100 dias após a inoculação. Este tumor apresentou um volume final de cerca de 7 cm^3 e uma neovascularização local evidente (Fig. 30C). O peso deste ratinho manteve-se acima das 24g até ao fim da experiência, indicador de que o animal se encontrava saudável e sem sinais de morbilidade (Fig. 30B).

O animal foi então sacrificado, recolhendo-se novamente os pulmões, gânglios axilares e o tumor subcutâneo para posterior análise histológica.

Os ratinhos 1, 3 e 4, apresentaram uma redução drástica do seu peso cerca de 60 dias após a inoculação e apesar dos seus tumores cutâneos não serem visíveis, estes sintomas eram indicativos de um desenvolvimento tumoral interno (Fig. 30B). Por impossibilidade de iniciar a experiência terapêutica por falta de volume de formulações, estes animais foram sacrificados, pois já se apresentavam com aspecto mórbido e um peso abaixo das 16g. Os seus pulmões foram recolhidos, apresentando uma morfologia macroscópica heterogénea de cor acastanhada e pouco volumosos (como que colapsados), comparativamente a pulmões de ratinhos normais (dados não apresentados). Estes factores podem ser indicadores da presença de metastizações pulmonares, algo bastante comum para as células de adenocarcinoma de mama que foram inoculadas. Tal como para os restantes animais, também os gânglios linfáticos e os nódulos internos junto ao local da inoculação foram recolhidos para posterior análise histológica. Os ratinhos 3 e 4, apresentaram ainda uma pequena

Resultados

protuberância sólida interna, na zona da inoculação, indicativo de que o pequeno tumor externo que se desenvolveu inicialmente, pode ter permanecido no local. Todos os animais apresentavam uma vascularização mais desenvolvida desde da zona de inoculação, por todo o flanco direito do animal. Por fim, eventualmente sacrificaram-se os ratinhos 5 e 6, cujo peso se manteve normalizado e os animais com aspecto saudável. Os tecidos e órgãos mencionados foram novamente recolhidos, havendo uma menor diferenciação celular do que nos animais anteriores, pelo que macroscopicamente não foi possível aferir a presença de metastizações. Posteriormente, serão necessárias análises histológicas que permitam tirar conclusões acerca do tipo de células presentes nos tecidos e confirmar a presença de metástases pulmonares. Estas diferenças, o desenvolvimento de tumores locais e a disseminação tumoral podem ter sido devidas ao local atingido pela injeção da suspensão celular, havendo a entrada de células directamente na corrente sanguínea ou linfática ao invés de permanecer num local dérmico.

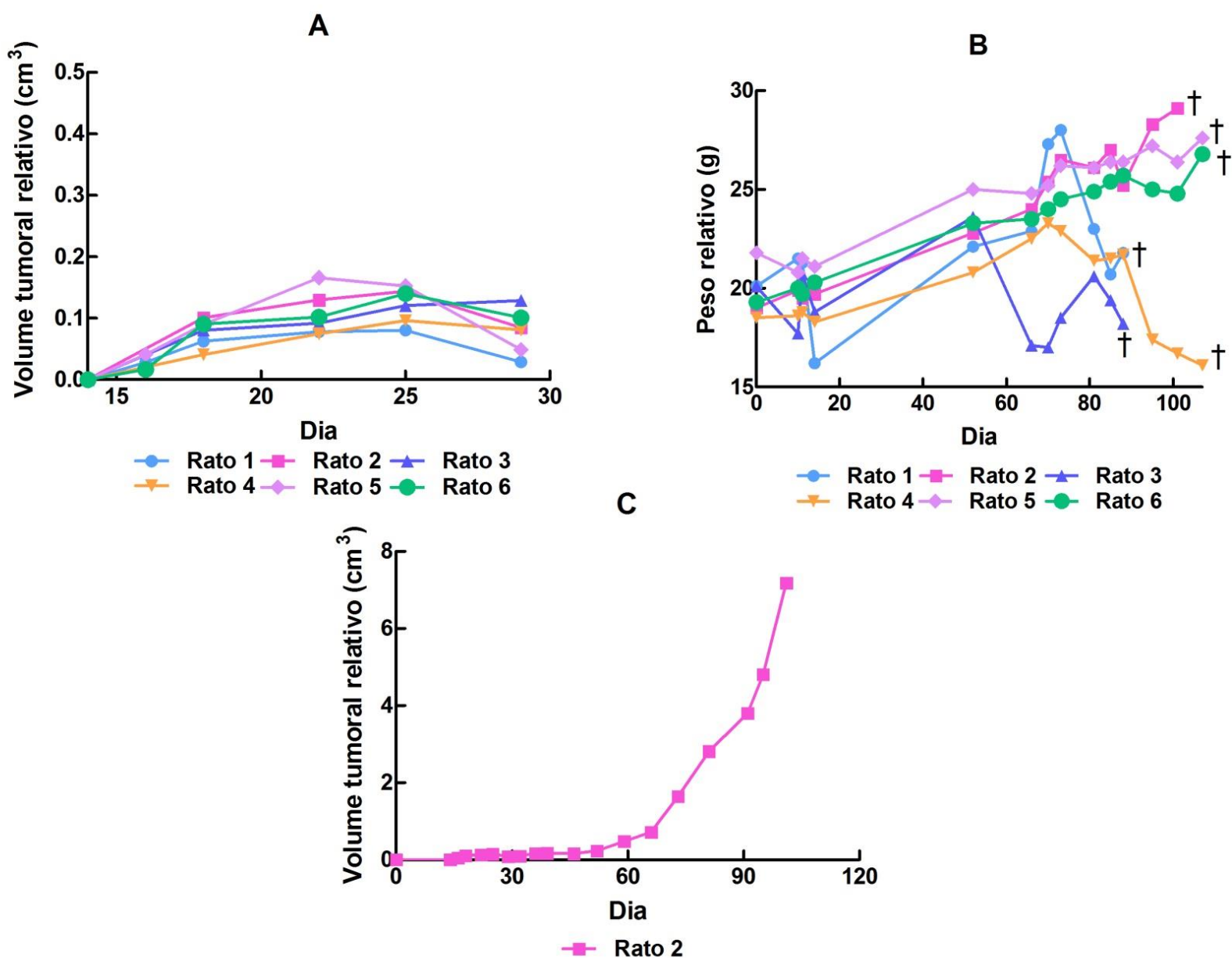


Figura 21. Monitorização do desenvolvimento de tumores subcutâneos num modelo animal atímico Balb/C nude. O volume tumoral foi avaliado de forma qualitativa, após injeção subcutânea de 3×10^6 células MDA-MB-231, no flanco/coxa direito de seis ratinhos, durante cerca de 12 semanas. Todos os animais desenvolveram pequenas protuberâncias macroscópicas, no entanto estas deixaram de ser visíveis após 30 dias, indicando a possível formação de metastizações internas (A). Os ratinhos foram também monitorizados de forma rotineira em termos de peso (para o mesmo período de tempo), sendo este importante para correlacionar o possível desenvolvimento de tumores internos (B). Somente o rato 2 manteve um tumor subcutâneo macroscopicamente visível e palpável, tendo sido destacado em relação aos restantes animais (C). † indica a morte espontânea ou sacrifício dos respectivos animais. Os resultados apresentados são preliminares, não havendo animais suficientes para a criação de grupos de estudo, sendo somente uma tentativa de iniciação e optimização de um protocolo de modelo animal ectópico.

DISCUSSÃO

O desenvolvimento de novos transportadores farmacológicos é uma área emergente dos últimos anos, apresentando muitos casos de sucesso a nível de ensaio pré-clínicos e clínicos, havendo alguns já aprovados e comercializados. As partículas produzidas a partir de lípidos sólidos têm-se destacado devido ao grande número de vantagens como a biocompatibilidade, baixo custo de produção e reprodutibilidade e, ainda, à maior eficácia de internalização e protecção do fármaco encapsulado [Mehnert, *et al.* 2001b]. Recentemente, também as micelas poliméricas produzidas a partir de copolímeros anfífilos se têm revelado vantajosas, quer quando utilizadas como cosurfactantes quer individualmente. Estes polímeros de nome Pluronic[®], são essencialmente conhecidos pela sua capacidade de sensibilizar a membrana de células tumorais e alterar diversos mecanismos intracelulares envolvidos na resistência a fármacos e ainda mecanismos de morte celular programada [Kabanov, *et al.* 2002]. Neste trabalho, desenvolveram-se diferentes nanopartículas cuja principal diferença se colocava exactamente na constituição base da sua matriz. Como em qualquer experiência que envolva novos DDS, é extremamente importante, numa fase inicial, caracterizar estas partículas, de modo a antever qual o seu possível efeito biológico. As propriedades como as dimensões e a carga de superfície de nanopartículas são factores chave para o modo como estas são internalizadas pela célula, como se comportam perante as barreiras biológicas existentes e, conseqüentemente, influenciam todo o seu efeito terapêutico.

As formulações desenvolvidas basearam-se em NP's de base lipídica sólida (SLN), às quais se adicionou PEG (SLN-PEG) ou que foram posteriormente modificadas com Poloxamer 188 (Pluronic[®] F68) (SLN-Polox 68). Estas são as formulações base, adicionando-se também a micela polimérica simples (Polox 68), todas sem direccionamento biológico. Existiu ainda uma última formulação à qual se adicionou o anticorpo anti-VEGF Bevacizumab (Polox 68-Beva e SLN-Polox 68-Beva). As primeiras NP's, constituídas por lípidos sólidos, provieram de um trabalho anterior já desenvolvido pelo grupo da Prof^a Doutora Mafalda Videira, encontrando-se já optimizadas e caracterizadas e tendo apresentado valores de dm pelos 100 nm e uma carga potencial de cerca de -2 mv. Segundo a literatura, este é o tamanho ideal para qualquer partícula utilizada no campo da Farmacologia, de modo a tirar o máximo partido das vias de internalização celular e, ainda, escapar ao reconhecimento pelo sistema fagocitário. O método de produção utilizado é essencial na determinação das propriedades intrínsecas da partícula, sendo, no caso das SLN, a homogeneização a alta pressão, o método que permite uma menor dispersão em termos de dm das partículas, reduzindo o tamanho das partículas e homogeneizando a preparação de forma eficiente. No entanto, este método envolve vários passos, como a determinação da quantidade/percentagem de lípidos usados na preparação das nanopartículas, a escolha do surfactante (que permite reduzir a tensão superficial e facilitar a partição das partículas) e, ainda, as características físicas do sonicador, tais como a velocidade de rotação e a temperatura de fusão dos lípidos usados [Mehnert, *et al.* 2001a; Muller, *et al.* 2000; Wissing, *et al.* 2004]. Todos estes factores contribuem para uma ampla variação das características das partículas formadas e para a sua estabilidade a longo prazo. O método utilizado para a produção das SLN baseou-se numa homogeneização a alta pressão, que foi optimizado pela Prof^a Doutora Mafalda Videira no âmbito do seu projecto de doutoramento, tendo-se obtido as partículas com as características já descritas anteriormente [Videira 2008]. Concluiu-se, ainda, que a adição do polímero hidrofílico PEG não alterou de forma significativa as propriedades físicas do sistema, podendo este tornar-se vantajoso relativamente à NP lipídica simples, por aumentar o seu tempo de circulação [Kaul, *et al.* 2002; Owens, *et al.* 2006; Yang, *et al.* 2007].

Decidiu-se testar ainda as SLN modificadas com outro tipo de polímeros e ver também qual o comportamento da micelização espontânea dos polímeros da família dos poloxâmeros. Todas estas formulações foram produzidas por um método de evaporação de clorofórmio, seguido da reidratação com diferentes soluções, para a formação do filme lipídico final. O Polox 68 foi então reidratado com soluções contendo Tween 80 (0,5%), PBS (pH=7,4), uma solução de SLN e SLN-Beva. O aspecto macroscópico destas soluções foi variável: as soluções contendo Tween 80, PBS e SLN apresentaram

um aspecto translúcido, enquanto a solução que continha o anticorpo tinha um aspecto turvo. Isto pode dever-se à presença do anticorpo que não é mais do que uma proteína, o que acaba por conferir alguma densidade à solução final. Todas estas soluções foram caracterizadas em termos de carga de superfície e diâmetro médio, tendo-se obtido os valores finais representados no Tabela 2. As formulações de SLN-Polox 68 e SLN-Polox 68-Beva não apresentaram diferenças significativas entre si, tendo um tamanho e carga de superfície semelhante aos obtidos para as partículas de base lipídica simples e com PEG. Este facto pode ser justificado de acordo com dados da literatura, em que os poloxâmeros são muito utilizados como cosurfactantes que adsorvem à superfície de matrizes lipídicas (devido às suas características anfifílicas), estabilizando as partículas e conferindo uma maior homogeneização do sistema [Xiao, *et al.* 2011; Yan, *et al.* 2010]. Seria de esperar que o anticorpo, sendo uma proteína com elevado peso molecular, pudesse destabilizar o sistema, no entanto, como não houve alteração das suas propriedades, foi possível concluir que esta se conseguiu ligar de forma eficiente pela extremidade Fc, ao grupo polimérico superficial. Ocorreu uma reestruturação da partícula, o que permitiu acomodar a ligação do anticorpo [Kocbek, *et al.* 2007]. Isto pode ser vantajoso, na medida em que se mantiveram as propriedades biológicas das formulações simples, permitindo uma comparação eficaz em termos de modificação de superfície e direccionamento biológico. As principais diferenças notaram-se ao nível da produção das micelas poliméricas simples (Polox 68), que se reidrataram quer com um surfactante comum (Tween 80) quer com tampão fosfato. Ora, seria de prever que houvesse diferenças, quer entre estas duas situações, quer ao nível destas micelas, comparativamente às formulações já discutidas neste trabalho. Este facto foi confirmado: as micelas poliméricas simples apresentaram alterações significativas ao nível do diâmetro médio (cerca de 250 nm, com um índice de polidispersão $> 0,4$) e houve um ligeiro aumento da sua carga de superfície final. Estas diferenças deveram-se essencialmente ao tipo de reidratação que foi feita: no caso de se utilizar um surfactante não-iónico ocorreu uma redução da tensão superficial, o que facilitou quer a partição de partículas para tamanhos nanométricos quer a sua estabilização (não houve variação significativa da carga de superfície) [Mehnert, *et al.* 2001a]. Desta forma, o Tween 80, apesar de gerar partículas de tamanho superior às SLN - com um índice de polidispersão que indica fraca homogeneização do sistema e existência de aglomerados poliméricos de diferentes tamanhos - não provocou diferenças tão proeminentes como no caso da solução de PBS. A solução tampão gerou partículas de elevado diâmetro médio e com um índice de polidispersão inaceitável ($> 0,7$). Os dados obtidos após medição do diâmetro, não apresentados neste trabalho, indicavam a existência de vários picos, reveladores da existência de uma população heterogénea de micelas de diferentes tamanhos. Tudo isto pode dever-se ao rácio existente entre Poli (óxido de etileno) e Poli (óxido de propileno) no polímero final, que medeiam a micelização e a estabilidade da micela. O Polox F68 é bastante hidrofílico, apresentando uma proporção maior de polietileno, conferindo, teoricamente, um valor de CMC (concentração micelar crítica) mais elevado, o que contribui para uma menor estabilidade e capacidade de micelização espontânea por parte do polímero. Deste modo, haverá ligações inespecíficas entre os unímeros da solução e formação de aglomerados supermoleculares [Goppert, *et al.* 2005; Sezgin, *et al.* 2006; Torchilin 2001]. Concluiu-se, então, que o método usado na produção destas partículas necessita de ser optimizado, quer a nível de sonicação quer a nível da quantidade de polímero usado e tipo de surfactante. Uma das características mais importantes na produção de micelas poliméricas, já referido para o polímero escolhido, é o valor de CMC. Até à data este valor não foi definido para estas partículas (para este método de produção particular), sendo bastante importante para antever a concentração polimérica necessária para promover uma micelização eficiente, reduzindo-se a probabilidade de agregação e aumentando a estabilidade geral do sistema, principalmente em ambiente biológico onde, após diluição infinita, estas se poderiam destabilizar em unímeros (principal limitação das micelas poliméricas) [Torchilin 2001; Wei, *et al.* 2009]. Em suma, as formulações contendo SLN têm propriedades concordantes com as experiências descritas na literatura, apresentando um tamanho ideal como transportadores farmacológicos. O potencial *Zeta* define, teoricamente, que quanto mais elevado for (± 30 mv) menor seria a agregação das

partículas, mas é necessário ter em conta o objectivo do trabalho e a aplicação das partículas, bem como analisar o efeito geral do tamanho *vs* carga de superfície. Apesar de uma carga de superfície elevada estar associada a uma maior estabilidade, de modo a diminuir a opsonização e, conseqüentemente, prolongar o tempo de circulação, é necessário manter uma carga de superfície perto do valor nulo, resultados conseguidos para as formulações produzidas [How, *et al.* 2011; Wissing, *et al.* 2004].

O principal objectivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade e o possível efeito terapêutico das várias formulações desenvolvidas, com vista a uma aplicação prática para o tratamento de cancro da mama avançado e metastático. Tendo em conta que uma das primeiras barreiras biológicas e linha celular que entra em contacto com as partículas são as células do sistema reticuloendotelial, ou seja, os macrófagos, procedeu-se à avaliação da biocompatibilidade destes componentes para este tipo de células. Pela observação da Fig. 18 observou-se que, de um modo geral, as formulações se comportaram de forma semelhante, sendo a toxicidade significativamente superior para as doses mais elevadas de 25 e 50 μ l e, conseqüentemente, há uma redução da viabilidade celular com o aumento do tempo de exposição. Os macrófagos são células especializadas na fagocitose de partículas estranhas ao organismo, sendo estas internalizadas e degradadas ao nível de lisosomas secundários. O que se pode concluir a partir dos dados obtidos é que a toxicidade derivada das altas doses de nanopartículas pode não ter estado associada ao material em si (considerando que teoricamente tanto os lípidos constituintes das SLN como os polímeros anfífilicos são matérias certificados como não-tóxicos e biocompatíveis), mas sim a uma saturação do sistema fagocitário e lise dos lisosomas [Ahsan, *et al.* 2002; Castelli, *et al.* 2005; Müller, *et al.* 1996; Scholer, *et al.* 2001]. As imagens obtidas por microscopia óptica de contraste confirmaram a hipótese anterior, estas células estavam sobrelotadas de NP's no seu interior e o resultado que mais se destacou foi a alteração morfológica que ocorreu nos macrófagos, após tratamento com as partículas que continham o anticorpo de superfície. Os macrófagos passaram de uma morfologia arredondada para uma com pseudópodes alongados, o que é indicativo de uma activação celular por parte da ligação do anticorpo à superfície destas células [Ferrara, *et al.* 2004; Salvador, *et al.* 2008]. Tendo em conta os valores de IC50, obtidos numa fase posterior deste trabalho, foi possível concluir que a dose aplicável se deverá essencialmente ao efeito farmacológico do Paclitaxel e não à toxicidade por parte dos sistemas transportadores.

A toxicidade foi também averiguada para a linha celular de adenocarcinoma de mama e há estudos que indicaram que as matrizes das nanopartículas (principalmente Poloxâmeros) acabam por ser ligeiramente mais tóxicas para células normais do que para células tumorais [Wei, *et al.* 2009]. Neste trabalho obtiveram-se resultados semelhantes aos obtidos para os macrófagos em termos de comportamento dose/tempo. Para doses mais elevadas a toxicidade foi significativamente superior ($p < 0,001$) e este facto tornou-se mais proeminente para tempos de exposição maiores (72 h). Todavia, ao contrário dos macrófagos em que a viabilidade se manteve à volta dos 80% para as doses mais baixas, no caso das células tumorais as formulações contribuíram para uma proliferação celular em cerca de 50%. Sabe-se que os lípidos utilizados na produção de SLN's são ácidos gordos biocompatíveis, que podem ser metabolizados pelas células para obter energia, este facto poderá ter contribuído para uma indução da proliferação celular, após internalização das partículas [Castelli, *et al.* 2005; Wissing, *et al.* 2004]. Em relação ao polímero anfífilico, há evidências de que para doses baixas, devido à capacidade de sensibilização membranar e alteração da sua fluidez, este pode interagir com a membrana das células tumorais, aumentando a sua permeabilidade para os nutrientes e factores existentes no meio de cultura, promovendo o seu crescimento. Estes polímeros são, inclusivamente, usados como suplementos em meios de cultura celulares [Bentley, *et al.* 1989; Kabanov, *et al.* 2002; Melik-Nubarov, *et al.* 1999]. Em contrapartida, para doses muito elevadas a toxicidade destas partículas torna-se evidente, algo que pode ser causado por uma intensificação do metabolismo celular que, por acidificação excessiva do meio, poderá levar à morte celular. Este facto pode correlacionar-se, por exemplo, com as observações mostradas na Fig. 20: a formulação que exerce maior toxicidade e de uma forma mais rápida (menores períodos de incubação) é a SLN-Polox 68. Estas

partículas tinham uma constituição mista, havendo um efeito duplo por parte quer dos lípidos quer do polímero. Houve, assim, um aumento do metabolismo basal das células, possível saturação lisosomal e uma maior redução da viabilidade celular. No caso das formulações que contêm o Polox 68, a morte celular para doses elevadas de NP's pode também ter estado relacionada com o facto de haver alteração de mecanismos intracelulares associados, por exemplo, à produção de ATP, indução de apoptose celular e inibição de mecanismos de destoxificação celular [Batrakova, *et al.* 2008; Zhang, *et al.* 2011b]. Por fim, é necessário destacar o Polox 68 que, contrariamente à formulação anterior, foi a que exerceu um efeito tóxico mais tardio. Isto pode dever-se à existência de uma heterogeneidade micelar da solução e, devido ao maior tamanho das partículas, que estas tenham mais dificuldade em entrar nas células, havendo apenas efeito por parte de alguns unímeros que possam existir na solução.

A avaliação do efeito terapêutico destas formulações foi efectuada usando uma linha celular de adenocarcinoma de mama, tendo capacidade metastática com disseminação preferencial para o pulmão. Os ensaios realizados tiveram como objectivo averiguar qual o IC50 de cada dose, para diferentes períodos de exposição e comparar os valores obtidos com a solução de Paclitaxel livre. Este fármaco foi escolhido por ser uma terapia oncológica usada como primeira linha de escolha para terapêutica de cancro da mama em estágio avançado, tendo a sua solução comercial um sem número de efeitos secundários. Tornou-se então necessário, nos últimos anos, procurar forma de minimizar estes efeitos, aumentando, no entanto, o potencial terapêutico deste fármaco antimitótico [Danhier, *et al.* 2009; Wei, *et al.* 2009]. Estudos anteriores mostraram que mais do que a dose utilizada, o tempo de exposição das células ao Paclitaxel é determinante para o seu efeito terapêutico. Assim, somente células proliferativas, em fase G2/M, são capazes de responder de forma eficaz a esta molécula. Os resultados obtidos neste trabalho estão em concordância com este facto, tendo o Paclitaxel reduzido apenas de forma significativa a viabilidade celular (< 50%) a partir das 24 h de incubação (Fig. 21F) [Liebmann, *et al.* 1993; Nakayama, *et al.* 2009; Zhang, *et al.* 2011b].

As restantes formulações foram diluídas de forma apropriada, de modo a poder-se observar o efeito terapêutico, durante o mesmo período de tempo que para o fármaco livre. De uma forma geral, uma vez mais, doses mais elevadas e períodos mais longos resultaram numa redução mais acentuada da viabilidade celular. Todavia, existiram variâncias significativas entre as diversas formulações. Para períodos curtos a formulação contendo Bevacizumab teve algum efeito na redução da viabilidade (principalmente para doses mais baixas), talvez devido à ligação de alguns receptores VEGF na superfície celular. No entanto, o seu efeito manteve-se praticamente inalterado para qualquer uma das doses testadas, ao longo do tempo. Este resultado pode não mimetizar correctamente o efeito *in vivo* obtido pelo direccionamento biológico, conferido por esta molécula. Estudos anteriores mostraram que o efeito notório deste agente antiangiogénico se dá *in vivo*, tendo mostrado algum sucesso na inibição tumoral de modelos animais, pois liga-se essencialmente a receptores VEGF existentes na superfície de células endoteliais. Apesar do padrão de expressão de mRNA *in situ* para estes receptores ser elevado em células de adenocarcinoma, este efeito poderá não ser observável *in vitro*, uma vez que não ocorre desenvolvimento endotelial e há somente uma pequena expressão de VEGF solúvel [Salvador, *et al.* 2008; Wissing, *et al.* 2004]. Às 8 h as formulações que mais se destacaram foram as de SLN-Ptx e SLN-Ptx-Polox 68, com características físico-químicas semelhantes, como já foi mencionado anteriormente. Estas partículas parecem ter sido internalizadas de forma eficaz pela célula. No entanto, devido ao ligeiro atraso na redução da viabilidade celular, que só voltou a tornar-se significativa às 48 e 72 h, parece haver influência no modo ou perfil de libertação do fármaco por parte destas partículas, que é feito de uma forma mais gradual entre as 8 e as 48h. Isto pode dever-se quer a um atraso na degradação das partículas por parte do Polox 68 - pois já foi mostrado que estes polímeros têm a capacidade de atrasar a degradação de matrizes lipídicas [Olbrich, *et al.* 1999] - quer (para doses mais elevadas) a um efeito tóxico das próprias matrizes constituintes das nanopartículas. No entanto, não se coloca de parte a possível quimo sensibilização dos poloxâmeros e o seu efeito adjuvante com o Paclitaxel

[Zhang, *et al.* 2010]. Por fim, a formulação que mais se destacou a nível de potencial terapêutico foi SLN-Ptx-PEG. Estas partículas só mostraram uma redução significativa ($p < 0,001$) para qualquer uma das doses testadas a partir das 24 h, indicando um atraso na sua internalização, mas um efeito terapêutico iminente mal esta se encontre no citoplasma da célula [Owens, *et al.* 2006; Yang, *et al.* 2007]. Estes resultados foram posteriormente confirmados pelo cálculo do IC50, concluindo-se mais uma vez que as NP's apresentaram uma eficácia terapêutica comparativamente ao fármaco livre, funcionando como transportadores promissores em termos de entrega de Paclitaxel. Todavia, apesar do IC50 ser significativamente inferior, comparativamente ao Paclitaxel, para todas as formulações excepto SLN-Ptx ($3,64 \pm 0,56 \mu\text{g/ml}$), a única cujo valor de IC50 diminuiu de forma significativa com o tempo foi SLN-Ptx-PEG. Esta formulação obteve uma dose terapêutica de 5 ng/ml, cerca de 800 vezes inferior ao valor obtido para o Paclitaxel às 72 h ($4,09 \pm 0,74 \mu\text{g/ml}$). Estes resultados correlacionam-se com diversos estudos anteriores que afirmam a importância da nanotecnologia no aumento da biodisponibilidade e farmacocinética de terapias oncológicas clássicas [Fonseca, *et al.* 2002; Mandal, *et al.* 2009; Yoncheva, *et al.* 2012; Zhang, *et al.* 2013]. Em suma, a SLN-Ptx-PEG aparentou ser a melhor formulação, com elevado potencial terapêutico, comparativamente ao Paclitaxel livre.

Para complementar os resultados anteriores, procedeu-se à avaliação da internalização das NP's. Segundo dados prévios, a via de entrada de transportadores com um tamanho médio de 100 nm é a via endocítica, mediada por claterina. Este é o caso, quer para as micelas poliméricas (na forma polimerizada ou unimérica) quer para as NP's de lípidos sólidos [Martins, *et al.* 2012; Sahay, *et al.* 2010; Sahay, *et al.* 2008]. Procedeu-se ao estudo da eficiência de internalização para as formulações de SLN-Ptx e SLN-Ptx-PEG, bem como dos seus equivalentes vazios, pois neste ponto do trabalho averiguou-se que a formulação pegilada seria aquela com maior efeito terapêutico. O seguimento intracelular destas partículas foi conseguido através da marcação das nanopartículas com uma sonda lipofílica, DiL, e através da marcação nuclear das células MDA-MB-231 com Hoechst. Tal como já tinha sido mostrado anteriormente, há uma dependência temporal e de dose relacionada com a internalização das partículas, que pode ser quantificada e avaliada pela quantidade de fluorescência emitida pelas partículas [Danhier, *et al.* 2009; Panyam, *et al.* 2002]. Pela observação das imagens obtidas por microscopia confocal foi possível concluir que todas as partículas se encontravam dispersas pelo citoplasma da célula 30 min após a incubação, aumentando esta fluorescência até às 2h. As formulações SLN-DiL e SLN-Ptx-DiL apresentaram um padrão semelhante, com uma elevada fluorescência e co-localização nuclear para ½ h, tendo os núcleos uma morfologia normal, comparativamente ao controlo. Por outro lado, SLN-PEG-DiL e SLN-Ptx-DiL, também apresentaram um padrão semelhante entre si, mas distinguiram-se das formulações anteriores por provocarem segmentação e fragmentação nuclear, indicativo de um estágio avançado de apoptose, posteriormente confirmado por citometria de fluxo [Danhier, *et al.* 2009; Kaul, *et al.* 2002]. A quantificação de fluorescência avaliada para 2 e 4 h, com diferentes doses de nanopartículas, indicou que existe um aumento da internalização e, conseqüente, fluorescência para 100 μL , às 2 h. Todavia, para a mesma dose e um período de 4 h, ocorreu uma redução significativa da fluorescência de todas as partículas, o que pode ser explicado pela presença de um elevado número de partículas, podendo ter provocado uma saturação dos transportadores vesiculares associados à via endocítica. Há assim uma dependência em termos de tempo e quantidade de partículas presentes [Ahsan, *et al.* 2002; Castelli, *et al.* 2005; Müller, *et al.* 1996; Scholer, *et al.* 2001; Wei, *et al.* 2012]. Estes resultados estão também correlacionados com os obtidos por microscopia confocal, indicando uma entrada mais rápida por parte das SLN e SLN-Ptx, relativamente às formulações pegiladas que, de uma forma geral, apresentam sempre uma fluorescência relativa significativamente inferior.

A percentagem de apoptose avaliada por citometria de fluxo foi um ensaio preliminar para tentar confirmar as diferenças observadas nos resultados obtidos anteriormente. Segundo a literatura, o PEG é um derivado dos polímeros anfifílicos designados de Poloxâmeros, podendo também modificar determinadas funções intracelulares, havendo indícios

de indução de apoptose por este polímero (mecanismo ainda desconhecido) [Goppert, *et al.* 2005; Roy, *et al.* 2001; Zhang, *et al.* 2011a]. Dado o número reduzido de formulações nesta fase do trabalho, este ensaio foi efectuado usando a dose correspondente ao IC50 das NP's de base lipídica simples e pegiladas às 24 h. Os resultados obtidos permitiram concluir que de facto, o PEG, juntamente com o Paclitaxel, poderá estar envolvido em mecanismos de indução de apoptose (segmentação e fragmentação nuclear), sendo esta percentagem significativamente mais elevada do que o controlo. Assim, esta partícula parece ter um impedimento estéreo inicial devido à elevada hidrofília e peso molecular do polietileno glicol [Kocbek, *et al.* 2007; Yang, *et al.* 2007]. No entanto, estando num espaço intracelular, parece libertar o fármaco de forma rápida, numa fase inicial, mantendo o seu efeito terapêutico gradual a partir desse ponto. Seria importante averiguar qual o perfil de libertação do fármaco encapsulado por esta nanopartícula, aferindo-se assim o seu comportamento como transportador farmacológico a longo prazo.

Em qualquer trabalho de desenvolvimento de nanopartículas é necessário tentar antever o seu efeito sobre a linha celular que corresponde à futura aplicação terapêutica do sistema. No entanto, a actividade *in vitro* raramente se correlaciona de forma directa com o comportamento biológico dos transportadores. Assim, de forma a complementar os resultados obtidos, procedeu-se à avaliação do efeito terapêutico das formulações perante uma co-cultura de macrófagos e células tumorais e, ainda, ao desenvolvimento de um modelo animal ectópico para dar início a estudos preliminares *in vivo*. São poucos os estudos realizados até à data envolvendo co-culturas de macrófagos com determinadas linhas celulares, no entanto, está mais do que descrito que estas células imunitárias são altamente infiltrativas nestes tecidos malignos, podendo alterar o seu comportamento de acordo com o microambiente existente. São assim conhecidas por terem uma dupla função em que, consoante o estado de activação M1 ou M2 - descrito na parte introdutória deste trabalho - podem disseminar células tumorais ou auxiliar na sua proliferação [Chen, *et al.* 2005; Hagemann, *et al.* 2004; Lewis, *et al.* 2006]. Os estudos realizados baseiam-se sempre numa co-cultura separada fisicamente, em que são utilizadas caixas de cultura onde existem dois compartimentos separados por uma membrana porosa (*Transwells*), no entanto, neste trabalho pretendeu-se tentar perceber quais as diferenças terapêuticas perante uma cultura mista com macrófagos e células MDA-MB-231, plaqueadas directamente, em simultâneo [Al-Hallak, *et al.* 2010; Ding, *et al.* 2012; Yang, *et al.* 2011]. Primeiramente testaram-se várias condições de cultura diferentes em que as células foram plaqueadas em conjunto ou de uma forma faseada, tendo-se concluído que a maior viabilidade celular foi obtida para o meio de cultura RPMI completo quando a suspensão mista foi plaqueada em simultâneo. Tal pode ter sido devido somente a uma questão de área de adesão celular, sendo que ao colocar a suspensão mista no poço de cultura ambos os tipos celulares têm a mesma área disponível, aumentando-se a probabilidade de cada tipo de célula aderir de forma eficiente. Contrariamente, nos casos em que se colocaram primeiro as células tumorais ou os macrófagos peritoneais, ao colocar o outro tipo de célula horas depois da adesão das primeiras queira haver uma maior competição das células já aderentes, contribuindo para uma menor viabilidade celular. Estando as condições de cultura definidas, procedeu-se à avaliação do efeito terapêutico de algumas formulações de nanopartículas sobre esta cultura celular mista. No entanto, é necessário ter em conta que a cultura de células foi efectuada em caixas de 48 poços, o que poderá ter comprometido de algum modo os resultados obtidos. Pela observação da Fig. 27, foi possível concluir, tal como para os restantes ensaios de citotoxicidade, que as doses mais altas, quer das NP's quer do Paclitaxel livre, são responsáveis por uma elevada redução da viabilidade celular (nas células individuais) e no caso da linha celular tumoral o efeito terapêutico das NP's foi significativamente maior, comparativamente ao fármaco livre. As diferenças observadas entre os efeitos provocados pelo fármaco livre e pelos sistemas transportadores ao nível das células *vs* macrófagos, pode dever-se ao tipo de mecanismo de internalização (endocitose e fagocitose, respectivamente), ao facto de terem sido plaqueados cerca de 5× mais macrófagos para o mesmo volume final (no caso da menor eficiência por parte das nanopartículas) e, ainda, um maior efeito do fármaco livre, talvez por uma maior difusão deste através da membrana dos macrófagos, que podem ter

funcionando como reservatórios do fármaco activo, libertando-o para o meio envolvente [Hauptmann, *et al.* 1993; Soma, *et al.* 2000]. Estas células foram tomadas como controlo, sendo o efeito relevante para este estudo aquele provocado na co-cultura. Os resultados obtidos não foram conclusivos, pois, apesar da toxicidade mediada pelo fármaco livre ter sido significativa em relação à dose de 4,17 µg/ml, usada no controlo de células tumorais, este efeito não foi exclusivo para a co-cultura. Estudos anteriores destacaram uma possível toxicidade secundária mediada por macrófagos após a sua activação por nanopartículas, tendo estes a capacidade de libertar o fármaco encapsulado por exocitose para o espaço intratumoral, funcionando como células anti-tumorais [Al-Hallak, *et al.* 2010; Soma, *et al.* 1999; Yang, *et al.* 2011]. Este efeito não foi reproduzível neste estudo e, tendo em conta o aparecimento de aglomerados celulares nos poços de cultura, a toxicidade pode dever-se somente a uma menor área de adesão, bem como a um pequeno volume total do poço, e indução de morte pelo elevado número de células encontradas em suspensão (dados não apresentados). Em suma, estes ensaios deverão ser repetidos para frascos de cultura com maior área volumétrica, podendo também experimentar-se, numa primeira fase, os protocolos descritos na literatura baseados numa separação física das células.

Os ratinhos *nude* são amplamente usados como modelos animais para terapia oncológica, tendo sido a escolha para um desenvolvimento preliminar de um modelo *in vivo* ectópico de cancro de adenocarcinoma de mama. Muitos estudos indicaram as várias diferenças obtidas na eficácia do desenvolvimento tumoral, que depende de factores tais como o local de injeção, o número de células inoculadas, a agressividade e as próprias características da linha celular e, ainda, no caso de carcinomas dependentes de hormonas, da presença ou ausência de suplementos hormonais [Fleming, *et al.* 2010; Price, *et al.* 1990]. É aceite que o modelo ortotópico, após injeção na gordura da mama, será o mais reproduzível e de crescimento mais rápido, no entanto a monitorização é mais difícil e a própria injeção tem de ser acompanhada de um pequeno procedimento cirúrgico. No entanto, este parece ser o melhor modelo para o adenocarcinoma de mama sólido, tendo ainda alguma capacidade metastática ao nível dos gânglios linfáticos e pulmão. Por outro lado, uma injeção na veia da cauda, apesar de ainda gerar alguma controvérsia em termos de sucesso de obtenção de tumores, revelou alguma eficácia na formação de micrometástases pulmonares. O modelo subcutâneo é bastante simples de executar e reproduzível, sendo facilmente monitorizado macroscopicamente e por palpação, tendo-se revelado capaz de formar tumores sólidos de tamanho aceitável, com possibilidade de ocorrência de metastização dos locais próximos e ainda a nível pulmonar. Este trabalho correlaciona-se com os dados da literatura, tendo-se desenvolvido um modelo baseado na injeção subcutânea de células MDA-MB-231. Obteve-se um sucesso de 3/6 ratinhos em termos de desenvolvimento de tumores sólidos visíveis (internos ou externos), no entanto os restantes parecem ter desenvolvido, a longo prazo, metastizações pulmonares agressivas, comprovadas pela rápida perda de peso e aspecto depauperado dos animais. Os tumores atingiram volumes macroscopicamente palpáveis após duas semanas da inoculação, o que está de acordo com a literatura [Iorns, *et al.* 2012; Tester, *et al.* 2004]. No entanto, apenas um manteve o seu crescimento visível e mensurável externamente e os restantes proliferaram de forma interna. O modo como a injeção foi efectuada poderá ter influenciado a entrada de células ao nível endotelial (via linfática), causando uma maior taxa de metastização, comparativamente a tumores sólidos. Todavia, apesar de numa fase preliminar ser interessante iniciar o efeito terapêutico intraperitoneal, seguindo-se macroscopicamente a variação do volume tumoral sólido, numa fase posterior poderá também ser importante estudar a capacidade de metastização pulmonar, demonstrada por esta linha celular. Isto porque as formulações lipídicas de maior sucesso neste trabalho têm características linfotrópicas, tendo mostrado sucesso na disseminação de micrometástases pulmonares e de mama, ao nível do sistema linfático [Torchilin 2001; Videira 2008].

CONCLUSÕES

A Nanotecnologia é uma área emergente com perspectivas promissoras em termos de optimização e melhoramento de terapias oncológicas existentes. Com este trabalho concluiu-se que a caracterização completa das partículas formuladas é o primeiro passo para tentar antever o seu sucesso terapêutico. É necessário formular partículas cujas dimensões e carga permitam não só um encapsulamento eficiente do fármaco em questão, mas também tenham a capacidade de se manter em circulação tempo suficiente para que o transportador possa chegar ao alvo e seja por ele internalizado. As NP's formuladas neste trabalho apresentaram, em termos gerais, características compatíveis com uma boa actividade biológica, principalmente aquelas produzidas a partir de lípidos sólidos, algo que se poderá dever à anterior optimização do seu processo de fabrico. Em contrapartida, as micelas poliméricas são intensamente descritas na literatura como potenciais transportadores farmacológicos, no entanto, individualmente e neste trabalho não se mostraram tão eficazes como quando conjugadas com o sistema lipídico. De um modo geral, as partículas mostraram um efeito terapêutico eficaz, facto concluído a partir dos valores de IC50 obtidos, que foram significativamente inferiores para quase todas as formulações, comparativamente ao Paclitaxel livre.

SLN-Ptx-PEG mostrou ser a melhor formulação obtida, apresentando uma elevada capacidade de internalização celular, aliada a um possível potenciamento da indução da apoptose pelo próprio polímero constituinte, havendo um efeito terapêutico adjuvante. Este facto, juntamente com a constante associação do Polietileno glicol para aumentar a biodistribuição de transportadores farmacológicos, poderá indiciar um sucesso desta NP em termos de actividade biológica *in vivo*. Em suma, as partículas desenvolvidas neste trabalho e a avaliação da sua eficácia terapêutica confirmaram os dados da literatura, relativamente à potencialidade de novos sistemas farmacológicos, sendo um processo relativamente barato e rápido, em termos de optimização de terapias oncológicas clássicas, descartando-se o processo moroso que constitui o desenvolvimento de novos fármacos. Todavia, esta área apresenta ainda muitas limitações e o estudo e caracterização completa de novas partículas é um processo demorado, mas obrigatório para se produzir o dito transportador ideal. Apesar do elevado investimento nesta área nos últimos 10 anos, a verdade é que são poucos os transportadores que passaram às fases pré-clínica e clínica, havendo ainda muita reticência por parte dos organismos reguladores na aprovação e comercialização de muitos destes sistemas. É necessário constituir grupos científicos multidisciplinares que permitam uma completa caracterização de NP's, a avaliação da sua segurança clínica e da sua capacidade terapêutica perante diferentes linhas celulares e, ainda, em modelos biológicos mais reprodutíveis.

Futuramente, pretende-se tentar superar as lacunas deste trabalho no que diz respeito ao conhecimento e caracterização físico-química das partículas. Em termos de dimensões e carga parece haver concordância entre estas propriedades e uma actividade biológica eficaz, no entanto é necessário perceber o modo como o fármaco é encapsulado e qual o seu perfil de libertação ao longo do tempo. Uma simples técnica de diálise, aliada uma quantificação por HPLC, permitiria avaliar estas propriedades, confirmando-se ou não a possível libertação controlada de Paclitaxel por parte destes transportadores. Seria importante incidir sobre a optimização das micelas poliméricas, testando-se diferentes técnicas de produção ou alterando as condições utilizadas na técnica de evaporação do solvente. Tanto o surfactante como as condições de sonicação e temperatura, além da quantidade de polímero usado, são factores que alteram os parâmetros físico-químicos destas partículas.

Para complementar os estudos de toxicidade, seria importante avaliar a activação do sistema complemento e percentagem de hemólise induzida pelas partículas vazias e, ainda, efectuar estudos de biodistribuição de modo a antever a localização das partículas no ambiente biológico. Por fim, mais do que uma avaliação *in vitro*, é cada vez mais notória a importância de avaliar efeitos terapêuticos em diferentes condições celulares e fisiológicas. Neste trabalho, iniciaram-se estudos de citotoxicidade sobre uma co-cultura, no entanto, apesar dos resultados indicarem um possível efeito citotóxico

secundário dos macrófagos quando incubados com a linha celular cancerígena e as respectivas NP's, foi clara a necessidade de otimizar este protocolo, usando-se condições que permitam uma boa aderência celular e volume de meio. Este problema técnico poderá ser ultrapassado utilizando-se caixas de cultura com maior área de aderência, ou, alternativamente frascos de cultura. Este tipo de ensaios são uma forma complementar para avaliar o comportamento das partículas num ambiente em que a comunicação e mobilidade de diferentes células estão presentes, avaliando-se não só o seu comportamento perante diferentes estruturas celulares, mas também a capacidade de ultrapassar diferentes barreiras biológicas. Deste modo, é fácil concluir que é mais seguro passar-se para estudos em modelos animais, tendo-se já um *background* completo e complementar em termos de eficácia terapêutica.

Dado as características linfotrópicas dos lípidos utilizados na produção destas partículas, a sua utilização para a disseminação de micrometástases pulmonares poderá ser um aspecto importante a estudar. Mais do que avaliar o efeito terapêutico sobre a uma linha celular de adenocarcinoma de mama, seria interessante repetir este protocolo para uma linha celular de carcinoma de pulmão, tentando antever qual o potencial terapêutico destes transportadores para diferentes tipos celulares.

Em conclusão, este trabalho foi mais um complemento para os imensos estudos já existentes ao nível do desenvolvimento de novos transportadores farmacológicos, mostrando a capacidade terapêutica promissora das SLN e algum efeito potenciado quando estas são associadas a polímeros hidrofílicos. Mais do que uma inibição ou disseminação tumoral eficaz, é necessário investir em terapias que prolonguem o tempo de sobrevivência e a qualidade de vida dos doentes oncológicos, estabelecendo-se um maior leque de opções em termos terapêuticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasalipourkabar, R.; Salehzadeh, A. and Abdullah, R. (2010). Antitumor activity of tamoxifen loaded solid lipid nanoparticles on induced mammary tumor gland in Sprague-Dawley rats. *Afr J Biotech.* 9 (43): 7337-7345.
- Adams, M.L.; Lavasanifar, A. and Kwon, G.S. (2003). Amphiphilic block copolymers for drug delivery. *J Pharm Sci.* 92 (7): 1343-1355.
- Aggarwal, P.; Hall, J.B.; McLeland, C.B.; Dobrovolskaia, M.A. and McNeil, S.E. (2009). Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev.* 61 (6): 428-437.
- Ahsan, F.; Rivas, I.P.; Khan, M.A. and Torres Suarez, A.I. (2002). Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers--liposomes and microspheres--on the phagocytosis by macrophages. *J Control Release.* 79 (1-3): 29-40.
- Al-Hajj, M.; Wicha, M.S.; Benito-Hernandez, A.; Morrison, S.J. and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100 (7): 3983-3988.
- Al-Hallak, K.M.; Azarmi, S.; Anwar-Mohamed, A.; Roa, W.H. and Lobenberg, R. (2010). Secondary cytotoxicity mediated by alveolar macrophages: a contribution to the total efficacy of nanoparticles in lung cancer therapy? *Eur J Pharm Biopharm.* 76 (1): 112-119.
- Alakhov, V.; Moskaleva, E.; Batrakova, E.V. and Kabanov, A.V. (1996). Hypersensitization of multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by pluronic P85 block copolymer. *Bioconjug Chem.* 7 (2): 209-216.
- Alexis, F.; Rhee, J.W.; Richie, J.P.; Radovic-Moreno, A.F.; Langer, R. and Farokhzad, O.C. (2008). New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. *Urol Oncol.* 26 (1): 74-85.
- Almouazen, E.; Bourgeois, S.; Boussaid, A.; Valot, P.; Malleval, C.; Fessi, H.; Nataf, S. and Briancon, S. (2012). Development of a nanoparticle-based system for the delivery of retinoic acid into macrophages. *Int J Pharm.* 430 (1-2): 207-215.
- Amos, L.A. (2004). Microtubule structure and its stabilisation. *Org Biomol Chem.* 2 (15): 2153-2160.
- Amos, L.A. (2000). Focusing-in on microtubules. *Curr Opin Struct Biol.* 10 (2): 236-241.
- Bader, H.; Ringsdorf, H. and Schmidt, B. (1984). Watersoluble polymers in medicine. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie.* 123 (1): 457-485.
- Barenholz, Y. (2012). Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release.* 160 (2): 117-134.
- Batrakova, E.; Li, S.; Miller, D. and Kabanov, A. (1999). Pluronic P85 Increases Permeability of a Broad Spectrum of Drugs in Polarized BBMEC and Caco-2 Cell Monolayers. *Pharmaceut Res.* 16 (9): 1366-1372.
- Batrakova, E.V. and Kabanov, A.V. (2008). Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J Control Release.* 130 (2): 98-106.
- Bentley, K.P.; Gates, R.M.C.; Lowe, K.C.; Pomerai, D.I. and Walker, L.J.A. (1989). In vitro cellular responses to a non-ionic surfactant, Pluronic F-68. *Biotechnol Lett.* 11 (2): 111-114.
- Berne, B.J. and Pecora, R. *Dynamic Light Scattering.* In: Pecora R, ed. New York: Plenum Press; 1976.
- Biosciences, B. Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerser™ System. 2011.
- Borst, P.; Evers, R.; Kool, M. and Wijnholds, J. (2000). A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst.* 92 (16): 1295-1302.
- Brannon-Peppas, L. and Blanchette, J.O. (2004). Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 56 (11): 1649-1659.
- Byrne, J.D.; Betancourt, T. and Brannon-Peppas, L. (2008). Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 60 (15): 1615-1626.

- Cailleau, R.; Olivé, M. and Cruciger, Q.J. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: Preliminary characterization. *In Vitro*. 14 (11): 911-915.
- Cailleau, R.; Young, R.; Olivé, M. and Reeves, W.J. (1974). Breast Tumor Cell Lines From Pleural Effusions. *J Natl Cancer Inst*. 53 (3): 661-674.
- Castelli, F.; Puglia, C.; Sarpietro, M.G.; Rizza, L. and Bonina, F. (2005). Characterization of indomethacin-loaded lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry. *Int J Pharm*. 304 (1-2): 231-238.
- Chabner, B.A. and Roberts, T.G., Jr. (2005). Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer*. 5 (1): 65-72.
- Chari, R.V.J. (2007). Targeted Cancer Therapy: Conferring Specificity to Cytotoxic Drugs. *Acc Chem Res*. 41 (1): 98-107.
- Chen, D.B.; Yang, T.Z.; Lu, W.L. and Zhang, Q. (2001). In vitro and in vivo study of two types of long-circulating solid lipid nanoparticles containing paclitaxel. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 49 (11): 1444-1447.
- Chen, H.; Kim, S.; Li, L.; Wang, S.; Park, K. and Cheng, J.-X. (2008). Release of hydrophobic molecules from polymer micelles into cell membranes revealed by Förster resonance energy transfer imaging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105 (18): 6596-6601.
- Chen, J.J.; Lin, Y.C.; Yao, P.L.; Yuan, A.; Chen, H.Y.; Shun, C.T.; Tsai, M.F.; Chen, C.H. and Yang, P.C. (2005). Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression. *J Clin Oncol*. 23 (5): 953-964.
- Chen, J.Q. and Russo, J. (2009). ERalpha-negative and triple negative breast cancer: molecular features and potential therapeutic approaches. *Biochim Biophys Acta*. 1796 (2): 162-175.
- Cho, H.; Cheong, I.; Lee, J. and Kim, J. (2010). Polymeric nanoparticles, micelles and polymersomes from amphiphilic block copolymer. *Korean J Chem Eng*. 27 (3): 731-740.
- Cho, K.; Wang, X.; Nie, S.; Chen, Z.G. and Shin, D.M. (2008). Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res*. 14 (5): 1310-1316.
- Cline, E.N.; Li, M.H.; Choi, S.K.; Herbstman, J.F.; Kaul, N.; Meyhofer, E.; Skiniotis, G.; Baker, J.R.; Larson, R.G. and Walter, N.G. (2013). Paclitaxel-Conjugated PAMAM Dendrimers Adversely Affect Microtubule Structure through Two Independent Modes of Action. *Biomacromolecules*. 14 (3): 654-664.
- Coder, D.M. Assessment of Cell Viability. *Current Protocols in Cytometry*: John Wiley & Sons, Inc.; 2001.
- Cooper, G.M. The Cell: A Molecular Approach. In: Associates SMS, ed. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition ed; 2000.
- Danhier, F.; Feron, O. and Preat, V. (2010). To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J Control Release*. 148 (2): 135-146.
- Danhier, F.; Lecouturier, N.; Vroman, B.; Jerome, C.; Marchand-Brynaert, J.; Feron, O. and Preat, V. (2009). Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation. *J Control Release*. 133 (1): 11-17.
- Ding, J.; Jin, W.; Chen, C.; Shao, Z. and Wu, J. (2012). Tumor Associated Macrophage × Cancer Cell Hybrids May Acquire Cancer Stem Cell Properties in Breast Cancer. *PLoS ONE*. 7 (7): e41942.
- Dobrovolskaia, M.A.; Aggarwal, P.; Hall, J.B. and McNeil, S.E. (2008). Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Mol Pharm*. 5 (4): 487-495.
- Dong-Le Bourhis, X.; Berthois, Y.; Millot, G.; Degeorges, A.; Sylvi, M.; Martin, P.M. and Calvo, F. (1997). Effect of stromal and epithelial cells derived from normal and tumorous breast tissue on the proliferation of human breast cancer cell lines in co-culture. *Int J Cancer*. 71 (1): 42-48.
- Dubey, A.; Prabhu, P. and Kamath, J.V. (2012). Nano Structured lipid carriers :A Novel Topical drug delivery system. *Int J Pharm Tech Res*. 4 (2): 705-714.

- Dunn, S.E.; Coombes, A.G.A.; Garnett, M.C.; Davis, S.S.; Davies, M.C. and Illum, L. (1997). In vitro cell interaction and in vivo biodistribution of poly(lactide-co-glycolide) nanospheres surface modified by poloxamer and poloxamine copolymers. *J Control Release*. 4 (1): 65-76.
- Estrella, V.; Chen, T.; Lloyd, M.; Wojtkowiak, J.; Cornell, H.H.; Ibrahim-Hashim, A.; Bailey, K.; Balagurunathan, Y.; Rothberg, J.M.; Sloane, B.F.; Johnson, J.; Gatenby, R.A. and Gillies, R.J. (2013). Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Res*. 73 (5): 1524-1535.
- Etheridge, M.L.; Campbell, S.A.; Erdman, A.G.; Haynes, C.L.; Wolf, S.M. and McCullough, J. (2013). The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine*. 9 (1): 1-14.
- Fadeel, B. and Garcia-Bennett, A.E. (2010). Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 62 (3): 362-374.
- Farrell, D.; Ptak, K.; Panaro, N.J. and Grodzinski, P. (2011). Nanotechnology - based cancer therapeutics--promise and challenge--lessons learned through the NCI Alliance for Nanotechnology in Cancer. *Pharm Res*. 28 (2): 273-278.
- Farrell, S. and Hesketh, R.P. (2002). An introduction to drug delivery for chemical engineers. *Chem Eng Educat*. 36 (3): 198-203.
- Feng, S.-S. and Chien, S. (2003). Chemotherapeutic engineering: Application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. *Chem Eng Sci*. 58 (18): 4087-4114.
- Ferlay, J.; Shin, H.R.; Bray, F.; Forman, D.; Mathers, C. and Parkin, D.M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 127 (12): 2893-2917.
- Fernandez, Y.; Cueva, J.; Palomo, A.G.; Ramos, M.; de Juan, A.; Calvo, L.; Garcia-Mata, J.; Garcia-Teijido, P.; Pelaez, I. and Garcia-Estevez, L. (2010). Novel therapeutic approaches to the treatment of metastatic breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 36 (1): 33-42.
- Feron, O. (2009). Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiother Oncol*. 92 (3): 329-333.
- Ferrara, N.; Hillan, K.J.; Gerber, H.-P. and Novotny, W. (2004). Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 3 (5): 391-400.
- Fleming, J.M.; Miller, T.C.; Meyer, M.J.; Ginsburg, E. and Vonderhaar, B.K. (2010). Local regulation of human breast xenograft models. *J Cell Physiol*. 224 (3): 795-806.
- Fonseca, C.; Simoes, S. and Gaspar, R. (2002). Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *J Control Release*. 83 (2): 273-286.
- Fraker, L.D.; Halter, S.A. and Forbes, J.T. (1984). Growth inhibition by retinol of a human breast carcinoma cell line in vitro and in athymic mice. *Cancer Res*. 44 (12 Pt 1): 5757-5763.
- Garrec, D.; Ranger, M. and Leroux, J.-C. (2004). Micelles in anticancer drug delivery. *Am J Drug Deliv*. 2 (1): 15-42.
- Gaucher, G.; Dufresne, M.H.; Sant, V.P.; Kang, N.; Maysinger, D. and Leroux, J.C. (2005). Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *J Control Release*. 109 (1-3): 169-188.
- Geiser, M. (2010). Update on macrophage clearance of inhaled micro- and nanoparticles. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 23 (4): 207-217.
- Gerber, H.P. and Ferrara, N. (2005). Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res*. 65 (3): 671-680.
- Göpferich, A. (1996). Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*. 17 (2): 103-114.
- Goppert, T.M. and Muller, R.H. (2005). Protein adsorption patterns on poloxamer- and poloxamine-stabilized solid lipid nanoparticles (SLN). *Eur J Pharm Biopharm*. 60 (3): 361-372.

- Gu, F.X.; Karnik, R.; Wang, A.Z.; Alexis, F.; Levy-Nissenbaum, E.; Hong, S.; Langer, R.S. and Farokhzad, O.C. (2007). Targeted nanoparticles for cancer therapy. *Nano Today*. 2 (3): 14-21.
- Hagemann, T.; Robinson, S.C.; Schulz, M.; Trumper, L.; Balkwill, F.R. and Binder, C. (2004). Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis*. 25 (8): 1543-1549.
- Haley, B. and Frenkel, E. (2008). Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urol Oncol*. 26 (1): 57-64.
- Hans, M.L. and Lowman, A.M. (2002). Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *J Control Release*. 6 (4): 319-327.
- Hauptmann, S.; Zwadlo-Klarwasser, G.; Jansen, M.; Klosterhalfen, B. and Kirkpatrick, C.J. (1993). Macrophages and multicellular tumor spheroids in co-culture: a three-dimensional model to study tumor-host interactions. Evidence for macrophage-mediated tumor cell proliferation and migration. *Am J Pathol*. 143 (5): 1406-1415.
- How, C.W.; Abdullah, R. and Abbasalipourkibir, R. (2011). Physicochemical properties of nanostructured lipid carriers as colloidal carrier system stabilized with polysorbate 20 and polysorbate 80. *Afr J Biotechnol*. 10 (9): 1684-1689.
- Hu, C.M. and Zhang, L. (2012). Nanoparticle-based combination therapy toward overcoming drug resistance in cancer. *Biochem Pharmacol*. 83 (8): 1104-1111.
- Hughes, G.A. (2005). Nanostructure-mediated drug delivery. *Nanomedicine*. 1 (1): 22-30.
- Inoue, T.; Chen, G.; Nakamae, K. and Hoffman, A.S. (1998). An AB block copolymer of oligo(methyl methacrylate) and poly(acrylic acid) for micellar delivery of hydrophobic drugs. *J Control Release*. 51 (2-3): 221-229.
- Iorns, E.; Drews-Elger, K.; Ward, T.M.; Dean, S.; Clarke, J.; Berry, D.; Ashry, D.E. and Lippman, M. (2012). A New Mouse Model for the Study of Human Breast Cancer Metastasis. *PLoS ONE*. 7 (10): e47995.
- Johnston, S.R. (2011). The role of chemotherapy and targeted agents in patients with metastatic breast cancer. *Eur J Cancer*. 47 Suppl 3: S38-47.
- Jones, C.F. and Grainger, D.W. (2009). In vitro assessments of nanomaterial toxicity. *Adv Drug Deliv Rev*. 61 (6): 438-456.
- Jones, M. and Leroux, J. (1999). Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers. *Eur J Pharm Biopharm*. 48 (2): 101-111.
- Jordan, M.A. and Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*. 4 (4): 253-265.
- Kabanov, A.V.; Batrakova, E.V. and Alakhov, V.Y. (2002). Pluronic block copolymers for overcoming drug resistance in cancer. *Adv Drug Deliv Rev*. 54 (5): 759-779.
- Katz, E.; Dubois-Marshall, S.; Sims, A.H.; Gautier, P.; Caldwell, H.; Meehan, R.R. and Harrison, D.J. (2011). An In Vitro Model That Recapitulates the Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) in Human Breast Cancer. *PLoS ONE*. 6 (2): e17083.
- Kaul, G. and Amiji, M. (2002). Long-Circulating Poly(Ethylene Glycol)-Modified Gelatin Nanoparticles for Intracellular Delivery. *Pharmaceut Res*. 19 (7): 1061-1067.
- Kayser, O.; Lemke, A. and Hernandez-Trejo, N. (2005). The impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems. *Curr Pharm Biotechnol*. 6 (1): 3-5.
- Kazunori, K.; Glenn S, K.; Masayuki, Y.; Teruo, O. and Yasuhisa, S. (1993). Block copolymer micelles as vehicles for drug delivery. *J Control Release*. 24 (1-3): 119-132.
- Kedar, U.; Phutane, P.; Shidhaye, S. and Kadam, V. (2010). Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting. *Nanomedicine*. 6 (6): 714-729.
- Kim, S.A.; Kim, H.W.; Kim, D.K.; Kim, S.G.; Park, J.C.; Kang, D.W.; Kim, S.W.; Ahn, S.G. and Yoon, J.H. (2006). Rapid

- induction of malignant tumor in Sprague-Dawley rats by injection of RK3E-ras cells. *Cancer Lett.* 235 (1): 53-59.
- Kocbek, P.; Obermajer, N.; Cegnar, M.; Kos, J. and Kristl, J. (2007). Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. *J Control Release.* 120 (1-2): 18-26.
- Kozlowski, J.M.; Fidler, I.J.; Campbell, D.; Xu, Z.L.; Kaighn, M.E. and Hart, I.R. (1984). Metastatic behavior of human tumor cell lines grown in the nude mouse. *Cancer Res.* 44 (8): 3522-3529.
- Kreuter, J. (2007). Nanoparticles - a historical perspective. *Internat J Pharm.* 331 (1): 1-10.
- Kwon, G.S. and Okano, T. (1996). Polymeric micelles as new drug carriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 21 (2): 107-116.
- Lacroix, M. and Leclercq, G. (2004). Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat.* 83 (3): 249-289.
- Lamagna, C.; Aurrand-Lions, M. and Imhof, B.A. (2006). Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. *J Leukoc Biol.* 80 (4): 705-713.
- Lanone, S.; Rogerieux, F.; Geys, J.; Dupont, A.; Maillot-Marechal, E.; Boczkowski, J.; Lacroix, G. and Hoet, P. (2009). Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Part Fibre Toxicol.* 6: 14.
- Leek, R.D. and Harris, A.L. (2002). Tumor-associated macrophages in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 7 (2): 177-189.
- Letchford, K. and Burt, H. (2007). A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur J Pharm Biopharm.* 65 (3): 259-269.
- Lewis, C.E. and Pollard, J.W. (2006). Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments. *Cancer Res.* 66 (2): 605-612.
- Liebmann, J.E.; Cook, J.A.; Lipschultz, C.; Teague, D.; Fisher, J. and Mitchell, J.B. (1993). Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol) in human tumour cell lines. *Br J Cancer.* 68 (6): 1104-1109.
- Liu, Z.; Liu, D.; Wang, L.; Zhang, J. and Zhang, N. (2011). Docetaxel-loaded pluronic p123 polymeric micelles: in vitro and in vivo evaluation. *Int J Mol Sci.* 12 (3): 1684-1696.
- Lux, M.P.; Fasching, P.A. and Beckmann, M.W. (2006). Hereditary breast and ovarian cancer: review and future perspectives. *J Mol Med (Berl).* 84 (1): 16-28.
- Ma, G. and Song, C. (2007). PCL/poloxamer 188 blend microsphere for paclitaxel delivery: Influence of poloxamer 188 on morphology and drug release. *J Appl Polym Sci.* 104 (3): 1895-1899.
- Ma, J. and Jemal, A. Breast Cancer Statistics. In: Ahmad A, ed. *Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance*: Springer New York; 2013:1-18.
- Malik, S.; Cusidó, R.M.; Mirjalili, M.H.; Moyano, E.; Palazón, J. and Bonfill, M. (2011). Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A review. *Process Biochemi.* 46 (1): 23-34.
- Mandal, B.B. and Kundu, S.C. (2009). Self-assembled silk sericin/poloxamer nanoparticles as nanocarriers of hydrophobic and hydrophilic drugs for targeted delivery. *Nanotechnology.* 20 (35): 355101.
- Martins, S.; Costa-Lima, S.; Carneiro, T.; Cordeiro-da-Silva, A.; Souto, E.B. and Ferreira, D.C. (2012). Solid lipid nanoparticles as intracellular drug transporters: an investigation of the uptake mechanism and pathway. *Int J Pharm.* 430 (1-2): 216-227.
- Martins, S.; Tho, I.; Ferreira, D.C.; Souto, E.B. and Brandl, M. (2011). Physicochemical properties of lipid nanoparticles: effect of lipid and surfactant composition. *Drug Dev Ind Pharm.* 37 (7): 815-824.
- Mauel, J. and Defendi, V. (1971). Infection and transformation of mouse peritoneal macrophages by simian virus 40. *J Exp*

- Med.* 134 (2): 335-350.
- Mehnert, W. and Mader, K. (2001a). Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 47 (2-3): 165-196.
- Mehnert, W. and Mäder, K. (2001b). Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 47 (2-3): 165-196.
- Melik-Nubarov, N.S.; Pomaz, O.O.; Dorodnych, T.; Badun, G.A.; Ksenofontov, A.L.; Schemchukova, O.B. and Arzhakov, S.A. (1999). Interaction of tumor and normal blood cells with ethylene oxide and propylene oxide block copolymers. *FEBS Lett.* 446 (1): 194-198.
- Miller, T.; Breyer, S.; van Colen, G.; Mier, W.; Haberkorn, U.; Geissler, S.; Voss, S.; Weigandt, M. and Goepferich, A. (2013). Premature drug release of polymeric micelles and its effects on tumor targeting. *Int J Pharm.* 445 (1-2): 117-124.
- Misra, R.; Acharya, S. and Sahoo, S.K. (2010). Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discov Today.* 15 (19-20): 842-850.
- Moghimi, S.M. and Hunter, A.C. (2000). Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. *Trends Biotechnol.* 18 (10): 412-420.
- Mohanraj, V.J., ; and Chen, Y. (2006). Nanoparticles – A Review *Trop J Pharm Res.* 5 (1): 561-573.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65 (1-2): 55-63.
- Mosqueira, V.C.; Legrand, P.; Gulik, A.; Bourdon, O.; Gref, R.; Labarre, D. and Barratt, G. (2001). Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. *Biomaterials.* 22 (22): 2967-2979.
- Mühlen, A.Z.; Schwarz, C. and Mehnert, W. (1998). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – Drug release and release mechanism. *Eur J Pharm Biopharm.* 45 (2): 149-155.
- Müller, R.H.; Maaßen, S.; Weyhers, H.; Specht, F. and Lucks, J.S. (1996). Cytotoxicity of magnetite-loaded polylactide, polylactide/glycolide particles and solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm.* 138 (1): 85-94.
- Muller, R.H.; Mader, K. and Gohla, S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm.* 50 (1): 161-177.
- Nakayama, S.; Torikoshi, Y.; Takahashi, T.; Yoshida, T.; Sudo, T.; Matsushima, T.; Kawasaki, Y.; Katayama, A.; Gohda, K.; Hortobagyi, G.N.; Noguchi, S.; Sakai, T.; Ishihara, H. and Ueno, N.T. (2009). Prediction of paclitaxel sensitivity by CDK1 and CDK2 activity in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 11 (1): R12.
- Nie, S.; Hsiao, W.L.; Pan, W. and Yang, Z. (2011). Thermoreversible Pluronic F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: in vitro drug release, cell cytotoxicity, and uptake studies. *Int J Nanomedicine.* 6: 151-166.
- Nishiyama, N. and Kataoka, K. (2006). Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery. *Pharmacol Ther.* 112 (3): 630-648.
- Ochekpe, N.A.; Olorunfemi, P.O. and Ngwuluka, N.C. (2009). Nanotechnology and Drug Delivery Part 1: Background and Applications. *Trop J Pharm Res.* 8 (3): 265-274.
- Olbrich, C. and Muller, R.H. (1999). Enzymatic degradation of SLN-effect of surfactant and surfactant mixtures. *Int J Pharm.* 180 (1): 31-39.
- Ono, M. (2008). Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. *Cancer Sci.* 99 (8): 1501-1506.
- Owens, D.E., 3rd and Peppas, N.A. (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles.

- Int J Pharm.* 307 (1): 93-102.
- Panyam, J. and Labhasetwar, V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliver Rev.* 55: 329-347.
- Panyam, J.; Zhou, W.Z.; Prabha, S.; Sahoo, S.K. and Labhasetwar, V. (2002). Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *FASEB J.* 16 (10): 1217-1226.
- Parveen, S.; Misra, R. and Sahoo, S.K. (2012). Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine.* 8 (2): 147-166.
- Peer, D.; Karp, J.M.; Hong, S.; Farokhzad, O.C.; Margalit, R. and Langer, R. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nano.* 2 (12): 751-760.
- Pozo-Guisado, E.; Alvarez-Barrientos, A.; Mulero-Navarro, S.; Santiago-Josefat, B. and Fernandez-Salguero, P.M. (2002). The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle. *Biochem Pharmacol.* 64 (9): 1375-1386.
- Price, J.E.; Polyzos, A.; Zhang, R.D. and Daniels, L.M. (1990). Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Res.* 50 (3): 717-721.
- Qureshi, S.R.; Sahni, Y.; Singh, S.K.; Dar, A.A.; Quadri, S.A. and Bhat, M.A. (2011). Application of Nanotechnology in Cancer Treatment. *J Pharma Res and Opin.* 1 (2).
- Rawat, M.; Singh, D. and Saraf, S. (2006). Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. *Biol Pharm Bull.* 29 (9): 1790-1798.
- Redhead, H.M.; Davis, S.S. and Illum, L. (2001). Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation. *J Control Release.* 70 (3): 353-363.
- Ross, J.S.; Schenkein, D.P.; Pietrusko, R.; Rolfe, M.; Linette, G.P.; Stec, J.; Stagliano, N.E.; Ginsburg, G.S.; Symmans, W.F.; Pusztai, L. and Hortobagyi, G.N. (2004). Targeted therapies for cancer 2004. *Am J Clin Pathol.* 122 (4): 598-609.
- Roy, H.K.; DiBaise, J.K.; Black, J.; Karolski, W.J.; Ratashak, A. and Ansari, S. (2001). Polyethylene glycol induces apoptosis in HT-29 cells: potential mechanism for chemoprevention of colon cancer. *FEBS Lett.* 496 (2-3): 143-146.
- Sahay, G.; Alakhova, D.Y. and Kabanov, A.V. (2010). Endocytosis of nanomedicines. *J Control Release.* 145 (3): 182-195.
- Sahay, G.; Batrakova, E.V. and Kabanov, A.V. (2008). Different internalization pathways of polymeric micelles and unimers and their effects on vesicular transport. *Bioconjug Chem.* 19 (10): 2023-2029.
- Sahoo, S.K. and Labhasetwar, V. (2003). Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discov Today.* 8 (24): 1112-1120.
- Sailaja, A.K.; Amareshwar, P. and Chakravarty, P. (2011). Formulation of solid lipid nanoparticles and their applications. *Curr Pharm Res.* 1 (2): 197-203.
- Saito, M.; Kobayashi, M.; Iwabuchi, S.; Morita, Y.; Takamura, Y. and Tamiya, E. (2004). DNA condensation monitoring after interaction with hoechst 33258 by atomic force microscopy and fluorescence spectroscopy. *J Biochem.* 136 (6): 813-823.
- Salvador, C.; Li, B.; Hansen, R.; Cramer, D.E.; Kong, M. and Yan, J. (2008). Yeast-derived beta-glucan augments the therapeutic efficacy mediated by anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody in human carcinoma xenograft models. *Clin Cancer Res.* 14 (4): 1239-1247.
- Santos, A.C. *Água trocável do pulmão: Contribuição para o Desenvolvimento de uma Metodologia para a sua Avaliação.* [Tese de Doutorado]. Coimbra: Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra; 2002.
- Santos, A.C.; Matos, C.; Brás, A.R.; Oliveiros, B.; Campos, E.; Alves, P.; Rasteiro, M.G. and Gil, M.H. (2008).

- Assesment of the cytotoxicity of microparticles for controlled drug release in Ophthalmology. *Exp Patholog Health Sci.* 2 (2): 33-37.
- Saxena, V. and Hussain, M.D. (2012). Poloxamer 407/TPGS mixed micelles for delivery of gambogic acid to breast and multidrug-resistant cancer. *Int J Nanomedicine.* 7: 713-721.
- Scholer, N.; Olbrich, C.; Tabatt, K.; Muller, R.H.; Hahn, H. and Liesenfeld, O. (2001). Surfactant, but not the size of solid lipid nanoparticles (SLN) influences viability and cytokine production of macrophages. *Int J Pharm.* 221 (1-2): 57-67.
- Schutz, C.A.; Juillerat-Jeanneret, L.; Mueller, H.; Lynch, I.; Riediker, M. and NanoImpactNet, C. (2013). Therapeutic nanoparticles in clinics and under clinical evaluation. *Nanomedicine (Lond).* 8 (3): 449-467.
- Scudiero, D.A.; Shoemaker, R.H.; Paull, K.D.; Monks, A.; Tierney, S.; Nofziger, T.H.; Currens, M.J.; Seniff, D. and Boyd, M.R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 48 (17): 4827-4833.
- Serpe, L. Conventional Chemotherapeutic Drug Nanoparticles for Cancer Treatment. *Nanotechnologies for the Life Sciences: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2007.*
- Sezgin, Z.; Yuksel, N. and Baykara, T. (2006). Preparation and characterization of polymeric micelles for solubilization of poorly soluble anticancer drugs. *Eur J Pharm Biopharm.* 64 (3): 261-268.
- Sharkey, F. and Fogh, J. (1984). Considerations in the use of nude mice for cancer research. *Cancer and Metastasis Reviews.* 3 (4): 341-360.
- Sharma, A. and Sharma, U.S. (1997). Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *Internat J Pharmaceut.* 154 (2): 123-140.
- Sharma, K.; Singh, V. and Arora, A. (2011). Natural biodegradable polymers as matrices in transdermal drug delivery. *Int J Drug Dev & Res.* 3 (2): 85-103.
- Shi, J.; Votruba, A.R.; Farokhzad, O.C. and Langer, R. (2010). Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. *Nano Lett.* 10 (9): 3223-3230.
- Shojaei, F. (2012). Anti-angiogenesis therapy in cancer: current challenges and future perspectives. *Cancer Lett.* 320 (2): 130-137.
- Singh, M.; Manikandan, S. and Kumaraguru, A.K. (2011). Nanoparticles: A New Tachnology with Wide Applications. *Res J Nanosci Nanotechnol.* 1 (1): 1-11.
- Sinha, R.; Kim, G.J.; Nie, S. and Shin, D.M. (2006). Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Mol Cancer Ther.* 5 (8): 1909-1917.
- Soga, O.; van Nostrum, C.F.; Fens, M.; Rijcken, C.J.F.; Schiffelers, R.M.; Storm, G. and Hennink, W.E. (2005). Thermosensitive and biodegradable polymeric micelles for paclitaxel delivery. *J Control Release.* 103 (2): 341-353.
- Soma, C.; Dubernet, C.; Barratt, G.; Nemati, F.; Appel, M.; Benita, S. and Couvreur, P. (1999). Ability of Doxorubicin-Loaded Nanoparticles to Overcome Multidrug Resistance of Tumor Cells After Their Capture by Macrophages. *Pharmaceut Res.* 16 (11): 1710-1716.
- Soma, C.E.; Dubernet, C.; Barratt, G.; Benita, S. and Couvreur, P. (2000). Investigation of the role of macrophages on the cytotoxicity of doxorubicin and doxorubicin-loaded nanoparticles on M5076 cells in vitro. *J Control Release.* 68 (2): 283-289.
- Span, L.F.; Pennings, A.H.; Vierwinden, G.; Boezeman, J.B.; Raymakers, R.A. and de Witte, T. (2002). The dynamic process of apoptosis analyzed by flow cytometry using Annexin-V/propidium iodide and a modified in situ end labeling technique. *Cytometry.* 47 (1): 24-31.
- Surendiran, A.; Sandhiya, S.; Pradhan, S.C. and Adithan, C. (2009). Novel applications of nanotechnology in medicine. *Indian J Med Res.* 130 (6): 689-701.

- Swami, A.; Shi, J.; Gadde, S.; Votruba, A.; Kolishetti, N. and Farokhzad, O. Nanoparticles for Targeted and Temporally Controlled Drug Delivery. In: Svenson S, Prud'homme RK, eds. *Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery Applications*: Springer US; 2012:9-29.
- Swartz, M.A.; Iida, N.; Roberts, E.W.; Sangaletti, S.; Wong, M.H.; Yull, F.E.; Coussens, L.M. and DeClerck, Y.A. (2012). Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. *Cancer Res.* 72 (10): 2473-2480.
- Tanaka, T.; Decuzzi, P.; Cristofanilli, M.; Sakamoto, J.H.; Tasciotti, E.; Robertson, F.M. and Ferrari, M. (2009). Nanotechnology for breast cancer therapy. *Biomed Microdevices.* 11 (1): 49-63.
- Telli, M.L. and Ford, J.M. (2010). Novel treatment approaches for triple-negative breast cancer. *Clin Breast Cancer.* 10 Suppl 1: E16-22.
- Tester, A.M.; Waltham, M.; Oh, S.J.; Bae, S.N.; Bills, M.M.; Walker, E.C.; Kern, F.G.; Stetler-Stevenson, W.G.; Lippman, M.E. and Thompson, E.W. (2004). Pro-matrix metalloproteinase-2 transfection increases orthotopic primary growth and experimental metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells in nude mice. *Cancer Res.* 64 (2): 652-658.
- Tomaskovic-Crook, E.; Thompson, E.W. and Thiery, J.P. (2009). Epithelial to mesenchymal transition and breast cancer. *Breast Cancer Res.* 11 (6): 213.
- Torchilin, V.P. (2001). Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *J Control Release.* 73 (2-3): 137-172.
- Uner, M. and Yener, G. (2007). Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives. *Int J Nanomedicine.* 2 (3): 289-300.
- van Vlerken, L.E. and Amiji, M.M. (2006). Multi-functional polymeric nanoparticles for tumour-targeted drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 3 (2): 205-216.
- Vauthier, C.; Dubernet, C.; Chauvierre, C.; Brigger, I. and Couvreur, P. (2003). Drug delivery to resistant tumors: the potential of poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles. *J Control Release.* 93 (2): 151-160.
- Videira, M. *Nanopartículas Lipídicas como sistemas transportadores de fármacos para administração pulmonar* [Tese de Doutorado]. Lisboa: Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa; 2008.
- Wan, C.P.; Letchford, K.; Jackson, J.K. and Burt, H.M. (2013). The combined use of paclitaxel-loaded nanoparticles with a low-molecular-weight copolymer inhibitor of P-glycoprotein to overcome drug resistance. *Int J Nanomedicine.* 8: 379-391.
- Wang, F.; Zhang, D.; Zhang, Q.; Chen, Y.; Zheng, D.; Hao, L.; Duan, C.; Jia, L.; Liu, G. and Liu, Y. (2011). Synergistic effect of folate-mediated targeting and verapamil-mediated P-gp inhibition with paclitaxel -polymer micelles to overcome multi-drug resistance. *Biomaterials.* 32 (35): 9444-9456.
- Wang, R.; Billone, P.S. and Mullett, W.M. (2013). Nanomedicine in Action: An Overview of Cancer Nanomedicine on the Market and in Clinical Trials. *J Nanomater.* 2013: 12.
- Wang, Y.; Fei, D.; Vanderlaan, M. and Song, A. (2004). Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro. *Angiogenesis.* 7 (4): 335-345.
- Watson, P.; Jones, A.T. and Stephens, D.J. (2005). Intracellular trafficking pathways and drug delivery: fluorescence imaging of living and fixed cells. *Adv Drug Deliv Rev.* 57 (1): 43-61.
- Wei, Z.; Hao, J.; Yuan, S.; Li, Y.; Juan, W.; Sha, X. and Fang, X. (2009). Paclitaxel-loaded Pluronic P123/F127 mixed polymeric micelles: formulation, optimization and in vitro characterization. *Int J Pharm.* 376 (1-2): 176-185.
- Wei, Z.; Yuan, S.; Hao, J. and Fang, X. (2012). Mechanism of inhibition of P-glycoprotein mediated efflux by Pluronic P123/F127 block copolymers: Relationship between copolymer concentration and inhibitory activity. *Eur J Pharm Biopharm.*
- Wier, D. Handbook of Experimental Immunology *Cellular Immunology*. Vol 2. 2nd ed. Oxford, Reino Unido: Wiley &

- Sons, Inc.; 1973.
- Wissing, S.A.; Kayser, O. and Muller, R.H. (2004). Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 56 (9): 1257-1272.
- Wong, H.L.; Bendayan, R.; Rauth, A.M.; Li, Y. and Wu, X.Y. (2007). Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev.* 59 (6): 491-504.
- Wong, H.L.; Rauth, A.M.; Bendayan, R.; Manias, J.L.; Ramaswamy, M.; Liu, Z.; Erhan, S.Z. and Wu, X.Y. (2006). A new polymer-lipid hybrid nanoparticle system increases cytotoxicity of doxorubicin against multidrug-resistant human breast cancer cells. *Pharm Res.* 23 (7): 1574-1585.
- Xiao, K.; Li, Y.; Luo, J.; Lee, J.S.; Xiao, W.; Gonik, A.M.; Agarwal, R.G. and Lam, K.S. (2011). The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholeic acid based micellar nanoparticles. *Biomaterials.* 32 (13): 3435-3446.
- Xu, L.; Zuch, C.L.; Lin, Y.S.; Modi, N.B. and Lum, B.L. (2008). Pharmacokinetics and safety of bevacizumab administered in combination with cisplatin and paclitaxel in cynomolgus monkeys. *Cancer Chemother Pharmacol.* 61 (4): 607-614.
- Xu, S.; Olenyuk, B.Z.; Okamoto, C.T. and Hamm-Alvarez, S.F. (2013). Targeting receptor-mediated endocytotic pathways with nanoparticles: rationale and advances. *Adv Drug Deliv Rev.* 65 (1): 121-138.
- Yan, F.; Zhang, C.; Zheng, Y.; Mei, L.; Tang, L.; Song, C.; Sun, H. and Huang, L. (2010). The effect of poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity. *Nanomedicine.* 6 (1): 170-178.
- Yang, M.; Chen, J.; Su, F.; Yu, B.; Su, F.; Lin, L.; Liu, Y.; Huang, J.-D. and Song, E. (2011). Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. *Mol Cancer.* 10 (1): 1-13.
- Yang, T.; Cui, F.D.; Choi, M.K.; Cho, J.W.; Chung, S.J.; Shim, C.K. and Kim, D.D. (2007). Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: in vitro and in vivo evaluation. *Int J Pharm.* 338 (1-2): 317-326.
- Yih, T.C. and Al-Fandi, M. (2006). Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems. *J Cell Biochem.* 97 (6): 1184-1190.
- Yoncheva, K.; Calleja, P.; Agueros, M.; Petrov, P.; Miladinova, I.; Tsvetanov, C. and Irache, J.M. (2012). Stabilized micelles as delivery vehicles for paclitaxel. *Int J Pharm.* 436 (1-2): 258-264.
- Yuan, Y.; Liu, C.; Qian, J.; Wang, J. and Zhang, Y. (2010). Size-mediated cytotoxicity and apoptosis of hydroxyapatite nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Biomaterials.* 31 (4): 730-740.
- Zhang, W.; Shi, Y.; Chen, Y.; Hao, J.; Sha, X. and Fang, X. (2011a). The potential of Pluronic polymeric micelles encapsulated with paclitaxel for the treatment of melanoma using subcutaneous and pulmonary metastatic mice models. *Biomaterials.* 32 (25): 5934-5944.
- Zhang, W.; Shi, Y.; Chen, Y.; Ye, J.; Sha, X. and Fang, X. (2011b). Multifunctional Pluronic P123/F127 mixed polymeric micelles loaded with paclitaxel for the treatment of multidrug resistant tumors. *Biomaterials.* 32 (11): 2894-2906.
- Zhang, W.; Shi, Y.; Chen, Y.; Yu, S.; Hao, J.; Luo, J.; Sha, X. and Fang, X. (2010). Enhanced antitumor efficacy by paclitaxel-loaded pluronic P123/F127 mixed micelles against non-small cell lung cancer based on passive tumor targeting and modulation of drug resistance. *Eur J Pharm Biopharm.* 75 (3): 341-353.
- Zhang, X.; Goncalves, R. and Mosser, D.M. (2008). The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol.* Chapter 14: Unit 14 11.
- Zhang, Z.; Mei, L. and Feng, S.S. (2013). Paclitaxel drug delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv.* 10 (3): 325-340.
- Zhou, X.; Yang, W. and Li, J. (2006). Ca²⁺- and protein kinase C-dependent signaling pathway for nuclear factor-kappaB activation, inducible nitric-oxide synthase expression, and tumor necrosis factor-alpha production in lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages. *J Biol Chem.* 281 (42): 31337-31347.

