

UFG/UFRGS/UFSM/UFSC/USP-RP/UNESP-Ar/UFOP/UFRN/UFPE
Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica
Universidade Federal de Goiás

MARCO JÚNIO PERES FILHO

**DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMAS
VETORIZADOS AO RECEPTOR FOLATO
CONTENDO PACLITAXEL E IMATINIBE
COENCAPSULADOS: AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E DA
EXPRESSÃO GÊNICA DO VEGF EM CÉLULAS
TUMORAIS**

GOIÂNIA
2014

MARCO JÚNIO PERES FILHO

TESE DE DOUTORADO EM NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

**DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMAS
VETORIZADOS AO RECEPTOR FOLATO
CONTENDO PACLITAXEL E IMATINIBE
COENCAPSULADOS: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIPROLIFERATIVA E DA EXPRESSÃO GÊNICA
DO VEGF EM CÉLULAS TUMORAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica da UFG/UFRGS/UFSM/UFSC/USP-RP/UNESP-Ar/U FOP/UFRN/UFPE, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Nanotecnologia Farmacêutica.

Área de Concentração: Nanotecnologia Farmacêutica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana Martins Lima

**GOIÂNIA
2014**

AGRADECIMENTOS

Prof^a. Dr^a. Eliana Martins Lima. Orientadora. Parece missão simples, mas que diferença fez na minha vida o trabalho por ela desempenhado ao longo desses quase 7 anos. Tive três grandes professoras na vida. A tia Wanda, que me alfabetizou. A professora Roseli, do Ensino médio, que me ensinou a desvendar os significados por trás das palavras, das frases, dos contextos, me fez apreciar a prazerosa arte da literatura. E a professora Eliana (Profa Eliana, como a chamo nos e-mails, ou Professora, como a chamo pessoalmente), que me ensinou praticamente tudo o que sei sobre ser pesquisador. A gratidão é enorme, abre-se mais um caminho. A conquista é tão sua quanto minha.

Prof^a. Dr^a. Danielle Diniz, minha primeira incentivadora nessa trajetória. A motivação que ela me transmite me deu força e persistência.

Dr^a. Fabrícia Saba Ferreira, a primeira a discutir lipossomas comigo na prática. Agradeço por ter sido presente e sinceramente envolvida com meus resultados, por ter compartilhado sua experiência e por ser exemplo de retidão, seriedade, competência e dedicação.

Dr^a. Monique Ferreira Marques, que se envolveu tanto com este trabalho nos últimos dois anos. Tenho certeza de que sua participação na definição do método de síntese orgânica foi crucial para o sucesso que alcançamos.

Dr. Alexandre Pereira dos Santos, seu empenho ao realizar os experimentos de PCR foi imprescindível nessa reta final. E que empenho!

Polyana Benfica, Bruna Rodrigues, Renato Ivan, Rafael Ducas, Thaís Fernandes, Marcelo Vieira, Soraia Santana, Elisandra Gava, Thais Rosa, todos companheiros de cultivo celular. O que aprendi ao lado de vocês acabou me dividindo entre a paixão pela nanotecnologia e pelas células e os experimentos *in vitro* que fazemos com elas.

Prof^a. Dr^a. Marize Valadares, suas sugestões e conselhos foram sempre muito oportunos e proveitosos. Que prazer poder trabalhar com sua equipe, me sinto quase um integrante do LFTC depois desses últimos dois anos.

Ao Leonardo Gomes Souza, colega de jornada. Começamos os experimentos juntos e apesar de termos tomado rumos tão diferentes na pesquisa, fora dela nunca faltou união e apoio.

À Dr^a. Alane Cortez que tanto contribuiu para os experimentos de PCR. Seu olhar crítico foi fundamental.

Relton Romeis e Livia Palmerston Mendes, em tantos momentos estiveram disponíveis para cooperar, discutir, sugerir, ajudar. Muito obrigado!

Prof^a. Dr^a. Cecília Maria Alves de Oliveira tão prontamente abriu as portas de seu laboratório para atender ao nosso pedido de auxílio. Que importante e produtiva parceria pudemos fazer com o Instituto de Química-UFG através dela.

Ao Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz agradeço por sua ajuda com os experimentos de Espectrometria de massas, pela paciência e por ser tão prestativo.

Prof^a. Dr^a. Taís Gratieri e Prof. Dr. Ruy Beck tanto contribuíram para a melhoria do trabalho através das correções e sugestões que fizeram no exame de qualificação.

Agradeço enormemente a todos os outros colegas de FarmaTec, que de alguma forma contribuíram para a realização de meus experimentos, em especial à Stela Ramirez, à Thais Leite, à Erika Crispim, à Lorena Maione, à Maiulle Pacheco, ao Danilo Fabrini, ao Rodrigo Alencar e à Marilisa Gaeti.

Preciso aproveitar a oportunidade para render homenagens aos meus familiares, especialmente à Telma, minha mãe, e à Alice, minha irmã, minhas inspiradoras e incentivadoras. Ao Matheus, que enche minha vida de emoção. Aos meus amigos queridos, Thiago, Danilo, Rômulo, Victor e Wellington, que tornaram esses anos mais leves e alegres.

À CAPES e ao CNPq, pelo financiamento do projeto e concessão de bolsa de estudos.

HOMETOWN GLORY

(...) Is there anything I can do for you, dear?

Is there anyone I could call?

No and thank you, please, madam

I ain't lost just wondering

Round my hometown

Memories are fresh

Round my hometown

Oh, the people I've met

Are the wonders of my world

Are the wonders of my world

Are the wonders of this world

Are the wonders now

(Adkins, A.)

RESUMO

A nanotecnologia tem ganhado cada vez mais destaque em várias áreas da ciência, no sentido de desenvolver novos produtos que possam trazer benefícios em comparação com alternativas já existentes no mercado. Uma série de vantagens emergem da nanoencapsulação de fármacos quimioterápicos, principalmente, a possibilidade de diminuição da dose administrada através de estratégias de direcionamento. Dentre elas, podem ser citadas a vetorização passiva, relacionada ao aumento da permeabilidade vascular em regiões tumorais, e a vetorização ativa, que significa o uso de ligantes específicos, cujos receptores são superexpressos em células tumorais, e que ficam ancorados na superfície de nanoestruturas. A coencapsulação de fármacos antitumorais é altamente relevante, uma vez que permite a utilização de diferentes abordagens para eliminação de tumores e a sincronização da farmacocinética dos agentes coencapsulados. No caso deste trabalho, o objetivo foi a associação do efeito citotóxico do paclitaxel (PTX) ao efeito antiangiogênico do imatinibe (IB), encapsulados no mesmo lipossoma direcionado para o receptor folato, superexpresso em vários tumores sólidos. Foi desenvolvido e validado novo método analítico para quantificação simultânea do IB e do PTX. Os lipossomas foram desenvolvidos usando fosfatidilcolina de soja (PC) como lipídio estrutural, colesterol e DSPE-mPEG(2000), este último para conferir efeito de longa circulação. Foi desenvolvido método inédito de síntese da molécula DSPE-PEG(2000)-AF, âncora lipídica ligada ao ácido fólico destinada a biorreconhecimento. Essa molécula foi adicionada à formulação por pós-inserção. Os nanossistemas obtidos foram testados *in vitro* quanto à citotoxicidade e quanto à inibição da expressão gênica de VEGF em células de adenocarcinoma mamário (MCF7) e de próstata (PC3). O método analítico foi isocrático, com corrida de apenas 6,5 minutos, linear, seletivo, preciso e exato, com limite de quantificação 750 µg/mL para o IB e 1000 µg/mL para o PTX. Os lipossomas tiveram diâmetro médio próximo de 100 nm e baixo índice de polidispersão. Apenas após a inserção da âncora ligada ao ácido fólico as amostras ficaram mais polidispersas, devido ao tempo de agitação desse processo (24 h). O IB foi encapsulado na razão molar fármaco:lipídio 1:26 e o PTX na razão 1:27. As formulações liofilizadas, usando o crioprotetor trealose, mantiveram a estabilidade em termos de %EE após 60 dias de armazenamento. O método desenvolvido para síntese do componente DSPE-PEG(2000)-AF foi bem sucedido, o que pôde ser verificado através dos espectros de RMN, FT-IR e IES-EM, que evidenciam a formação de uma nova substância a partir dos reagentes, que tem as características químicas esperadas. O paclitaxel lipossomal foi mais citotóxico ($p < 0,05$) para a linhagem MCF7, tanto em 24h como em 48h, em comparação com o fármaco livre, em todas as concentrações testadas. A formulação vetorizada com a âncora ligada ao ácido fólico, com IB e PTX coencapsulados, foi mais citotóxica ($p < 0,05$) que a não vetorizada (LPIP) nas concentrações testadas, no tempo 24 h. Na linhagem PC3 a redução da viabilidade celular causada pela vetorização ativa, em comparação com o resultado da formulação não vetorizada, foi ainda maior ($p < 0,01$) tanto em 24 como em 48h, nas concentrações 1 e 10 µg/mL. Houve redução, nas linhagens MCF7 e PC3, da expressão gênica de VEGF, e também nesse caso o tratamento com a formulação vetorizada causou maior efeito em comparação com a não vetorizada ($p < 0,05$). É razoável chegar-se à conclusão, através dos testes *in vitro*, de que o direcionamento de fármacos nanoencapsulados ao receptor folato, através do emprego de lipossomas multi-funcionais, é uma estratégia interessante no sentido de aumentar a

quantidade de fármaco que entra nas células, o que pôde ser observado através do aumento dos efeitos citotóxico e anti-angiogênico em linhagens tumorais de mama e próstata.

Palavras-chave: Lipossomas vetorizados, Ácido fólico, Coencapsulação, Nanotecnologia aplicada ao câncer, Viabilidade celular.

ABSTRACT

The impact of Nanotechnology is constantly raising in different areas of science, with the development of new products that bring benefits in comparison with the alternatives available in the market. When encapsulated in nanoparticles, anticancer drugs can achieve several advantages, most importantly the possibility of reducing the amount of drug administered through targeting strategies, which are not accomplished by conventional medication. Passive targeting is related to leaky vasculature in pathological sites, and active targeting comprehends the attachment of specific ligands, anchored in nanoparticles surface, to recognize and bind receptors overexpressed in cancer cells. Coencapsulation of anticancer drugs in the same pharmaceutical carrier can coordinate pharmacokinetics of encapsulated drugs. In the present work, liposomal formulations targeted to folate receptor with paclitaxel (PTX) and imatinib (IB) coencapsulated were obtained, aiming to combine cytotoxic and antiangiogenic effects of the drugs, respectively. New analytical method was developed and validated for simultaneous quantification of IB and PTX. Soy phosphatidylcholine liposomes were prepared, with cholesterol and DSPE-mPEG(2000), to obtain long circulation particles. DSPE-PEG(2000)-FA was obtained by an unpublished method of synthesis, and this product was further used in the formulation by post-insertion technique. Cytotoxic effect and VEGF gene suppression were studied *in vitro* in two different cell lines, MCF7 (breast adenocarcinoma) and PC3 (prostatic adenocarcinoma), after treatment with liposomal vesicles. Analytical procedures were developed with isocratic elution, 6,5 minutes runs, with linearity, specificity, precision and accuracy. Quantification limit was 750 µg/mL and 1000 µg/mL for IB and PTX, respectively. After extrusion, liposomes had mean diameter close to 100 nm and low polydispersion index. Post-insertion of folic acid attached to lipid anchor procedure increased polydispersion, because the procedure lasted 24h. Drug to lipid ratios were 1:26 and 1:27 (IB and PTX respectively). Lyophilized formulations containing trehalose remained stable after 60 days of storage in terms of %EE. Synthesis of DSPE-PEG(2000)-FA was confirmed by RMN, FT-IR and ESI-MS techniques. Liposomal PTX was more cytotoxic ($p < 0,05$) than free drug in MCF7 cell line, after both 24h and 48h of exposition, for all tested concentrations. Targeted formulation containing folic acid ligand, had more impact on cell viability reduction ($p < 0,05$) than non targeted liposomes (LPIP), also after 24h. On PC3 cell line cell viability reduction was greater ($p < 0,01$) when the cells were exposed to targeted vesicles loaded with 1 and 10 µg/mL of IB and PTX, after 24 and 48h. VEGF gene expression was reduced in MCF7 and PC3 ($p < 0,05$), and once more targeted vesicles showed better results than non-targeted liposomes. It is, thus, plausible to conclude, through *in vitro* experiments results, that the attachment of folic acid to liposomal formulations, resulting in multi-functional liposomes, is an interesting strategy to achieve enhanced internalization and accumulation of drugs in targeted cells. This was observed by the enhancement of cytotoxic and antiangiogenic effects in breast and prostate cell lines.

Key words: Targeted liposomes, Folic acid, Coencapsulation, Cancer nanotechnology, Cytotoxicity.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Combinações e proporções de solventes usados para o desenvolvimento de método de quantificação do imatinibe e do paclitaxel por CLAE	32
Quadro 2	Formulações lipossomais preparadas durante a etapa de desenvolvimento. Legenda: L: lipossoma, C: convencional, B: branco, P: peguilado, V: vetorizado, I: imatinibe, P, PTX: paclitaxel, PC: fosfatidilcolina, CH: colesterol	37
Quadro 3	Esquema dos tratamentos feitos nas linhagens celulares MCF7 e PC3 e das concentrações testadas. I indica presença do Imatinibe, P do Paclitaxel e IP de ambos os fármacos (presentes na mesma concentração)	40
Quadro 4	Sequência de primers utilizados na reação de polimerização em cadeia após transcrição reversa quantitativa (qRT-PCR)	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros analíticos resultantes do método desenvolvido, referentes à Fase móvel Tampão acetato pH 8,5:Acetonitrila (55:45)	46
Tabela 2	Dados de recuperação de IB e PTX a partir de amostras de lipossomas brancos contaminados com os fármacos para ensaio de Seletividade	47
Tabela 3	Precisão e exatidão interdia do método analítico	49
Tabela 4	Precisão e exatidão intradia do método analítico	49
Tabela 5	Limite de quantificação do método analítico	49
Tabela 6	Comparação entre os valores de %EE das formulações contendo fármacos coencapsulados na ausência (LCIP) e na presença do colesterol (LCIP2)	58
Tabela 7	Estabilidade dos lipossomas após 30 dias de armazenamento a 4°C avaliada através da %EE. Comparação entre formulações sem (LCIP) ou com (LCIP2) colesterol	58
Tabela 8	Influência do imatinibe mesilato e do imatinibe base na encapsulação do paclitaxel, em lipossomas com 5% DSPE-mPEG(2000)	59
Tabela 9	Diâmetro médio (nm) e Índice de Polidispersibilidade de lipossomas brancos convencionais (LCB), peguilados (LPB) e vetorizados (LPVB)	61
Tabela 10	Diâmetro médio (nm) e Índice de Polidispersibilidade de lipossomas peguilados carregados com Imatinibe (LPI) ou Paclitaxel (LPP)	61
Tabela 11	Diâmetro médio (nm) e Índice de Polidispersibilidade de lipossomas peguilados vetorizados (LPVIP) ou não-vetorizados (LPIP), ambos carregados com Imatinibe e Paclitaxel	62
Tabela 12	%EE das formulações não-vetorizada e vetorizada contendo os fármacos IB e PTX coencapsulados	64
Tabela 13	Estabilidade dos lipossomas peguilados contendo imatinibe e paclitaxel (LPIP) armazenados a 4°C	64
Tabela 14	Diâmetro médio (nm) e Índice de Polidispersibilidade de lipossomas peguilados brancos recém-preparados e ressuspensos, variando o tipo e a concentração de crioprotetor	65
Tabela 15	Diâmetro médio (nm) e Razão entre Diâmetro médio final e Diâmetro médio inicial (D_f/D_i) de lipossomas peguilados brancos antes e após ressuspensão, variando o tipo e a concentração de crioprotetor	65

Tabela 16	%EE da formulação LPIP contendo trealose na razão molar lipídio:crioprotetor 1:4 antes e após a ressuspensão (LPIP R)	68
Tabela 17	Estabilidade dos lipossomas peguados vetorizados contendo imatinibe e paclitaxel após a liofilização	68
Tabela 18	Viabilidade celular (%) da linhagem MCF7 24 horas após o tratamento com imatinibe livre (FLI) ou encapsulado (LPI), formulação comercial de paclitaxel (FLP), lipossomas contendo paclitaxel (LPP) ou ambos os fármacos coencapsulados, não-vetorizados (LPIP) e vetorizados (LPV IP) em diferentes concentrações	70
Tabela 19	Viabilidade celular (%) da linhagem MCF7 48 horas após o tratamento com FLI, LPI, FLP, LPP, LPIP e LPV IP em diferentes concentrações	70
Tabela 20	Tratamento estatístico dos dados do teste de Viabilidade celular da linhagem MCF7 24 horas após o tratamento com as formulações FLI, LPI, FLP, LPP, LPIP e LPV IP em diferentes concentrações	70
Tabela 21	Tratamento estatístico dos dados do teste de Viabilidade celular da linhagem MCF7 48 horas após o tratamento com as formulações FLI, LPI, FLP, LPP, LPIP e LPV IP em diferentes concentrações	71
Tabela 22	Viabilidade celular (%) da linhagem PC3 24 horas após o tratamento com imatinibe livre (FLI) ou encapsulado (LPI), formulação comercial de paclitaxel (FLP), lipossomas contendo paclitaxel (LPP) ou ambos os fármacos coencapsulados, não-vetorizados (LPIP) e vetorizados (LPV IP) em diferentes concentrações	77
Tabela 23	Viabilidade celular (%) da linhagem PC3 48 horas após o tratamento com FLI, LPI, FLP, LPP, LPIP e LPV IP em diferentes concentrações	74
Tabela 24	Tratamento estatístico dos dados do teste de Viabilidade celular da linhagem PC3 24 horas após o tratamento com as formulações FLI, LPI, FLP, LPP, LPIP e LPV IP em diferentes concentrações	74
Tabela 25	Tratamento estatístico dos dados do teste de Viabilidade celular da linhagem PC3 48 horas após o tratamento com as formulações FLI, LPI, FLP, LPP, LPIP e LPV IP em diferentes concentrações	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de um lipossoma	4
Figura 2	Estrutura química do colesterol	6
Figura 3	Estrutura química do Paclitaxel	11
Figura 4	Estrutura química do Imatinibe	11
Figura 5	Vários mediadores vasculares comumente encontrados na inflamação e no câncer que contribuem para o efeito EPR. A diferença principal entre os dois processos patológicos é a taxa de clearance, que faz com que haja retenção prolongada no tecido tumoral em comparação com o inflamatório	17
Figura 6	Representação esquemática do efeito EPR, evidenciando o acúmulo de lipossomas na região tumoral por causa da característica peculiar dos vasos tumorais	19
Figura 7	Vias distintas para entrada de material em células. A fagocitose envolve receptores de superfície e o englobamento de partículas grandes pela membrana plasmática. A macropinocitose envolve a captura de proteínas solúveis junto com fluido extracelular. Endocitose dependente de clatrina envolve a montagem de clatrina unida a adaptador proteico em região da membrana plasmática na qual determinados receptores estão aglomerados para formar uma vesícula nova destinada à internalização. Endocitose dependente de caveolina envolve a montagem de revestimentos de caveolina em regiões da membrana plasmática ricas em estruturas lipídicas peculiares para formar uma vesícula nova destinada à internalização. CIC envolve a endocitose com participação de proteínas ancoradas na membrana, e tende a formar também o endossomo inicial. São transportadores independentes de clatrina	22
Figura 8	Lipossomas multifuncionais de longa circulação, carregados com Imatinibe e Paclitaxel e direcionados ao receptor folato	30
Figura 9	Esquema de síntese do produto DSPE-PEG(2000)-AF	34
Figura 10	Representação esquemática do preparo de lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico e posterior extrusão	36
Figura 11	Ilustração geral referente ao plaqueamento de células e seu tratamento	41

Figura 12	Cromatograma da amostra contendo imatinibe e paclitaxel na concentração 50 µg/mL diluídos em metanol. Condições cromatográficas: fase móvel tampão acetato de amônio pH 8,5: Acetonitrila (55:45), fluxo 0,75 mL/min; coluna C18 Varian OmniSpher 3 (100x4,60mm) 3,5µm, temperatura 50°C, comprimento de onda 267 nm (IB) e 229 nm (PTX), detector UV	47
Figura 13	Curva de calibração do Imatinibe obtida por CLAE	48
Figura 14	Curva de calibração do Paclitaxel obtida por CLAE	48
Figura 15	Fórmula molecular do Ácido fólico (massa molar = 441,37 g/mol)	50
Figura 16	Fórmula molecular do DSPE-PEG(2000)-NH ₂ (massa molar = 2788,79 g/mol)	50
Figura 17	Fórmula molecular do produto da reação, DSPE-PEG(2000)-Folato (massa molar = 3228,95 g/mol)	50
Figura 18	Esquema da síntese do conjugado DSPE-PEG(2000)-AF (n ≈ 45). Apenas o produto principal é mostrado	51
Figura 19	Espectro de FT-IR do Ácido fólico	52
Figura 20	Espectro de FT-IR do DSPE-PEG(2000)-NH ₂	52
Figura 21	Novo protocolo de síntese do conjugado DSPE-PEG(2000)-AF (n ≈ 45). Apenas o produto principal é mostrado	53
Figura 22	Espectro de FT-IR dos produtos formados em duas reações diferentes	54
Figura 23	Espectro de RMN de ¹ H do produto da reação de síntese	55
Figura 24	Espectro de RMN de ¹ H do produto da reação de síntese. Picos correspondentes à porção aromática da molécula (δ 6,62 e δ 7,91), que indica a ligação ao ácido fólico, em detalhe	55
Figura 25	Espectros de massas do reagente DSPE-PEG(2000)-NH ₂ (A) e do produto DSPE-PEG(2000)-AF (B)	56
Figura 26	Diâmetro médio dos lipossomas brancos convencionais (LC), peguilados (LP) e vetorizados (LV) determinado pela intensidade do espalhamento de luz	61
Figura 27	Diâmetro médio dos lipossomas peguilados carregados com imatinibe ou paclitaxel determinado pela intensidade do espalhamento de luz	62
Figura 28	Diâmetro médio dos lipossomas peguilados carregados com imatinibe e paclitaxel, não vetorizados (LPIP) ou vetorizados (LPVIP) determinado pela intensidade do espalhamento de luz	62

Figura 29	Diâmetro médio dos lipossomas brancos peguilados determinado pela intensidade do espalhamento de luz. Formulações contendo trealose nas razões lipídio:crioprotetor 1:4 e 1:10 antes da liofilização e depois da ressuspensão (R)	66
Figura 30	Diâmetro médio dos lipossomas brancos peguilados determinado pela intensidade do espalhamento de luz. Formulações contendo sacarose nas razões lipídio:crioprotetor 1:4 e 1:10 antes da liofilização e depois da ressuspensão (R)	66
Figura 31	Diâmetro médio dos lipossomas brancos peguilados determinado pelo número de vesículas. Formulações contendo sacarose e trealose na razão lipídio:crioprotetor 1:4 depois da ressuspensão (R)	67
Figura 32	Gráfico de Viabilidade celular (%) da linhagem MCF7 após tratamento com formulação comercial convencional de paclitaxel (FLP), lipossomas contendo paclitaxel (LPP) e ambos os fármacos coencapsulados, não vetorizados (LPIP) e vetorizados (LPV IP), todos na concentração 100 ng/mL	75
Figura 33	Gráfico de Viabilidade celular (%) da linhagem PC3 após tratamento com formulação comercial convencional de paclitaxel (FLP), lipossomas contendo paclitaxel (LPP) e ambos os fármacos coencapsulados, não vetorizados (LPIP) e vetorizados (LPV IP), todos na concentração 10 µg/mL	81
Figura 34	Gel de agarose com amostras de RNA resultantes do tratamento das linhagens MCF7 (1 a 4) e PC3 (5 a 8)	82
Figura 35	Gráfico de expressão gênica do VEGF na linhagem celular MCF7 48h após o tratamento com vesículas brancas (LPVB), carregadas com imatinibe e paclitaxel, ambos a 1 µg/mL (LPIP) e a mesma vesícula contendo âncora ligada ao ácido fólico (LPV IP)	82
Figura 36	Gráfico de expressão gênica do VEGF na linhagem celular PC3 48h após o tratamento com vesículas brancas (LPVB), carregadas com imatinibe e paclitaxel, ambos a 1 µg/mL (LPIP) e a mesma vesícula contendo âncora ligada ao ácido fólico (LPV IP)	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%EE	Porcentagem de Eficiência de encapsulação
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina 5'trifosfato
cDNA	DNA complementar
CH	Colesterol
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
DAD	Detector de arranjo de diodos
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DCU	Diciclohexilureia
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAse	Desoxirribonuclease
DSPE-PEG	Disteroil fosfatidiletanolamina-polietileneglicol
DSPE-PEG- AF	Disteroil fosfatidiletanolamina-polietileneglicol-ácido fólico
DSPE-PEG- NH ₂	Disteroil fosfatidiletanolamina-polietileneglicol-amino
EDTA	Ácido etileno-diamino tetracético
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFR	Receptor para o Fator de crescimento epidermal
EPR	Enhanced Permeability and Retention (Permeabilidade e retenção aumentadas)
FT-IR	Espectroscopia do Infravermelho com transformada Fourier
HPV	Papilomavírus humano

IB	Imatinibe base
IC50	Concentração inibitória para 50% de células
ICH	International Conference on Harmonisation
IES-EM	Espectrometria de massas com ionização de eletrospray
IM	Mesilato de imatinibe
LCB	Lipossoma convencional branco
LCIP	Lipossoma convencional com imatinibe e paclitaxel sem colesterol
LCIP2	Lipossoma convencional com imatinibe e paclitaxel com colesterol
LogP	Coeficiente de partição
LPB	Lipossoma peguilado branco
LPI	Lipossoma peguilado com imatinibe
LPIP	Lipossoma peguilado com imatinibe e paclitaxel
LPP	Lipossoma peguilado com paclitaxel
LPVB	Lipossoma peguilado vetorizado branco
LPVIP	Lipossoma peguilado vetorizado com imatinibe e paclitaxel
MLV	Vesículas multilamelares
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio
NHS	N-hidroxisuccinimida
PBS	Tampão fosfato-salino
PC	Fosfatidilcolina
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
Pdl	Índice de polidispersibilidade
PEG-PE	Polietilenoglicol-fosfatidiletanolamina
Pgp	Glicoproteína-P
PTX	Paclitaxel

RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
RPMI	Meio de cultura desenvolvido no Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SFB	Soro fetal bovino
SRE	Sistema retículo endotelial
SUV	Vesículas unilamelares pequenas
TEA	Trietilamina
TES	Ácido N-[Tris(hidroximetil)-metil]-2-aminoetanosulfônico
T _c	Temperatura de transição de fase do fosfolipídio
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1	LIPOSSOMAS	4
2.2	COENCAPSULAÇÃO DE FÁRMACOS E COMBINAÇÃO DO PACLITAXEL COM O IMATINIBE.....	8
2.2.1	Coencapsulação de fármacos em nanossistemas	8
2.2.2	Farmacologia do Paclitaxel e do Imatinibe	10
2.2.3	Combinação do Paclitaxel com o Imatinibe	12
2.3	ESTRATÉGIAS PARA DIRECIONAMENTO DE FÁRMACOS	15
2.3.1	Vetorização Passiva	15
2.3.2	Vetorização Ativa	20
2.4	TERAPIA DO CÂNCER.....	25
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVO GERAL	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4	METODOLOGIA	32
4.1	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE IMATINIBE E PACLITAXEL.....	32
4.1.1	Desenvolvimento analítico	32
4.1.2	Validação analítica	33
4.1.2.1	Seletividade.....	33
4.1.2.2	Linearidade.....	33
4.1.2.3	Limite de quantificação.....	33
4.1.2.4	Precisão e Exatidão.....	33
4.2	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO DSPE-PEG(2000) ÁCIDO FÓLICO	34

4.2.1	Caracterização do produto DSPE-PEG(2000)-AF	35
4.3	DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS	36
4.4	LIOFILIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS	39
4.5	CULTURA DE CÉLULAS E ENSAIOS TUMORAIS IN VITRO	39
4.5.1	Avaliação da citotoxicidade nas linhagens MCF7 e PC3 pelo método de redução do tetrazolium (MTT)	40
4.5.2	Análise da expressão gênica de VEGF por Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qRT-PCR)	42
4.5.2.1	Tratamento.....	42
4.5.2.2	Extração do RNA total.....	42
4.5.2.3	Quantificação do RNA e avaliação da qualidade do RNA	43
4.5.2.4	Tratamento do RNA total com DNase.....	43
4.5.2.5	Transcrição em cDNA.....	43
4.5.2.6	Padronização dos genes β -actina, TBP e VEGF pela técnica de reação de cadeia em tempo real, após transcrição reversa quantitativa (qRT-PCR)	43
4.5.2.7	qRT-PCR em Tempo Real.....	44
4.6	AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DO IB E DO PTX.....	46
5.1.1	Desenvolvimento analítico	46
5.1.2	Validação da metodologia analítica	47
5.1.2.1	Seletividade.....	47
5.1.2.2	Linearidade.....	48
5.1.2.3	Precisão e exatidão.....	49
5.1.2.4	Limite de quantificação.....	49
5.2	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO DSPE-PEG(2000)-AF.....	50
5.3	DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS	57

5.4	LIOFILIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS	64
5.5	ENSAIOS IN VITRO NAS LINHAGENS MCF7 E PC3	68
5.5.1	Viabilidade celular	68
5.5.2	Avaliação da expressão gênica do VEGF por qRT-PCR	81
6	CONCLUSÕES	87
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
	ANEXO 1 - Curvas de padronização dos genes β -actina, TBP e VEGF.....	105
	ANEXO 2 - Quantificação dos genes endógenos β -actina (MCF7) e TBP (PC3) e do gene VEGF (MCF7 e PC3).....	107

1 INTRODUÇÃO

Nanotecnologia, termo derivado da palavra grega nano, significa a criação e utilização de materiais, dispositivos e sistemas através do manejo da matéria na escala submicrométrica, ou seja, no nível dos átomos, moléculas e estruturas supramoleculares. As nanopartículas podem ser consideradas o futuro dos sistemas de liberação por causa de sua utilidade como ferramenta terapêutica e diagnóstica. Os nanoproductos já têm sido usados comercialmente em várias áreas, como medicina, química, comunicação, engenharia, robótica e cosmética, no sentido de desenvolver novos produtos e criar novos mercados, trazendo benefícios para a vida cotidiana. É por isso que a nanotecnologia é considerada por muitos especialistas e acadêmicos como a quarta revolução industrial (FARAJI e WIPF, 2009; JAIN, 2010; LO e col., 2012; PARVEEN e col., 2012; SAHOO e LABHASETWAR, 2003).

Assim, na interface entre o desenvolvimento de nanopartículas e a característica funcional inerente dos componentes celulares em nanoescala, há a possibilidade da aplicação da Nanotecnologia ao contexto da Biotecnologia, originando o termo Nanobiotecnologia (JAIN, 2010; PARVEEN e col., 2012). A Nanobiotecnologia está sendo aplicada para refinar as técnicas cirúrgicas, e além disso, durante os últimos anos considerável progresso tem sido obtido na aplicação da nanobiotecnologia ao câncer (JAIN, 2010).

Existe também interesse crescente de pesquisadores acadêmicos e da indústria no sentido de desenvolver produtos baseados em nanotecnologia envolvendo tanto novas entidades moleculares biologicamente ativas quanto fármacos já utilizados comercialmente. Isso é importante para melhorar a terapia e para prolongar o ciclo de vida do produto após a expiração da patente, oferecendo vantagem competitiva em relação a medicamentos genéricos (FAROKHZAD e LANGER, 2009; PARVEEN e col., 2012).

A quimioterapia convencional atualmente apresenta algumas dificuldades que podem ser melhoradas através do desenvolvimento de novos produtos, como a pouca especificidade de moléculas ativas e alta toxicidade, que causa efeitos colaterais como cardiomiopatia, supressão da medula óssea e neurotoxicidade. Isso limita a dose dos fármacos que tratam o câncer, em virtude da não seletividade entre células normais e células cancerosas (ANDRESEN e col., 2005; CHO e col., 2008; NIE e col., 2007; SINHA e col., 2006). A referida limitação de dose a ser

administrada pode afetar a resposta do câncer ao tratamento, o que em último caso pode ocasionar reincidência do tumor ou resistência aos fármacos (SAPRA e ALLEN, 2003).

Conseqüentemente, observa-se que muitas propriedades de medicamentos usados hoje em dia para tratar o câncer devem ser melhoradas, o que pode ser conseguido através do emprego de sistemas de liberação de fármacos de pequena escala, dentre eles os lipossomas e as partículas poliméricas, aplicáveis à administração intravenosa. Esses sistemas são capazes de alterar a farmacocinética e a biodistribuição de fármacos convencionais que apresentem limitações como rápido metabolismo *in vivo* e desencadeamento de danos teciduais devido a sua citotoxicidade, e possibilitam a encapsulação de diversos agentes terapêuticos (ALLEN e CULLIS, 2004; FARAJI e WIPF, 2009).

Como a maioria dos regimes terapêuticos para tratamento do câncer usam combinações de fármacos, o desenvolvimento de formulações lipossomais com fármacos coencapsulados torna-se altamente atrativo, tendo em vista a possibilidade de coordenar a liberação e a farmacocinética dessas substâncias (TARDI e col., 2007; ZUCKER e BARENHOLZ, 2010). Além dessa grande vantagem, estudos *in vitro* já demonstraram que a coencapsulação ocasionou a reversão da resistência a fármacos apresentada por determinadas linhagens celulares (WANG e col., 2005).

O paclitaxel é amplamente usado contra várias neoplasias metastáticas e atua no processo de divisão celular, alterando a dinâmica normal dos microtúbulos, o que causa rompimento celular (HUANG e col., 2010; ROWINSKY e DONEHOWER, 1995). O mesilato de imatinibe inibe a neoangiogênese tumoral através da diminuição dos níveis de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) (LITZ e KRYSTAL, 2006). Existe a necessidade de combinar os agentes antiangiogênicos, porque não podem erradicar completamente os tumores sólidos, com os quimioterápicos convencionais (LILA e col., 2010). Ambos os fármacos citados, quando combinados, mostraram efeito sinérgico em teste *in vitro* usando linhagem de câncer ovariano (MUNDHENKE, 2008). Apesar dos benefícios observados em pacientes humanos (PISHVAIAN e col., 2012) e em animais (KIM e col., 2006), não há registro na literatura da coencapsulação desses dois fármacos em algum tipo de nanossistema.

Além da possibilidade de coencapsulação, a nanotecnologia oferece uma alternativa terapêutica no sentido de superar as dificuldades encontradas em termos

de diagnóstico, prevenção e tratamento do câncer, através do emprego das estratégias de vetorização, oferecendo ainda mais benefícios aos pacientes com câncer (MISRA e col., 2010; NIE e col., 2007). O tamanho reduzido permite que as nanopartículas atinjam os tumores com alto grau de especificidade, eliminando células tumorais sem afetar as células normais. Isso acontece através do desenvolvimento de agentes multifuncionais, uma vez que as nanopartículas podem ser modificadas por grande quantidade de ligantes, inclusive aqueles usados na vetorização ativa, destinados ao biorreconhecimento (CHO e col., 2008; CUENCA e col., 2006; McCARTHY e col., 2010).

Dentre os possíveis alvos usados nas referidas estratégias de direcionamento, destaca-se o receptor folato, superexpresso em grande variedade de tumores sólidos, particularmente os metastáticos (TOMASINA e col., 2013).

O objetivo deste estudo, então, foi coencapsular um fármaco antiangiogênico, o imatinibe, e um citotóxico, o paclitaxel, na mesma formulação lipossomal contendo âncora lipídica ligada ao ácido fólico. A ideia é que as partículas se acumulem preferencialmente no tecido tumoral que superexpressa o receptor folato, que o fármaco antiangiogênico interrompa o fluxo sanguíneo tumoral e que o agente citotóxico, já acumulado no interior do tumor, exerça seu efeito concomitantemente e após o bloqueio do aporte de nutrientes para o tumor. A combinação entre antiangiogênico e citotóxico já foi explorada na literatura. Sengupta e colaboradores (2005) desenvolveram nanopartícula circundada por envelope lipídico com combretastatina, antiangiogênica, e doxorubicina, citotóxica, encapsuladas simultaneamente. Zhang e colaboradores (2010a) encapsularam os mesmos fármacos em lipossomas alvoespecíficos, direcionados ao receptor para a integrina RGD, um tipo de peptídeo.

Em nosso grupo de pesquisa, foram encapsulados o paclitaxel e a genisteína em nanopartícula multicompartimental, para liberação rápida do agente antiangiogênico e lenta do citotóxico. Em todos os casos apresentados, ainda não foi proposta a coencapsulação de paclitaxel e imatinibe em lipossomas alvoespecíficos direcionados ao receptor folato, o que consiste na inovação proposta no presente trabalho.

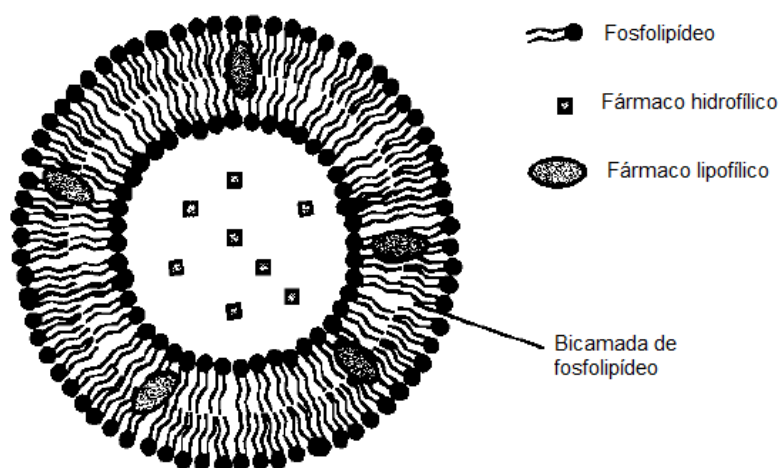
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LIPOSSOMAS

Nanopartículas são sistemas de liberação de fármacos biocompatíveis e biodegradáveis que têm tamanho submicrométrico e podem ter muitos arranjos estruturais em termos de tamanho, forma e materiais utilizados na sua preparação. Compreendendo essa variedade de materiais, podem ser citados polímeros (partículas poliméricas, micelas e dendrímeros), lipídios (lipossomas), vírus (nanopartículas virais), e até compostos organometálicos (nanotubos) (CHO e col., 2008; HALEY e FRENKEL, 2008; VASIR e LABHASETWAR, 2007).

Particularmente, a pesquisa e o estudo de lipossomas têm se expandido consideravelmente nas últimas décadas, quando tornaram-se carreadores farmacêuticos de escolha para numerosas aplicações práticas. A estrutura dos lipossomas (Figura 1) é determinada, assim como no caso das partículas poliméricas, pelas matérias-primas que são utilizadas na sua preparação e pelas interações que ocorrem por semelhança de polaridade na bicamada lipídica e com o meio aquoso durante a sua formação (BANERJEE, 2001; TORCHILIN, 2005).

Figura 1. Esquema de um lipossoma. Adaptado de MASSING e FUXIUS (2000).



Essas nanoestruturas já foram exploradas na clínica para aplicações diversas, como agentes de diagnóstico por imagem de tumores e sítios de infecção, para produção de vacinas e sistemas de carreamento de genes, para o tratamento de infecções e do câncer, de doenças pulmonares e da pele (ALLEN e CULLIS, 2013).

Lipossomas são vesículas esféricas formadas por uma ou várias bicamadas lipídicas concêntricas, com compartimento aquoso no interior e entre as bicamadas de lipídios naturais ou sintéticos (fosfo ou esfingolipídios) (Figura 1). Essas partículas são compostas por materiais biocompatíveis, causam nenhuma ou poucas reações antigênicas, pirogênicas, alérgicas e tóxicas, são facilmente biodegradáveis; protegem o paciente de efeitos colaterais indesejáveis causados pelo princípio ativo, e ao mesmo tempo protegem o fármaco encapsulado da inativação causada por agentes do meio fisiológico. Fármacos com lipofilicidades variadas podem ser encapsulados em lipossomas, seja na própria bicamada de fosfolipídios, na sua interface ou no volume aquoso aprisionado (LASIC, 1997; SHARMA e SHARMA, 1997; TORCHILIN, 2005; TORCHILIN, 2010).

Em relação ao tamanho, lipossomas que contêm uma única bicamada (lamela) são chamados vesículas unilamelares (ULVs, unilamellar vesicles, do inglês), que podem ser pequenas (20-100 nm) ou grandes (>100 nm), enquanto aqueles que têm mais que uma bicamada são vesículas multilamelares ou MLVs (>500 nm) (CAGDAS e col., 2011; EDWARDS e BAEUMNER, 2006; GÓMEZ-HENS e FERNÁNDEZ-ROMERO, 2006; LI e ZHAO, 2007; WALDE e ICHIKAWA, 2001).

As propriedades físico-químicas dos lipídios que compõem os lipossomas, como fluidez da membrana, densidade de carga, impedimento estérico e permeabilidade, determinam as suas interações com componentes do plasma e outros tecidos após administração sistêmica (SHARMA e SHARMA, 1997; LASIC, 1997).

Dentre os lipídios empregados na preparação de lipossomas, podem ser citados as fosfatidilcolinas e o colesterol. As fosfatidilcolinas representam a mais abundante classe de lipídios em membranas de mamíferos e são um importante componente em organismos eucarióticos. São também constituintes do surfactante pulmonar humano, de lipoproteínas séricas e da bile e representam os lipídios mais amplamente usados em estudos de modelo de membranas (KOYNOVA e CAFFREY, 1998).

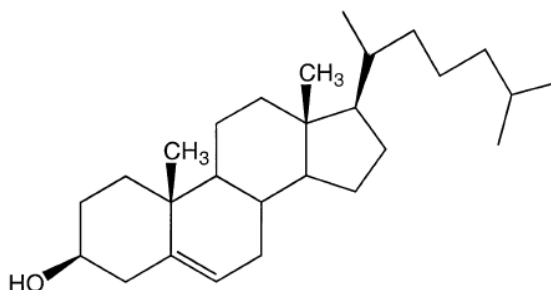
A característica típica de lipídios formadores de bicamada, como as fosfatidilcolinas, é sua natureza anfifílica: uma cabeça polar ligada covalentemente a uma ou duas caudas hidrofóbicas de hidrocarboneto. Quando esses lipídios são expostos ao ambiente aquoso, interações entre eles mesmos (pontes de hidrogênio entre os grupos polares e ligações de van der Waals entre as cadeias de

hidrocarboneto) e com a água (interações hidrofílicas, efeito hidrofóbico) levam à formação de vesículas (FRÉZARD, 1999; OHVO-REKILA e col., 2002).

A fluidez da bicamada lipossomal, quando feita de um único lipídio, depende da temperatura de transição de fase desse lipídio (T_c). Em temperatura superior à T_c do lipídio da bicamada, a membrana dos lipossomas encontra-se na fase líquida-cristalina fluida, um estado desordenado, em que as moléculas têm mais liberdade de movimento. Ao contrário, em temperaturas inferiores à T_c do fosfolipídio que forma a bicamada lipossomal, a membrana dos lipossomas se encontra na fase gel ou “rígida” e os lipídeos têm movimento restrito e suas cadeias de hidrocarboneto apresentam conformação “toda-trans”. Assim, dependendo da T_c do lipídio, diferentes membranas compostas por distintos lipídios podem exibir diferentes níveis de fluidez à mesma temperatura (FRÉZARD, 1999; FRÉZARD e col., 2005; PAPAHAADJOPOULOS e col., 1973).

Outro componente lipídico importante, que entra muitas vezes na composição dos lipossomas, é o colesterol (Figura 2).

Figura 2. Estrutura química do colesterol.



Por causa de sua estrutura plana, do anel rígido e do pequeno grupamento polar, o colesterol é adequado para ter contato próximo com fosfolipídios que possuem cadeias saturadas, e é capaz de influenciar o empacotamento dos lipídios. Na bicamada dos lipossomas, seu grupo hidroxil polar fica na interface com a fase aquosa e o anel esteroide hidrofóbico posiciona-se paralelamente e entre as cadeias de fosfolipídios. Ao posicionar-se assim, o colesterol aumenta a rigidez das membranas no estado líquido-cristalino e reduz a rigidez e os defeitos estruturais das membranas no estado gel. Isso explica o importante papel desse constituinte das membranas biológicas, que exerce regulação da elasticidade e da permeabilidade das bicamadas lipídicas. No caso particular dos lipossomas, a permeabilidade da bicamada influencia na liberação dos fármacos encapsulados

(FRÉZARD, 1999; FRÉZARD e col., 2005; HEERKLOTZ e TSAMALOUKAS, 2007; HALLING e col., 2008; OHVO-REKILA e col., 2002).

Ainda em relação às matérias-primas, quando empregam-se lipídios com propriedades fusogênicas são desenvolvidos lipossomas sensíveis ao pH. Eles são estáveis em pH 7,4, mas liberam seu conteúdo sob condições ácidas. Portanto representam uma estratégia que possibilita a modificação do perfil de liberação de substâncias ativas. Os lipídios com propriedades fusogênicas, quando incluídos nas formulações lipossomais, resultam nos chamados lipossomas polimórficos ou “fusogênicos”, uma vez que sofrem transição de fase sob condições ácidas. Isso resulta em fusão ou desestabilização da partícula com posterior liberação do conteúdo encapsulado no citoplasma (SIMÕES e col., 2004; TORCHILIN, 2005; VASIR e LABHASETWAR, 2007). Por sua vez, os lipossomas catiônicos acumulam-se mais em regiões onde há células endoteliais resultantes do processo de neoangiogênese em comparação com o endotélio normal. Isso ocorre por interação de cargas, uma vez que o glicocálice de células endoteliais em proliferação é carregado negativamente, interagindo seletivamente com partículas catiônicas (BODE e col., 2009; HO e col., 2010). Outros tipos de estratégia de liberação modificada serão abordados a seguir.

Torna-se oportuno esclarecer a classificação dessas nanoestruturas em termos de composição e mecanismo de liberação intracelular, que se dá em cinco tipos: (i) lipossomas convencionais, sem reatividade específica; (ii) lipossomas sensíveis ao pH, que mudam sua estrutura após algum tipo de interação; (iii) lipossomas catiônicos; (iv) imunolipossomas ou de reatividade específica, o que também ocorre pela presença de um determinado ligante; e (v) lipossomas de longa circulação ou estericamente estabilizados (SHARMA e SHARMA, 1997; LASIC, 1997).

O método de hidratação do filme lipídico é a forma mais comum de preparação de lipossomas. Inicialmente, fármaco(s) e lipídios (fosfolipídios e colesterol, por exemplo) são dissolvidos em solventes orgânicos, como clorofórmio e etanol. A seguir, o solvente é removido, o que leva à formação do filme contendo fármacos e lipídios na parede do frasco. Depois, o filme é hidratado com tampões aquosos, e a leve agitação do frasco resulta em suspensões lipossomais leitosas homogêneas. Assim são produzidos MLVs. Para essas formulações serem administradas por via intravenosa, é necessária redução posterior do tamanho das

vesículas (LI; ZHAO, 2007). Isso pode ser conseguido fornecendo energia para o sistema, através da sonicação ou da extrusão (CAGDAS e col., 2011).

2.2 COENCAPSULAÇÃO DE FÁRMACOS E COMBINAÇÃO DO PACLITAXEL COM O IMATINIBE

2.2.1 Coencapsulação de fármacos em nanossistemas

O tratamento quimioterápico em monoterapia frequentemente resulta em menor sobrevida em comparação com terapias combinadas, que incluem mais que um agente antitumoral (URAMOTO e col., 2010). Por isso, na terapia do câncer, frequentemente mais que um princípio ativo é administrado. Em muitos casos clínicos já foi reportado que combinações de fármacos podem efetivamente superar a resistência que ocorre quando a administração é feita em monoterapia, melhorar a taxa de resposta a esses fármacos e até mesmo causar efeito sinérgico. Existe ainda a possibilidade de redução da toxicidade sistêmica (CHEN e col., 2009a; MI e col., 2013; TARDI e col., 2007).

De forma antagônica, quando administrados separadamente, é difícil controlar a quantidade desses agentes quimioterápicos que efetivamente chega até as células tumorais, uma vez que cada fármaco tem distribuição e clearance típicos, independentes, e segue seu perfil farmacocinético característico. Por isso, a razão entre as quantidades inicialmente administradas dos fármacos não é mantida, prejudicando a efetividade da combinação, podendo também perder o sinergismo (MAYER e col. 2006; MENDONÇA e col., 2010; SHAIKH e col., 2013).

A quantidade de fármaco que chega até o seu sítio de ação é extremamente importante, uma vez que os fármacos exercem efeitos múltiplos com diferentes relações entre concentração e atividade e muitas vezes as vias moleculares associadas a esses efeitos possuem o potencial de interagir. Por isso, possivelmente a forma como as combinações de fármacos exercem seus efeitos antitumorais depende da razão entre os quimioterápicos que são combinados. A eficácia terapêutica depende diretamente, portanto, do controle dessa razão, o que pode ser determinado e otimizado por estudos pré-clínicos (MAYER e col., 2006).

No contexto da nanotecnologia, o emprego de formulações lipossomais separadas, cada uma com um fármaco, causaria grande dificuldade de prever e controlar a taxa de liberação de cada um deles dentro das células e

consequentemente de obter as razões molares desejadas em nível intracelular. Além disso, entregar fármacos contidos em lipossomas distintos iria requerer o uso de concentrações mais altas de lipídios, o que pode induzir efeitos citotóxicos inespecíficos (MENDONÇA e col., 2010).

Quando se usam estratégias de coencapsulação em um sistema de liberação, como lipossomas peguilados, capaz de manter a mesma proporção entre os fármacos desde o sítio de administração até as células tumorais, esse problema é superado, uma vez que ocorre entrega simultânea às células tumorais em proporções definidas (MENDONÇA e col., 2010; ZUCKER e BARENHOLZ, 2010). A farmacocinética dos princípios ativos co-formulados vai ser ditada pelo comportamento farmacocinético do sistema carreador usado, oferecendo potencial de coordenar a eliminação plasmática e a distribuição tissular, otimizando a atividade terapêutica a partir de combinações de dois ou mais fármacos (ABRAHAM e col., 2004; TARDI e col., 2007).

Em estudo *in vivo*, observou-se que os lipossomas com fármacos coencapsulados mantiveram a proporção sinérgica de irinotecan e doxorubicina (1:1) no plasma. Em contraste, a combinação administrada na forma livre não manteve essa razão. Nesse caso, a combinação torna-se ineficiente, o que está de acordo com o que já foi explanado acima. Através da coencapsulação lipossomal, a exposição celular à combinação de doxorubicina e irinotecan cresceu substancialmente, o que foi atribuído à capacidade do carreador lipossomal de controlar o comportamento farmacocinético dos fármacos encapsulados (SHAIKH e col., 2013).

Em outro exemplo (JAIN e col., 2013), a combinação entre tamoxifeno e quercetina em nanopartículas aumentou a biodisponibilidade oral dos fármacos co-formulados, resultando em maior acúmulo tumoral. Os mesmos pesquisadores, através de testes de citotoxicidade usando as linhagens tumorais MCF7 e Caco-2, mostraram ainda que a viabilidade celular foi menor para as combinações dos fármacos na forma livre e em nanopartículas em comparação com os fármacos isolados. Além disso, as substâncias ativas sofreram internalização mais eficiente quando nanoencapsulados em comparação com suas formas livres (JAIN e col., 2013).

Quando a doxorubicina foi combinada à vincristina (ABRAHAM e col., 2004), porém, foi observado que ocorria efeito antagônico entre os fármacos, e os fármacos

coencapsulados não apresentaram melhora terapêutica em comparação com a vincristina *in vivo*. Já em combinação com o verapamil (WANG e col., 2005), também em formulação lipossomal, foi obtida a reversão da resistência à exposição à doxorubicina. Nesse caso, o verapamil foi usado para reverter o mecanismo de resistência associado ao efluxo por glicoproteína-P.

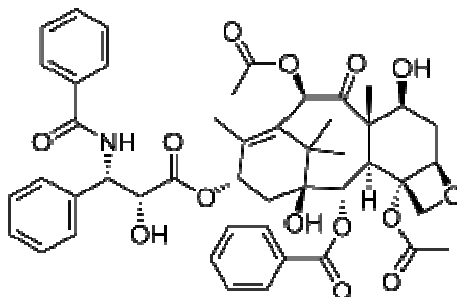
Já foi idealizado um sistema de liberação nanométrico que compreende um envelope externo, fosfolipídico, que contém o agente antiangiogênico e, por ser externo, libera-o mais rapidamente, causando interrupção do fluxo sanguíneo, e uma nanopartícula interna, que fica presa dentro do tumor, e em seguida libera o agente quimioterápico de maneira lenta, matando as células tumorais. Essa exposição prolongada ao agente citotóxico aumenta o potencial apoptótico, o que pode superar a resistência celular induzida por hipóxia. Tudo isso concorre para melhora do índice terapêutico e redução da toxicidade (SENGUPTA e col., 2005). Estratégia semelhante em termos de liberação já foi desenvolvida por Mendes e colaboradores (2013) em nosso grupo de pesquisa. Neste estudo, foi observada expressiva inibição tumoral e redução dos níveis de VEGF *in vivo*.

Seguindo essa mesma lógica, a associação entre doxorubicina e combretastatina em lipossomas inibiu a proliferação de tumores em roedores muito mais do que os lipossomas contendo os fármacos encapsulados individualmente (ZHANG e col., 2010). Por isso, para o desenvolvimento deste trabalho foram selecionados dois fármacos, um citotóxico, o paclitaxel, e um antiangiogênico, o imatinibe.

2.2.2 Farmacologia do Paclitaxel e do Imatinibe

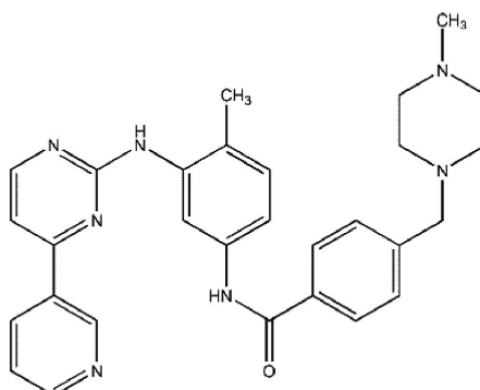
O paclitaxel (Figura 3) possui atividade contra vários tipos de câncer que são considerados resistentes às terapias convencionais, notadamente os cânceres de ovário e mama. Esse fármaco atua no processo de divisão celular, polimerizando a tubulina. Assim, os microtúbulos formados tornam-se altamente estáveis e disfuncionais, causando o rompimento das células através da alteração da dinâmica normal dos microtúbulos requerida para o processo de divisão celular (ROWINSKY e DONEHOWER, 1995).

O paclitaxel tem peso molecular 853,91 Da, fórmula molecular $C_{47}H_{51}NO_{14}$. O pKa do fármaco é 10,36, enquanto seu LogP é 3,54 (DrugBank).

Figura 3. Estrutura química do Paclitaxel

O desafio no caso da terapia com o paclitaxel é manter o equilíbrio entre eficácia terapêutica e toxicidade. Sabe-se que o fármaco pode causar granulocitopenia e neuropatia (MIELKE e col., 2005). Além disso, como o paclitaxel é extremamente insolúvel em água (solubilidade 5,56 µg/mL, segundo o DrugBank), a formulação comercial disponível emprega um solvente que contém óleo de rícino polietoxilado para promover a solubilização do fármaco. A presença desse solvente pode ocasionar severas reações de hipersensibilidade, o que conduz à necessidade do desenvolvimento de uma formulação mais adequada contendo o paclitaxel, principalmente menos tóxica e conseqüentemente melhor tolerada (ZHANG e col., 2005).

O imatinibe (Figura 4), além de sua reconhecida utilização no tratamento da leucemia mieloide crônica, já demonstrou grande espectro de atividade antitumoral.

Figura 4. Estrutura química do Imatinibe.

O seu mecanismo de ação está relacionado à inibição competitiva da ligação do ATP ao sítio de tirosinas quinases (família de proteínas homólogas que regulam vias de transdução de sinal intracelulares). Através desse mecanismo, são inibidas

várias formas oncogênicas da tirosina quinase Bcr-Abl. O gene Bcr-Abl é resultado de uma fusão decorrente de anomalia genética. É uma tirosina quinase que ativa várias vias que regulam a hematopoese, aumentando a proliferação de células da leucemia mieloide crônica. Além do referido mecanismo farmacológico de ação, que está associado ao tratamento da leucemia, o fármaco também é capaz de inibir a angiogênese induzida por VEGF e PDGF, sendo conseqüentemente usado para o tratamento de tumores sólidos (BUCHDUNGER e col., 2002; PENG e col., 2005).

O peso molecular do fármaco é 493,60 Da, sua fórmula molecular é $C_{29}H_{31}N_7O$, o LogP é 4,36 e o pKa 8,27 (DrugBank). Em condições fisiológicas, pH 7,4, é apenas moderadamente solúvel, e praticamente insolúvel em pH 8 (PENG e col., 2005).

2.2.3 Combinação do Paclitaxel com o Imatinibe

Em estudo *in vitro*, a combinação de paclitaxel (na sua concentração IC_{50}) e imatinibe (2 μM) causou diminuição significativa da proliferação celular em quatro linhagens de câncer de ovário em comparação com o grupo tratado apenas pelo agente citotóxico, e esse efeito foi mais intenso aumentando a concentração do imatinibe a 4 μM . Aumentando mais ainda a concentração de imatinibe não houve maior inibição da proliferação celular. Esse mesmo fármaco isolado (3 a 5 μM) reduziu a proliferação celular de cinco linhagens de câncer de ovário em 50% comparado com o grupo controle (MUNDHENKE e col., 2008). A IC_{50} do paclitaxel, testada pelo método MTT, diminuiu na presença do imatinibe em outro experimento (APTE e col., 2004) com linhagens de câncer de ovário. *In vivo*, o paclitaxel foi administrado por via intraperitoneal (125 μg) e o imatinibe por via oral (50 mg/kg). O paclitaxel sozinho reduziu o peso do tumor e eliminou a ascite. A combinação com o imatinibe reduziu a incidência, diminuiu mais ainda o peso tumoral e também eliminou a ascite. A diferença em relação ao grupo tratado apenas com paclitaxel foi significativa estatisticamente (APTE e col., 2004).

Pacientes com câncer de ovário, tratados com a mesma combinação (300 mg de imatinibe por via oral e 80 mg/m² de paclitaxel por via intravenosa), sob diferentes posologias, apresentaram, em alguns casos, pronunciados efeitos adversos, como neutropenia e trombocitopenia (SAFRA e col., 2010). Em outro experimento realizado em humanos (MATEI e col., 2008), foi feita a associação entre outro quimioterápico do grupo dos taxanos, o docetaxel (30 mg/m², via intravenosa) e o

imatinibe (600mg, via oral). Não foi demonstrado benefício em relação ao docetaxel isolado para o tratamento do câncer epitelial ovariano (MATEI e col., 2008).

Esses resultados observados em humanos, porém, não diminuem o interesse por essa combinação, uma vez que a ativação do receptor para PDGF é um fator importante para a progressão do câncer de ovário. O bloqueio da fosforilação do PDGF-R, em combinação com a apoptose induzida pelo paclitaxel, é capaz de reduzir o crescimento tumoral *in vivo* através de mecanismo de ação antivascolar (APTE e col., 2004).

Em outro modelo tumoral, de melanoma, verificou-se inibição do crescimento tumoral em camundongos, quando imatinibe e valatanibe foram combinados ao paclitaxel em dose pequena, 5 mg/kg, o que não ocorreu quando o agente citotóxico foi combinado com cada um dos inibidores de tirosina quinase separadamente. Isso é interessante uma vez que a dose 20 mg/kg do paclitaxel não afetou o crescimento tumoral. No mesmo trabalho, os autores testaram a sensibilidade da mesma linhagem celular de melanoma tratada com paclitaxel (1 nM) isolado e em combinação com o imatinibe (1 μ M). Apenas na combinação houve inibição do crescimento celular (KLOSOWSKA-WARDEGA, 2011).

Em modelo animal de câncer de pulmão de células não pequenas o imatinibe foi administrado por via oral (100 mg/kg) e o docetaxel por via intraperitoneal (10 mg/kg). A eficácia antitumoral foi melhorada quando os dois fármacos foram combinados em comparação com as suas administrações isoladas (VLAHOVIC e col., 2007).

Outro estudo que chama a atenção, feito em humanos, para tratamento de tumores sólidos resistentes à quimioterapia (principalmente de mama, colorretal e sarcoma de tecidos moles), compreendeu administração oral de imatinibe, 400 mg, e infusões semanais de paclitaxel, 60 mg/m². O grau e a severidade dos efeitos colaterais foram muito maiores que o esperado, particularmente se for levado em consideração que os pacientes receberam dose semanal de paclitaxel menor que a usual. Dentre esses efeitos adversos podem ser citados náusea/vômito, diarreia, anemia, neutropenia, edema periférico (PISHVAIAN e col., 2012). Isso está de acordo com o que já foi mencionado anteriormente em relação ao tratamento do câncer de ovário (SAFRA e col., 2010). O perfil farmacocinético do IB e do PTX administrados em combinação não foi alterado quando comparado à administração individual desses fármacos (PISHVAIAN e col., 2012). Em termos farmacodinâmicos,

os autores supõem que o imatinibe aumenta a eficácia de quimioterápicos ao diminuir a pressão do fluido intersticial no tumor, o que aumentaria a entrega do agente citotóxico a células cancerosas, independentemente da expressão tumoral de Bcr-Abl. Essas observações são baseadas em estudos *in vivo* (PIETRAS e col., 2002; PISHVAIAN e col., 2012). Dentre os pacientes de um desses estudos, 47,4% tiveram benefício clínico após receberem a terapia combinada (IB por via oral + PTX intravenoso), e no restante deles o tumor no mínimo permaneceu estável. Nesse caso, como a distribuição dos fármacos é inespecífica, explica-se o fato de o aumento dos benefícios terapêuticos ser acompanhado pelo aumento da intensidade dos efeitos adversos (PISHVAIAN e col., 2012).

Em modelo tumoral de próstata (linhagem PC3) em roedores o imatinibe foi administrado por via oral (50 mg/kg) e o paclitaxel por via intraperitoneal (10 mg/kg). O paclitaxel isolado reduziu o peso e o volume do tumor, além de ter diminuído o número de linfonodos retroperitoneais metastáticos, possivelmente pela redução da proliferação de células tumorais. O imatinibe, também em monoterapia, porém, não inibiu o crescimento tumoral ou o desenvolvimento de metástase no experimento realizado. A combinação entre os dois fármacos não melhorou significativamente a eficácia do agente citotóxico, o que pode ser atribuível à pequena dose de imatinibe (CORCORAN e COSTELLO, 2005).

Ainda em relação ao câncer de próstata, células de uma linhagem resistente ao paclitaxel foram implantadas na tíbia de ratos e os tratamentos foram feitos após 14 dias, imatinibe por via oral (50 mg/kg) e paclitaxel por via intraperitoneal (8 mg/kg). Os ratos tratados apenas com o agente citotóxico desenvolveram grandes tumores e tiveram metástase em linfonodos. Porém, quando foi feita a associação com o imatinibe, a incidência e o peso do tumor, assim como a metástase em linfonodos, foram reduzidos. A lise da tíbia foi pronunciada no grupo controle e no grupo tratado apenas com paclitaxel, diminuída nos animais tratados com imatinibe e menor ainda quando os dois fármacos foram combinados. *In vitro*, porém, a proliferação celular não foi afetada pelo paclitaxel, mesmo na presença do imatinibe (KIM e col., 2006).

Como se pode perceber, a combinação entre imatinibe e paclitaxel tem sido explorada na literatura e já demonstrou potencial *in vivo* para o tratamento de tumores sólidos. Falta, ainda, definir uma estratégia eficiente para que sejam evitados os efeitos colaterais e para que os fármacos alcancem o tumor em

concentrações bem definidas. Conforme já foi discutido anteriormente, isso pode ser conseguido através da nanotecnologia.

2.3 ESTRATÉGIAS PARA DIRECIONAMENTO DE FÁRMACOS

2.3.1 Vetorização Passiva

Para a maioria dos medicamentos em uso atualmente, a especificidade e a ação dos fármacos em sítios de doenças ou sobre doenças específicas é usualmente baseada na sua habilidade de interferir no processo patológico local ou em vias biológicas defeituosas, mas não no seu acúmulo seletivo em compartimento intracelular específico ou em célula, órgão ou tecido alvo (TORCHILIN, 2010).

Esses referidos medicamentos parenterais tradicionais são distribuídos quase que aleatoriamente em todo o organismo, proporcionalmente ao fluxo sanguíneo da região, e para alcançar o sítio da doença o fármaco tem que cruzar muitas barreiras biológicas (mucosa, epitélio, endotélio), podendo causar efeitos colaterais indesejáveis ou ser inativado por ação enzimática. Muitos desses agentes sofrem ainda rápida eliminação da circulação sanguínea pelo processo de filtração renal. Consequentemente, para atingir a concentração terapêutica no local necessário, o fármaco deve ser administrado em concentrações altas, e por isso grande parte da substância ativa é entregue em tecidos normais, que não estão envolvidos no processo patológico. Isso aumenta o custo da terapia e a severidade dos efeitos colaterais (HILLAIREAU e COUVREUR, 2009; KOSHKARYEV e col., 2013; MAEDA e col., 2013; MASSING e FUXIUS, 2000; TORCHILIN, 1996; TORCHILIN, 2010).

O direcionamento de fármacos pode significar a solução para todos esses problemas. Em linhas gerais, essa estratégia pode ser entendida como a possibilidade de o princípio ativo acumular-se no tecido alvo quantitativa e seletivamente, independentemente do sítio ou método usado para sua administração. Idealmente, sob tais condições, a concentração local do agente terapêutico no sítio da doença deve ser alta, enquanto sua concentração em outros órgãos que não são alvo deve estar abaixo de certos níveis mínimos para prevenir quaisquer reações colaterais negativas. As seguintes vantagens são evidentes: os protocolos de administração podem ser simplificados; a quantidade de fármaco requerida para atingir efeito terapêutico pode ser grandemente reduzida, assim como o custo da terapia; e a concentração de fármaco nos sítios desejados pode ser

aumentada sem efeitos adversos em outros compartimentos do organismo (TORCHILIN, 1996; TORCHILIN, 2010).

Pensando nesses objetivos terapêuticos, foram feitas algumas tentativas no sentido de otimizar a terapia, dentre elas administrar fármacos diretamente na área afetada, encapsular o fármaco em carreadores sensíveis a valores específicos de pH ou temperatura típicos das áreas patológicas, ou mesmo usar forças externas, como campo magnético ou ultrassom, para guiar os fármacos ao alvo. Esses carreadores mudam suas propriedades e liberam o conteúdo encapsulado quando entram em contato com áreas de pH baixo ou temperatura alta, característicos de regiões patológicas. Dessa forma, o carreador distribui-se de maneira homogênea, mas degrada-se e libera o fármaco apenas na área alvo. Além disso, essa área pode ser adicionalmente aquecida pelo lado de fora, aplicando-se calor externo ou ultrassom. Campo magnético aplicado externamente também pode ser usado para a entrega direcionada de fármacos. Nesse caso, o fármaco deve estar encapsulado em carreador que tem propriedades ferromagnéticas, ocasionando acúmulo na área onde o campo magnético externo é aplicado (TORCHILIN, 2010).

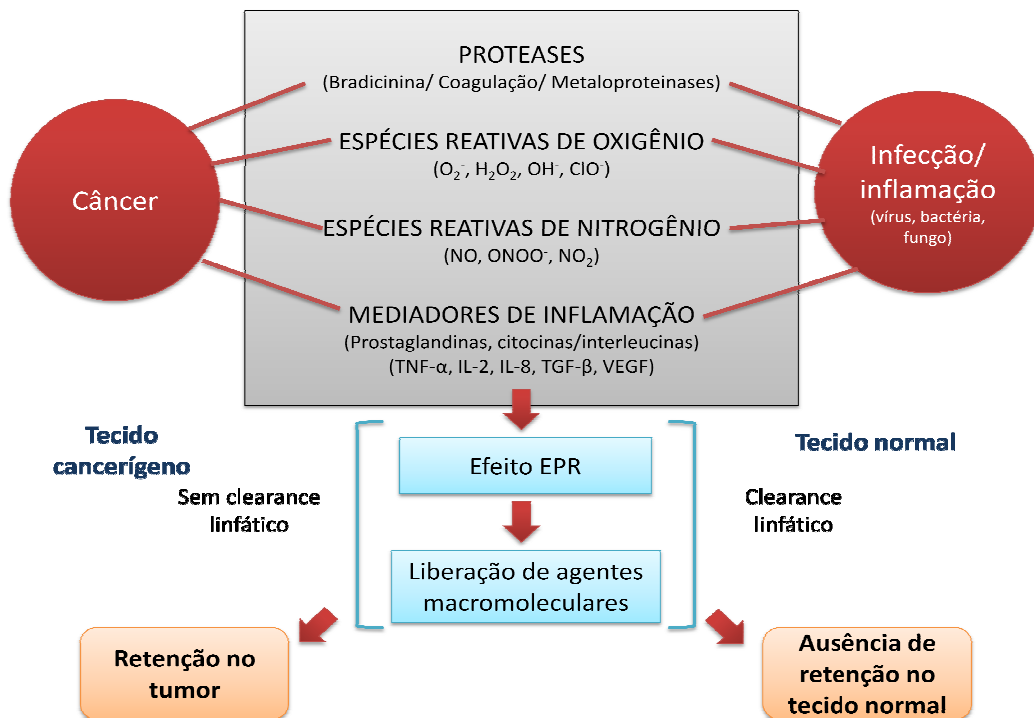
Porém, essas abordagens possuem limitações, uma vez que os valores de pH e temperatura em áreas tumorais não diferem drasticamente dos tecidos normais e o fluxo de sangue variável pode atrapalhar a entrega via campo magnético. Assim, uma estratégia amplamente utilizada na Nanotecnologia farmacêutica é o acúmulo passivo de muitos carreadores devido ao seu extravasamento através da porosidade alterada dos vasos tumorais (chamado Efeito Aumentado de Permeabilidade e Retenção, *EPR – Enhanced Permeability and Retention*, do inglês). Isso funciona muito bem para tumores e áreas de inflamação, para atingir acúmulo seletivo. Esse processo, que é aleatório, é chamado “vetorização passiva” acoplada à “permeabilidade aumentada”. O uso nanocarreadores ligados a moléculas sinalizadoras (ligantes que possuem alta afinidade por áreas alvo), por sua vez, pode direcionar fármacos encapsulados para sítios específicos do organismo (LOI e col., 2010; MAEDA e col., 2013; MARUYAMA, 2010; PARK e col., 2004; TORCHILIN, 2010).

Vantagens da circulação prolongada de carreadores de fármacos no sangue incluem a possibilidade de manter a concentração requerida do fármaco por longo tempo após uma única administração; a habilidade de usar o efeito EPR para acúmulo de moléculas ativas em áreas de vasos porosos; e a possibilidade de

melhorar o direcionamento mediado por ligante para áreas de fluxo sanguíneo limitado e/ou baixa concentração de antígeno alvo, onde é necessário um período maior para permitir que quantidade suficiente de fármaco chegue à zona alvo (TORCHILIN, 2011).

O efeito EPR, como se pode perceber, é baseado em características observadas na região tumoral (Figura 5).

Figura 5. Vários mediadores vasculares comumente encontrados na inflamação e no câncer que contribuem para o efeito EPR. A diferença principal entre os dois processos patológicos é a taxa de clearance, que faz com que haja retenção prolongada no tecido tumoral em comparação com o inflamatório. Adaptado de MAEDA e col., 2013.



Hoje em dia é um fenômeno bem estabelecido que sob certas circunstâncias (inflamação/hipóxia, primeiramente, que são típicas de tumores e outros sítios patológicos) o vaso sanguíneo torna-se mais permeável do que no estado normal. Isso ocorre devido à angiogênese rápida e defeituosa, resultante da alta produção de reguladores como fatores de crescimento (prostaglandinas, VEGF), proteases, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e metaloproteinases matriciais, que tornam os vasos altamente desorganizados e dilatados (MAMOT e col., 2003; PARK e col., 2004; PEER e col., 2007; TOMASINA e col., 2013; TORCHILIN, 2011).

Nos tumores que crescem no microambiente subcutâneo, os poros, dependendo do tipo de tumor, variam de tamanho entre 200 nm e 1,2 μm , o que é bastante reduzido quando o tumor cresce no microambiente craniano. Na maioria

das vezes, a variação característica oscila entre 380 e 780 nm (HOBBS e col., 1998). Em se tratando da fisiologia normal, endotélio fenestrado aparece em glândulas, mucosa digestiva e rins, com poros de aproximadamente 60 nm. Endotélio descontínuo é característico do fígado (fenestrações de 50-100 nm) e medula óssea (HARUSH-FRENKEL e col., 2008).

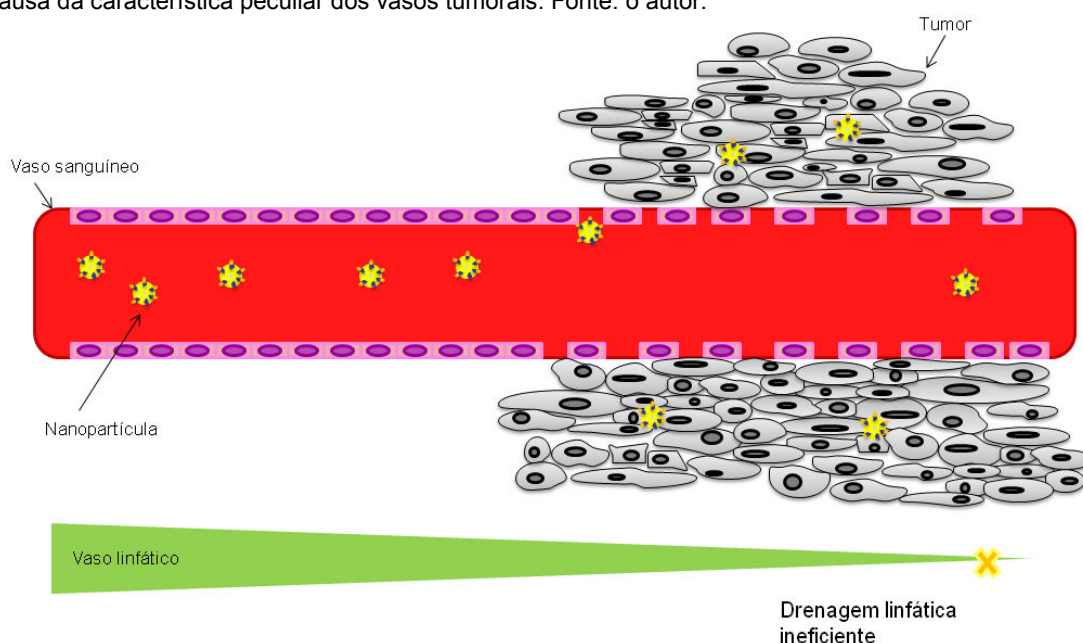
Isso resulta em ausência ou descontinuidade da membrana basal vascular em tumores, o que pode facilitar o extravasamento e aumentar a permeabilidade dos vasos tumorais a agentes macromoleculares e lipossomas. Nessas áreas, moléculas grandes e certas partículas ou vesículas variando entre 10 e 500 nm em tamanho podem deixar o leito vascular e acumular-se no espaço intersticial. Depois de cruzar o endotélio vascular, nanoestruturas podem então cruzar a membrana basal em regiões descontínuas. Sua distribuição nos tumores ocorre por acúmulo perivascular. Depois que extravasam, as nanoestruturas formam aglomerados e não se movem significativamente no espaço intersticial tumoral, o que aumenta a retenção dos fármacos na região tumoral. Isso faz com que o fármaco fique disponível para as células tumorais vizinhas pelo período de alguns dias, garantindo a liberação local sustentada, que é especialmente importante depois que os fármacos encapsulados em lipossomas são removidos do plasma (MAMOT e col., 2003; PARK e col., 2004; TORCHILIN, 2011; YUAN e col., 1994).

Posteriormente a esse processo, ocorre a entrada das vesículas nas células por duas vias principais: fagocitose ou endocitose (mediada por clatrina e caveolina). Por uma série de mecanismos de fusão e fissão, a membrana do fagossomo funde-se com lisossomas para formar o fagolisossomo, onde ocorre a degradação das nanoestruturas e liberação de seu conteúdo. A endocitose mediada por clatrina e caveolina, por sua vez, ocorre constitutivamente em todas as células de mamíferos, servindo como mecanismo principal de captura de macromoléculas e constituintes da membrana plasmática. Esse é o processo melhor descrito para o que se conhece como endocitose mediada por receptor. O material endocitado termina posteriormente em lisossomas, sendo o nanocarreador posteriormente biodegradado, o que promove a liberação intracelular de seu conteúdo (Figuras 6 e 7) (HARUSH-FRENKEL e col., 2008; HILLAIREAU e COUVREUR, 2009).

Os lipossomas peguilados se acumulam lentamente nos tumores por causa das características mostradas na Figura 6, através do fluxo sanguíneo normal e ocasional processo de difusão. A via principal de transporte transendotelial de

lipossomas peguados em tumores são os grandes espaços entre as células endoteliais. Outra possibilidade de extravasamento, em menor escala, é por meio de vesículas transendoteliais e/ou vacúolos (MAMOT e col., 2003; MARUYAMA, 2010; YUAN e col., 1994).

Figura 6. Representação esquemática do efeito EPR, evidenciando o acúmulo de lipossomas na região tumoral por causa da característica peculiar dos vasos tumorais. Fonte: o autor.



Para que seja conseguido o efeito EPR, porém, os lipossomas devem ser estabilizados para circulação prolongada, recobrando-os com polietilenoglicol-fosfatidiletanolamina (PEG-PE). Essa estratégia é essencial para evitar uma das desvantagens do uso de lipossomas convencionais, que é a sua rápida eliminação da corrente sanguínea e captura pelas células do sistema retículo endotelial (SRE), primariamente no fígado. Essa captura acontece através da ligação (opsonização) de proteínas do plasma, como fatores do complemento ou anticorpos (opsoninas), à bicamada de fosfolípidos do lipossoma. Quando opsonizados, os lipossomas são rapidamente reconhecidos pelas células do SRE e fagocitados (BANERJEE, 2001; GÓMEZ-HENS e FERNÁNDEZ-ROMERO, 2006; MASSING e FUXIUS, 2000; SAWANT e TORCHILIN, 2010; TORCHILIN, 1996; TORCHILIN, 2010). A proteção conferida pelo PEG-PE, polímero hidrofílico e neutro, que aumenta o tempo de circulação da nanoestrutura, faz com que ela passe pelo vaso sanguíneo recém-formado e defeituoso repetidas vezes, aumentando a eficiência do extravasamento e o acúmulo no tecido tumoral (KOSHKARYEV e col., 2013; TORCHILIN, 2005).

2.3.2 Vetorização ativa

As características de cada partícula diferem em termos de capacidade de carga de fármaco, estabilidade do fármaco e da partícula, taxas de liberação e capacidade de liberação direcionada. Essa modalidade de liberação é viável porque a superfície dos nanomateriais pode ser decorada com grande variedade de moléculas capazes de interagir com marcadores biológicos, como anticorpos, com vistas à vetorização ativa de fármacos. Para tanto, é preciso compreender a biologia molecular e os marcadores celulares presentes em tecidos tumorais, ou seja, a interação entre o ligante presente na superfície da nanopartícula e o seu alvo específico, um receptor. A liberação direcionada do fármaco em um tecido cuja penetração e distribuição poderia não ocorrer torna-se possível através de estratégias do tipo “cavalo de Troia”, que implicam no acoplamento de moléculas para o biorreconhecimento que irão provocar a internalização celular de toda a carga de fármaco presente na nanopartícula. Assim, o objetivo é que as propriedades do agente terapêutico, encapsulado em alta carga, sejam mascaradas, evitando que ele fique sujeito a mecanismos de resistência. Essas estratégias têm sido utilizadas em muitas aplicações médicas, desde o transporte através da barreira hematoencefálica, vetorização de fármacos a células tumorais e localização em tecidos vasculares (ANTONY, 1996; FARAJI e WIPF, 2009; HALEY e FRENKEL, 2008).

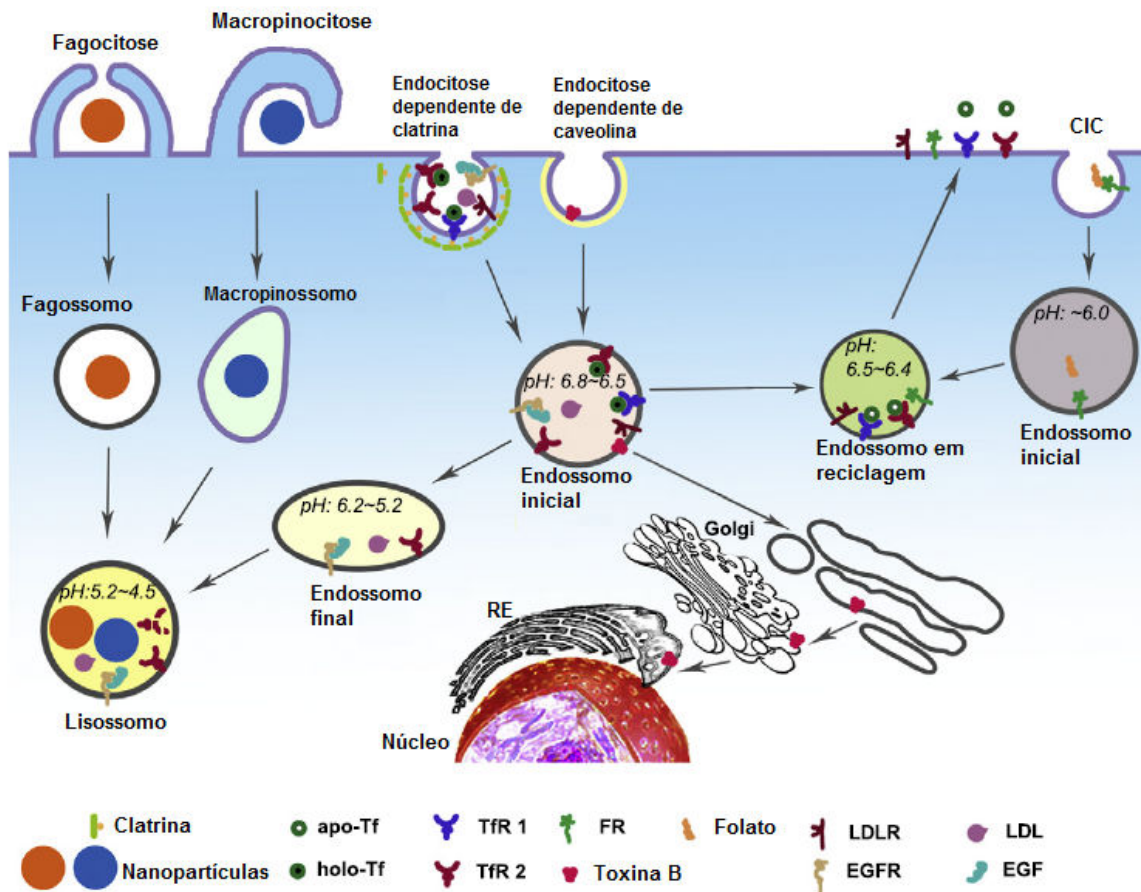
Conseqüentemente, para reduzir as dificuldades causadas pela terapia convencional do câncer, décadas de pesquisa têm se focado no desenvolvimento de fármacos específicos para o câncer ou sistemas de liberação que podem direcionar preferencialmente agentes já existentes para o sítio tumoral. O interesse pelo direcionamento a receptores visando à captura seletiva e a internalização de fármacos expandiu-se, ainda mais, no início do século XXI, com o advento de novos fármacos macromoleculares, incluindo DNA, peptídeos e proteínas, por causa de suas limitações no sentido de atingir alvos vesiculares ou citosólicos. Nesse âmbito, as estratégias de vetorização associadas à nanotecnologia são promissoras, pela possibilidade de aumento da especificidade ao sítio de ação e de sucesso da internalização de quimioterápicos. Isso diminui a possibilidade de efeitos adversos sérios que são enfrentados pelos pacientes, aumentando o tempo de sobrevivência e sua qualidade de vida (MOHANTY e col., 2011; XU e col., 2013).

Aqui se faz importante relacionar as explicações dadas no item anterior a respeito dos lipossomas peguilados, usados na estratégia de vetorização passiva, à entrega de fármacos por vetorização ativa. Os lipossomas peguilados tornaram possível o desenvolvimento de partículas vetor-conjugadas uma vez que podem ser combinados com um vetor de interesse através de ferramentas como a síntese orgânica, por exemplo. Essas chamadas âncoras funcionalizadas ligadas a uma molécula para biorreconhecimento podem ser inseridas à nanoestrutura posteriormente à preparação do lipossoma. A concentração de ligantes na superfície das nanopartículas oferece potencial para fortes interações celulares (GABIZON e col., 1999; HUWYLER e col., 2008; SINHA e col., 2006; WANG e col., 2008).

A vetorização ativa é normalmente conseguida, portanto, conjugando a nanopartícula a um componente de direcionamento que confere acúmulo preferencial no tecido tumoral, dentro de células tumorais individuais, organelas intracelulares ou a ligação a moléculas específicas nas células tumorais. Essa abordagem é usada para direcionar nanopartículas a carboidratos, receptores e antígenos de superfície celular. Os alvos ideais são aqueles abundantemente e unicamente expressos nas células tumorais, mas que têm expressão irrisória ou pequena nas células normais. O antígeno ou receptor alvo deve também ter alta densidade na superfície das células tumorais alvo. Espera-se que a incorporação de uma âncora de vetorização resulte na entrega seletiva de fármacos a esse tecido com maior eficiência, o que se traduz no controle do tráfico intracelular de nanocarreadores. Assim, a tendência é a maximização da eficácia terapêutica e a redução dos efeitos colaterais sistêmicos (HILLAIREAU e COUVREUR, 2009; LEAMON e col., 2008; MARCUCCI e LEFOULON, 2004; NIE e col., 2007; SINHA e col., 2006; WANG e col., 2008).

Essa estratégia de direcionamento molecular baseia-se na ideia de que nanocarreadores contendo ligantes serão internalizados pela mesma via que o ligante sozinho seria. Os nanocarreadores reconhecem e ligam-se a células alvo através de interações ligante-receptor, desencadeando o processo de endocitose mediada por receptor (Figura 7), e os carreadores ligados são internalizados antes que o fármaco seja liberado (HILLAIREAU e COUVREUR, 2009; MOHANTY e col., 2011; PEER e col. 2007; SINHA e col., 2006; XU e col., 2013).

Figura 7. Vias distintas para entrada de material em células. A fagocitose envolve receptores de superfície e o englobamento de partículas grandes pela membrana plasmática. A macropinocitose envolve a captura de proteínas solúveis junto com fluido extracelular. Endocitose dependente de clatrina envolve a montagem de clatrina unida a adaptador proteico em região da membrana plasmática na qual determinados receptores estão aglomerados para formar uma vesícula nova destinada à internalização. Endocitose dependente de caveolina envolve a montagem de revestimentos de caveolina em regiões da membrana plasmática ricas em estruturas lipídicas peculiares para formar uma vesícula nova destinada à internalização. CIC envolve a endocitose com participação de proteínas ancoradas na membrana, e tende a formar também o endossomo inicial. São transportadores independentes de clatrina. RE: Retículo Endoplasmático; Tf: transferrina, TfR: receptor para transferrina; FR: receptor para o ácido fólico; LDL: lipoproteína, LDLR: receptor para lipoproteína; EGF: fator de crescimento epidermal, EGFR: receptor para o fator de crescimento epidermal. Adaptado de Xu e col. (2013).



Os receptores ou antígenos devem ser reciclados e ocupar seu lugar na superfície celular depois que a liberação do fármaco se completar. Esse formato de entrega de fármacos incorpora três moléculas essenciais: polímeros aos quais o fármaco pode ser conjugado; ligantes ou anticorpos conjugados, que ligam-se com alta afinidade à superfície celular tumoral; e receptores ou antígenos, respectivamente (SINHA e col., 2006).

Esses veículos desenvolvidos devem reconhecer características biofísicas únicas das células tumorais. Essa metodologia proporciona excelentes oportunidades em oncologia, na qual os receptores (biomarcadores proteicos/antígenos) são usados para diagnosticar e tratar o câncer. Muitas vias de sinalização oncogênica convergem para adaptar o metabolismo celular tumoral para

suprir seu crescimento e sobrevivência. Além disso, algumas dessas alterações metabólicas parecem ser absolutamente necessárias para a transformação em tumor maligno (CAIRNS e col., 2011; MOHANTY e col., 2011).

Múltiplos mecanismos moleculares, intrínsecos e extrínsecos, convergem para alterar o metabolismo celular basal e fornecer suporte para três necessidades básicas de células em divisão: geração rápida de ATP para manter o status de energia, dando suporte à rápida divisão celular; biossíntese aumentada de macromoléculas; manutenção do status redox apropriado. Para atingir essas necessidades, as células tumorais sofrem alterações no metabolismo de todas as quatro classes principais de macromoléculas: carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. O conhecimento desses processos permite identificar as fragilidades das vias metabólicas tumorais possibilitando o uso de estratégias de vetorização ativa (CAIRNS e col., 2011; CANTOR e SABTINI, 2012).

A seleção do receptor ou antígeno celular apropriado é crucial para o desenvolvimento de nanopartículas vetorizadas. O direcionamento baseia-se, portanto, em biomarcadores com expressão modificada ou explora processos associados com o desenvolvimento tumoral como a neoangiogênese e a captura aumentada de nutrientes, conforme enunciado no parágrafo anterior. O fato de o nanoconjugado vetorizado poder ser internalizado após a ligação à célula alvo é outro critério importante na seleção de ligantes apropriados. Caso o anticorpo ou ligante não possa desencadear o processo de internalização, através de endocitose mediada pelo receptor, o fármaco pode entrar nas células através de difusão simples ou outro mecanismo de transporte depois de ser liberado do nanossistema próximo à superfície celular. Entretanto, fármaco liberado fora da célula pode dispersar-se ou redistribuir-se para os tecidos normais adjacentes em vez de exclusivamente para as células cancerosas (MOHANTY e col., 2011; TOMASINA e col., 2013; WANG e col., 2008).

A título de exemplo, em um conjugado ligado ao ácido fólico, quando ocorre ligação ao receptor folato na superfície celular, a membrana plasmática forma uma invaginação que envolve o complexo receptor-ligante para formar um endossomo. Os endossomos recém-formados são transferidos para organelas alvo. À medida que o pH no interior do endossomo torna-se ácido e as lisozimas são ativadas, o fármaco é liberado e chega ao citoplasma, desde que tenha as propriedades físico-químicas adequadas para atravessar a membrana endossomal. O receptor folato,

então liberado do conjugado, retorna à membrana celular para começar a segunda etapa de transporte ligando-se a novos conjugados contendo ácido fólico (MOHANTY e col., 2011).

Fazendo uma abordagem mais abrangente, esse e outros agentes de vetorização podem ser classificados em linhas gerais como proteínas (principalmente anticorpos e seus fragmentos), ácidos nucleicos ou outros ligantes para receptores (peptídeos, vitaminas e carboidratos) (PEER e col. 2007).

No caso da vitamina ácido fólico, há a vantagem de ter menor peso molecular e menor imunogenicidade que os anticorpos. Entretanto, por estar presente na dieta, possui naturalmente altas concentrações no corpo humano (WANG e col., 2008).

Infelizmente, muitos dos receptores úteis para direcionamento tumoral são frequentemente encontrados em grande variedade de tipos celulares. Isso ocorre com os receptores para ácido fólico, fator de crescimento epidermal e lipoproteínas. Porém, alguns desses receptores parecem ser parcialmente tumor-específicos, por exemplo, os receptores folato são altamente superexpressos na superfície de vários cânceres, incluindo ovariano, cerebral, renal, mamário e pulmonar, de endométrio e células mielóides de origem hematopoética. Por essa razão, muitas nanopartículas com alta afinidade pelos receptores folato estão atualmente em desenvolvimento (KANG e col., 2013; WANG e col., 2013).

Como o ácido fólico é uma vitamina essencial para a biossíntese de bases nucleotídicas, consumido em grandes quantidades por células em proliferação, o receptor folato é superexpresso em muitos tipos de câncer, particularmente no carcinoma ovariano. Além disso, a densidade do receptor folato aumenta à medida que o grau do câncer piora, enquanto o acesso aos receptores folato em tecidos normais que o expressam permanece limitado (PEER e col. 2007; TOMASINA e col., 2013).

Alguns exemplos de vetorização ativa podem ser tomados da literatura para demonstrar a eficiência dessa estratégia em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Lipossomas carregados com paclitaxel e direcionados ao receptor folato obtiveram IC50 menor do que partículas não-vetorizadas em teste *in vitro* realizado com a linhagem celular de carcinoma oral KB, com alta expressão de receptor folato (WU e col., 2006). Em outra pesquisa envolvendo lipossomas carregados com doxorubicina, houve resultados promissores também *in vivo*, apontando para o direcionamento mais eficiente do fármaco ocasionado pela presença do ácido fólico na superfície da

partícula (PAN e col., 2003). Nanopartículas lipídicas vetorizadas para o receptor folato contendo um pró-fármaco de paclitaxel mostraram citotoxicidade melhorada contra células tumorais *in vitro*, e elevada atividade antitumoral em modelo de carcinoma de pulmão em ratos (STEVENS e col., 2004).

Podem ser citadas ainda duas outras maneiras diferentes de direcionar fármacos para células específicas, uma compreendendo um fator de crescimento (EGF) e outra compreendendo um nutriente (ferro). Lipossomas biofuncionalizados direcionados ao EGFR (receptor para o fator de crescimento epidermal) também carregados com doxorubicina causaram citotoxicidade diferenciada em linhagem celular de câncer de mama que superexpressa o receptor (HWANG e col., 2010). No segundo caso, há o seguinte exemplo: a conjugação de nanopartículas à transferrina resultou em aumento da captura por linhagem celular *in vitro*, da retenção intracelular do paclitaxel e do efeito antiproliferativo em células MCF7 (SAHOO e LABHASETWAR, 2005). A transferrina é uma glicoproteína transportadora ligada ao ferro, um nutriente vital para os organismos vivos que é capturado pelas células por endocitose mediada por receptor (QIAN e col., 2002). Esses são alguns dos exemplos mais comuns de ligantes utilizados em nanotecnologia objetivando o reconhecimento de biomarcadores, para que seja atingida maior especificidade de entrega intracelular de fármacos e haja menor toxicidade: ácido fólico, fator de crescimento epidermal e transferrina (XU e col., 2012).

2.4 TERAPIA DO CÂNCER

O câncer é uma causa importante de mortalidade, comum em todas as partes do globo (mais de dez milhões de pessoas são diagnosticadas com a doença anualmente), e caracteriza-se pelo surgimento de células anormais que proliferam e se espalham de forma descontrolada. Inicialmente os cânceres começam como doenças localizadas, mas possuem a tendência de se espalhar para sítios distantes do tumor (metástase). É importante salientar que o câncer é passível de prevenção e frequentemente curável em países de alta renda, mas pode significar uma sentença de morte em muitos países de baixa e média renda. O diagnóstico em estágio inicial, antes que as células tumorais causem metástase, pode proporcionar ao paciente a possibilidade de recuperação plena (BHARALI e MOUSA, 2010; MISRA e col., 2010; SLOAN e GELBAND, 2007; WHO, 2005).

O envelhecimento rápido das populações é um importante fator para as tendências globais de câncer, assim como a dieta, o tabagismo, outras substâncias de abuso, e agentes infecciosos. Além desses aspectos relacionados ao estilo de vida, outras possíveis causas são fatores biológicos ou genéticos e fatores ocupacionais (ADAMI e col., 2001; KANAVOS, 2006; PARKIN e col., 2001).

Os tipos de câncer variam ao redor do mundo de acordo com o ambiente, a geografia e o padrão de vida. O cigarro tornou o câncer de pulmão o mais comum no mundo. Os cânceres de fígado e estômago e a maioria dos casos de câncer de colo do útero são causados por agentes infecciosos: a bactéria *Helicobacter pylori*, os vírus da hepatite B e C e o HPV, respectivamente (MISRA e col., 2010; SLOAN e GELBAND, 2007).

Diversos estudos mostram a relação do câncer de mama com os fatores de risco tabagismo, uso de hormônios pós-menopausa, menarca precoce, idade tardia da primeira gravidez e menopausa tardia. Tudo isso reflete o padrão hormonal com exposição a altos níveis de estrógenos endógenos, em particular o estradiol. Os possíveis efeitos de contraceptivos orais provocam muita preocupação, principalmente as combinações de progesteronas e estrógenos. Também podem ter influência no surgimento da doença a dieta, a falta de atividade física e o ganho de peso (ADAMI e col., 2001; COLDITZ, 2005; PARKIN e col., 2001).

O câncer de mama pode inclusive acometer mulheres em idade jovem, resultando em perda da qualidade de vida. O risco aumenta com a idade, mas a taxa de aumento é reduzida aproximadamente aos 50 anos. A razão para isso é o início da menopausa, com o ambiente hormonal bastante diferente, caracterizado pela diminuição dos níveis de estrógenos. É importante considerar que existe variação entre diferentes populações, de país para país (HORTOBAGYI e col., 2005; PARKIN e col., 2001).

O câncer de próstata, por sua vez, é um problema de saúde pública emergente. É uma doença de idosos, pois mais de três quartos dos casos ocorrem em homens com mais de 65 anos. Apesar de ser comum em todo o mundo, não se caracteriza por alta mortalidade, o que significa que muitos homens convivem muito tempo com a doença após o diagnóstico de câncer de próstata (PARKIN e col., 2001; QUINN e BABB, 2002).

O desenvolvimento do câncer de próstata requer a presença de hormônios masculinos e há o possível papel do metabolismo andrógeno endógeno. As

variações inter-étnicas em incidência e mortalidade sugerem que há determinantes genéticos importantes e que a prevalência de genes relevantes difere entre as populações (PARKIN e col., 2001). Tratamentos comuns incluem monitoramento, cirurgia para remover a próstata, radioterapia e privação de andrógenos. Ainda é bastante relevante a ocorrência de castração em virtude da resistência do câncer de próstata. Todos os tratamentos causam efeitos adversos (urinários, intestinais e sexuais) que ocorrem logo após a terapia, com variações em relação à frequência, duração e severidade (DELIE e col., 2012; WILT e col., 2008).

A cirurgia foi a primeira forma de tratamento dos vários tipos de câncer e continua sendo uma alternativa importante. Hoje, para tumores sólidos, a sobrevida é normalmente dependente da remoção cirúrgica do tumor primário (e uma parte do tecido normal) e dos linfonodos regionais, frequentemente em combinação com outras modalidades de tratamento. A radioterapia refere-se à aplicação de radiação ionizante (raios X e gama, ou partículas radioativas). Pode aliviar sintomas em pacientes com câncer incurável, sendo usada isoladamente, em conjunto com cirurgia, quimioterapia ou ambas. O tratamento quimioterápico em combinação frequentemente inclui três ou quatro fármacos, dados em esquema que pode durar meses. Outras modalidades emergentes de tratamento são a imunoterapia, a fototerapia, além das terapias térmica e gênica. Embora essas alternativas de tratamento tenham conseguido muitos avanços, a terapia do câncer ainda está longe do ideal (MI e col., 2012; MOHANTY e col., 2011; SLOAN e GELBAND, 2007).

O uso clínico da maioria dos quimioterápicos convencionais é problemático e limitado devido à liberação inadequada de concentrações terapêuticas do fármaco no tecido tumoral alvo ou devido aos efeitos tóxicos severos em órgãos saudáveis (ANDRESEN e col., 2005; BROZ e col., 2005; CHANG e col., 2009; MASSING e FUXIUS, 2000). As razões para isso compreendem uma série de problemas farmacocinéticos, além da resistência ao tratamento.

A resistência a fármacos é um dos maiores obstáculos que limitam a eficácia terapêutica de agentes quimioterápicos. Na clínica, ela é definida como a falta de redução do tamanho do tumor ou a reincidência após resposta positiva inicial ao tratamento. Pode ser causada por barreiras fisiológicas (mecanismos não-celulares) ou alterações bioquímicas das células tumorais (mecanismos celulares). Dentre os mecanismos não-celulares, pode-se citar o exemplo do ambiente ácido em tumores, que resulta em resistência a fármacos básicos através da neutralização. Há também

a diferença entre a alta pressão intersticial e a baixa pressão microvascular, que pode impedir o extravasamento de fármacos. Dentre os mecanismos celulares, podem ser citados a atividade alterada de sistemas enzimáticos específicos (por exemplo, atividade de topoisomerase), a regulação alterada da apoptose e o aumento do efluxo em células malignas. Entre esses mecanismos, mudanças na bomba de efluxo de fármacos são as mais conhecidas e investigadas. A glicoproteína-P (Pgp) é uma glicoproteína transmembrana de 170 kD que funciona como bomba de efluxo para remover fármacos para fora das células, reduzindo sua concentração intracelular. A bomba Pgp geralmente reconhece os fármacos substrato e os bombeia para fora da célula assim que atravessam a membrana plasmática (WANG e col., 2008).

Como nem todas as células tumorais expressam transportadores que desempenham a função de bomba de efluxo, a quimioterapia elimina apenas as células sensíveis que apresentam pouca ou nenhuma expressão de transportadores, restando uma pequena população de células resistentes ao(s) fármaco(s) com alta expressão de transportadores. Com a recorrência do tumor, a quimioterapia pode falhar por causa das células resistentes residuais que dominam a população tumoral (PEER e col., 2007).

Infelizmente, os problemas mencionados não compreendem apenas quimioterápicos já em uso, mas também novos e promissores compostos citostáticos que por essas razões não chegarão à prática clínica. Isso é uma perda dramática para os pacientes com câncer e também para a indústria farmacêutica (MASSING e FUXIUS, 2000).

Assim, um dos mais importantes objetivos do tratamento do câncer é liberar quantidades suficientes de um fármaco em tumores de forma vetorizada, enquanto o dano a outros tecidos é minimizado. Além disso, é essencial superar os mecanismos de resistência a fármacos desenvolvidos pelas células tumorais na tentativa de garantir sua sobrevivência (CHANG e col., 2009; WANG e col., 2008). O esboço dessas ideias surgiu ainda no século passado, quando o pesquisador Paul Ehrlich criou o conceito "*magic bullet*" (algo como "projétil mágico"), que deve consistir em um sistema com uma parte que reconhece e se liga ao alvo terapêutico e uma segunda parte que exerce o efeito desejado nesse alvo (KOSHKARYEV e col., 2013). A encapsulação em nanopartículas, por atingir esses objetivos, é uma estratégia racional, que otimiza a terapia com taxanos, por exemplo. As vantagens

atingidas em relação ao fármaco livre resultam em aumento do índice terapêutico, que leva em consideração a diminuição da toxicidade, mais notadamente a redução de efeitos colaterais (ALLEN e CULLIS, 2013; PARK e col., 2004).

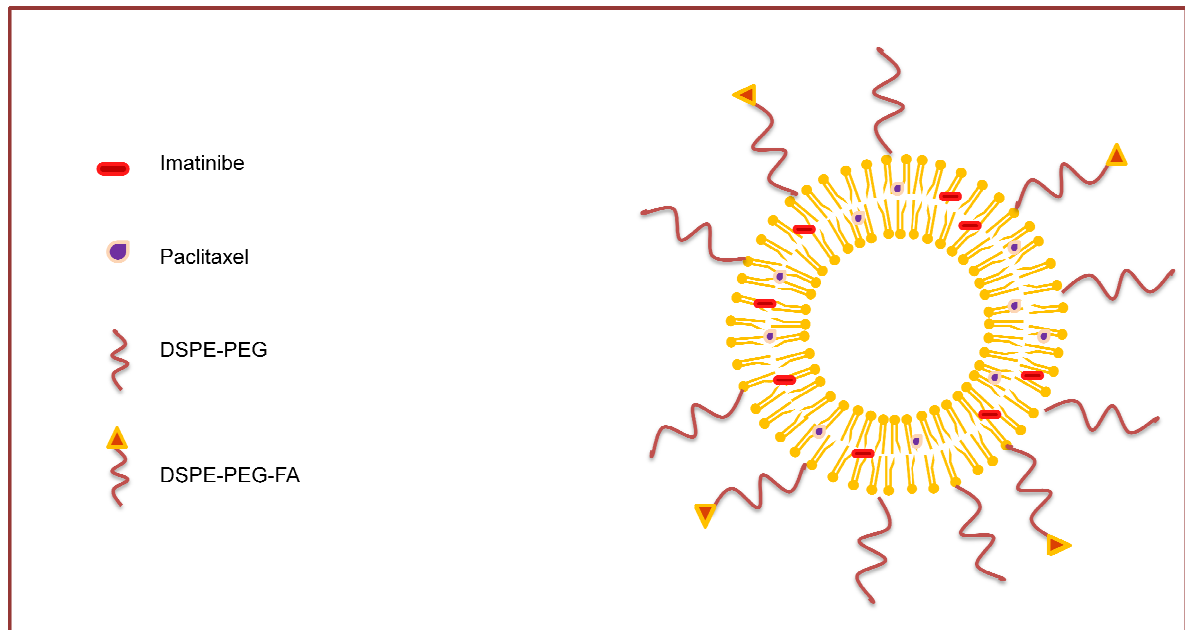
Ainda na década de 90 do século XX, Sharma e Sharma (1997) apontaram para essa dificuldade na formulação dos quimioterápicos, cuja baixa solubilidade em água pode causar a necessidade da elaboração de formulações que empregam tensoativos ou cossolventes orgânicos tóxicos. Isso leva à necessidade do desenvolvimento de novos sistemas de liberação, isentos desse tipo de veículo tóxico.

A pesquisa em sistemas de liberação de fármacos ocasionou o desenvolvimento de lipossomas de longa circulação que se acumulam no tecido tumoral. Para que isso aconteça, quatro requisitos básicos precisam ser atendidos: (i) circulação sanguínea prolongada, (ii) alta carga de fármaco nas partículas, (iii) tamanho pequeno o suficiente para que os lipossomas extravasem durante sua passagem através dos vasos altamente permeáveis dos tumores, (iv) liberação controlada do fármaco e absorção pelas células tumorais com perfil de liberação compatível à farmacodinâmica do princípio ativo (ANDRESEN e col., 2005; GABIZON e col., 1998).

Além das grandes vantagens e possibilidades oferecidas pelas nanopartículas no sentido de tratar o câncer, observa-se ainda que há crescente interesse na associação entre agentes citotóxicos e antiangiogênicos, através da coencapsulação de fármacos em um mesmo sistema de liberação. Essa combinação pode permitir, como foi mencionado, reversão da reincidência tumoral e diminuição de efeitos colaterais. Além dessas vantagens, torna-se facilitado o controle das propriedades farmacocinéticas dos princípios ativos contidos em um único sistema em comparação com as formulações em que os fármacos são veiculados de forma individualizada, conforme tem sido feito nas terapias convencionais.

Nesse contexto, a utilização de sistemas nanocarreadores com superfície modificada capazes de ser especificamente reconhecidos, particularmente por células tumorais, torna-se interessante. Através dessa estratégia, a internalização de fármacos nas células-alvo pode ser significativamente aumentada. A nanoestrutura desenvolvida terá a estrutura representada na Figura 8.

Figura 8. Lipossomas multifuncionais de longa circulação, carregados com Imatinibe e Paclitaxel e direcionados ao receptor folato. Legenda: DSPE-PEG: Disteroil fosfatidiletanolamina-polietileneglicol, DSPE-PEG-FA: Disteroil fosfatidiletanolamina-polietileneglicol-ácido fólico. Fonte: o autor.



Assim, neste trabalho foi planejado o desenvolvimento de lipossomas sítio específicos, decorados com o ligante ácido fólico, contendo imatinibe e paclitaxel coencapsulados, com vistas à aplicação terapêutica em casos de tumores sólidos que superexpressam o receptor específico para endocitose dessa vitamina.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Preparar lipossomas peguilados alvo-específicos decorados com ácido fólico, direcionados ao receptor de superfície celular folato, contendo imatinibe e paclitaxel isoladamente ou coencapsulados e avaliar a atividade antiproliferativa e a expressão de VEGF em células tumorais de câncer de mama e câncer de próstata com alta expressão de receptores folato após a exposição *in vitro* aos nanossistemas desenvolvidos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar e caracterizar lipossomas convencionais e peguilados brancos e contendo imatinibe ou paclitaxel ou ambos coencapsulados;
- Desenvolver e validar método analítico para quantificação simultânea dos dois fármacos em questão;
- Estudar a estabilidade das formulações obtidas;
- Avaliar o processo de liofilização para os lipossomas utilizando manitol, sacarose ou trealose como crioprotetor;
- Desenvolver um método de síntese da âncora ligada ao ácido fólico para vetorização DSPE-PEG(2000)-AF e caracterizar o produto obtido;
- Preparar e caracterizar lipossomas alvo-específicos;
- Avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro* em células de câncer de mama (MCF7) e câncer de próstata (PC3) com alta expressão de receptores folato;
- Investigar a expressão do gene que codifica a produção de VEGF através da técnica de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) *in vitro*, nas linhagens MCF7 e PC3, após incubação com as formulações desenvolvidas.

6 CONCLUSÕES

- O procedimento de síntese da âncora lipídica com ácido fólico ligado à sua extremidade foi bem sucedido. Isso pôde ser comprovado por ensaio de identificação (FT-IR), por ressonância magnética nuclear (RMN ^1H) e por Espectrometria de massas com ionização de eletrospray (IES-EM);
- Foram desenvolvidos lipossomas com diâmetro médio próximo de 100 nm e baixo índice de polidispersão, com imatinibe e paclitaxel coencapsulados nas razões molares 1:26 e 1:27, respectivamente. A peguilação e a adição da âncora lipídica não alteraram as características de tamanho ou %EE das nanoestruturas;
- Os lipossomas peguilados mantiveram-se estáveis quando armazenados por até 30 dias sob temperatura 4°C, com pouca variação em sua distribuição de tamanho e vazamento de ambos os fármacos inferior a 5%;
- A liofilização das formulações utilizando o açúcar trealose permitiu a obtenção de características adequadas em termos de distribuição de tamanho após ressuspensão do pó liofilizado, o que não foi conseguido com os crioprotetores sacarose e manitol;
- Na linhagem celular de câncer de mama MCF7, o paclitaxel encapsulado em lipossomas é mais citotóxico que o paclitaxel livre. Além disso, os lipossomas vetorizados contendo IB e PTX coencapsulados são mais citotóxicos que o FLP em todas as condições testadas ($p < 0,001$). A formulação LPV IP reduziu mais a viabilidade celular em todas as concentrações no tempo 24h em comparação com a não-vetorizada LPIP ($p < 0,05$);
- Na linhagem celular de câncer de próstata PC3, a viabilidade celular foi marcadamente reduzida após a exposição aos lipossomas decorados com ácido fólico contendo IB e PTX, especificamente nas maiores concentrações testadas, 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$, em comparação com a formulação não-vetorizada LPIP, tanto em 24h como em 48h ($p < 0,01$);
- A expressão gênica do VEGF diminuiu nas linhagens MCF7 e PC3 após a exposição à formulação lipossomal contendo os fármacos IB e PTX coencapsulados, e foi menor ainda quando as células foram expostas a vesículas vetorizadas. Também nesse ensaio houve diferença ($p < 0,05$) entre as formas vetorizada e não-vetorizada (LPIP) em ambas as linhagens;

➤ Levando em consideração os resultados dos testes *in vitro*, percebe-se que a estratégia de biorreconhecimento aqui empregada, que compreende o desenvolvimento de lipossomas direcionados ao receptor folato, superexpresso nas linhagens tumorais MCF7 e PC3, aumenta o efeito citotóxico da combinação IB + PTX coencapsulados em lipossomas contendo âncora lipídica ligada ao ácido fólico e acentua a redução da expressão gênica do fator pró-angiogênico VEGF em ambas as linhagens em comparação com a mesma formulação lipossomal não-vetorizada.

➤ Apresenta-se, diante do que já foi verificado através dos ensaios *in vitro*, perspectiva interessante no sentido da aplicação dos nanossistemas desenvolvidos para a criação de novos protocolos *in vivo* compreendendo o tratamento de tumores que reconhecidamente superexpresssem o receptor folato. Isso serviria para verificar a eficácia dos referidos lipossomas em modelos *in vivo*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLA, J. M. A.; TAN, Y. T.; DARWIS, Y. Rehydrated lyophilized rifampicin-loaded mPEG–DSPE formulations for nebulization. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 2, p. 663-671, 2010.

ABRAHAM, S. A.; MCKENZIE, C.; MASIN, D.; NG, R.; HARASYM, T. O.; MAYER, L. D.; BALLY, M. B. In vitro and in vivo characterization of doxorubicin and vincristine coencapsulated within liposomes through use of transition metal ion complexation and pH gradient loading. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 2, p. 728-38, 2004.

ADAMI, H. O.; DAY, N. E.; TRICHOPOULOS, D.; WILLETT, W. C. Primary and secondary prevention in the reduction of cancer morbidity and mortality. **European Journal of Cancer**, v. 37, p. S118–S127, 2001.

ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Drug delivery systems: entering the mainstream. **Science**, v. 303, n. 5665, p. 1818-1822, 2004.

ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 36–48, 2013.

ANDRESEN, T. L.; JENSEN, S. S.; JØRGENSEN, K. Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release. **Progress in Lipid Research**, v. 44, p. 68–97, 2005.

ANTONY, A. C. Folate receptors. **Annual Review of Nutrition**, v. 16, p. 501-521, 1996.

APTE, S. M.; FAN, D.; KILLION, J. J.; FIDLER, I. J. Targeting the platelet-derived growth factor receptor in antivasular therapy for human ovarian carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 3, p. 897-908, 2004.

ASTIER, A.; DOAT, B.; FERRER, M. J.; BENOIT, G.; FLEURY, J.; ROLLAND, A.; LEVERGE, R. Enhancement of adriamycin antitumor activity by its binding with an intracellular sustained-release form, polymethacrylate nanospheres, in U-937 cells. **Cancer Research**, v. 48, p. 1835-1841, 1988.

AXIAK-BECHTEL, S. M.; KUMAR, S. R.; DANK, K. K.; CLARKSON, N. A.; SELTING, K. A.; BRYAN, J. N.; ROSOL, T. J.; ESPINOSA, J.; DECEDUE, C. J. Nanoparticulate paclitaxel demonstrates antitumor activity in PC3 and Ace-1 aggressive prostate cancer cell lines. **Invest new drugs**, 2013.

BAEK, J.; CHO, C. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin-modified SLN of paclitaxel for overcoming p-glycoprotein function in multidrug-resistant breast cancer cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, p. 72–78, 2013.

BANERJEE, R. Liposomes: applications in medicine. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 16, n. 3, p. 3-21, 2001.

BARENHOLZ, Y. Liposome application: problems and prospects. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 6, p. 66-77, 2001.

BASAL, E.; EGHBALI-FATOURECHI, G. Z.; KALLI, K. R.; HARTMANN, L. C.; GOODMAN, K. M.; GOODE, E. L.; KAMEN, B. A.; LOW, P. S.; KNUTSON, K. L. Functional folate

receptor alpha is elevated in the blood of ovarian cancer patients. **Plos One**, v. 4, n. 7, p. 1-7, 2009.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. M. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p.167-179, 2007.

BENDE, G.; KOLLIPARA, S.; KOLACHINA, V.; SAHA, R. Development and validation of an stability indicating RP-LC method for determination of imatinib mesylate. **Chromatographia**, v. 66, p. 859-866, 2007.

BÉNI, S.; BUDAI, M.; NOSZÁL, B.; GRÓF, P. Molecular interactions in imatinib–DPPC liposomes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, p. 205–211, 2006.

BENNIS, S.; CHAPEY, C.; COUVREUR, P.; ROBERT, J. Enhanced cytotoxicity of doxorubicin encapsulated in polyisohexylcyanoacrylate nanospheres against multidrug-resistant tumour cells in culture. **European Journal of Cancer**, v. 30A, n. 1, p. 89-93, 1994.

BERNABEU, E.; HELGUERA, G.; LEGASPI, M. J.; GONZALEZ, L.; HOCHT, C.; TAIRA, C.; CHIAPPETTA, D. A. Paclitaxel-loaded PCL–TPGS nanoparticles: In vitro and in vivoperformance compared with Abraxane. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 43– 50, 2014.

BHARALI, D. J.; MOUSA, S. A. Emerging nanomedicines for early cancer detection and improved treatment: Current perspective and future promise. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 128, p. 324–335, 2010.

BHARDWAJ, U.; BURGESS, D. J. Physicochemical properties of extruded and non-extruded liposomes containing the hydrophobic drug dexamethasone. **International Journal of Pharmaceutics**, v.388, p. 181–189, 2010.

BODE, C.; TROJAN, L.; WEISS, C.; KRAENZLIN, B.; MICHAELIS, U.; TEIFEL, M.; ALKEN, P.; MICHEL, M. S. Paclitaxel encapsulated in cationic liposomes: A new option for neovascular targeting for the treatment of prostate cancer. **Oncology Reports**, v. 22, p. 321-326, 2009.

BRAMA, M.; BASCIANI, S.; CHERUBINI, S.; MARIANI, S.; MIGLIACCIO, S.; ARIZZI, M.; ROSANO, G.; SPERA, G.; GNESSI, L. Osteoblast-conditioned medium promotes proliferation and sensitizes breast cancer cells to imatinib treatment. **Endocrine-Related Cancer**, v. 14, n. 1, p. 61-72, 2007.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, 5 ed., Brasília: Anvisa, 2010.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 631-651, 2002.

BROC-RYCKEWAERT, D. L.; CARPENTIER, R.; LIPKA, E.; DAHER, S.; VACCHER, C.; BETBEDER, D.; FURMAN, C. Development of innovative paclitaxel-loaded small PLGA nanoparticles: Study of their antiproliferative activity and their molecular interactions on prostatic cancer cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, p. 712– 719, 2013.

BROZ, P.; BENITO, S. M.; SAW, C. L.; BURGER, P.; HEIDER, H.; PFISTERER, M.; MARSCH, S.; MEIER, W.; HUNZIKER, P. Cell targeting by a generic receptor-targeted polymer nanocontainer platform. **Journal of Controlled Release**, v. 102, p. 475–488, 2005.

BUCHDUNGER, E.; O'REILLY, T.; WOOD, J. Pharmacology of imatinib (STI571). **European Journal of Cancer**, v. 38, n. 5, p. S28–S36, 2002.

CABRAL, E. C. M.; ZOLLNER, R. L.; SANTANA, M. H. A. Preparation and characterization of liposomes entrapping allergenic proteins. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 2, p. 137 - 146, 2004.

CAGDAS, F. M.; ERTUGRAL, N.; BUCAK, S.; ATAY, N. Z. Effect of preparation method and cholesterol on drug encapsulation studies by phospholipid liposomes. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 16, n. 4, p. 408–414, 2011.

CAIRNS, R. A.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, p. 85-95, 2011.

CANTOR, J. R.; SABATINI, D. M. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. **Cancer Discovery**, v. 2, n. 10, p. 1-18, 2012.

CATALDI, M.; GAUDINO, A.; LARICCIA, V.; RUSSO, M.; AMOROSO, S.; RENZO, G.; ANNUNZIATO, L. Imatinib-mesylate blocks recombinant t-type calcium channels expressed in human embryonic kidney-293 cells by a protein tyrosine kinase-independent mechanism. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 309, p. 208–215, 2004.

CHAN, P.; KURISAWA, M.; CHUNG, J. E.; YANG, Y. Synthesis and characterization of chitosan-g-poly(ethylene glycol)-folate as a non-viral carrier for tumor-targeted gene delivery. **Biomaterials**, v. 28, p. 540–549, 2007.

CHANG, D. K.; CHIU, C. Y.; KUO, S. Y.; LIN, W. C.; LO, A.; WANG, Y. P.; LI, P. C.; WU, H. C. Antiangiogenic targeting liposomes increase therapeutic efficacy for solid tumors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 19, p. 12905–12916, 2009.

CHAUDHURY, A.; DAS, S.; LEE, R. F. S.; TAN, K. B.; NG, W. K.; TAN, R. B H.; CHIU, G. N. C. Lyophilization of cholesterol-free PEGylated liposomes and its impact on drug loading by passive equilibration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430, p. 167– 175, 2012.

CHEN, C.; HAN, D.; CAI, C.; TANG, X. An overview of liposome lyophilization and its future potential. **Journal of Controlled Release**, v. 142 p. 299–311, 2010.

CHEN, H.; AHN, R.; VAN DEN BOSSCHE, J.; THOMPSON, D. H.; O'HALLORAN, T. V. Folate-mediated intracellular drug delivery increases the anticancer efficacy of nanoparticulate formulation of arsenic trioxide. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 8, n. 7, p. 1955–1963, 2009b.

CHEN, H.; PAZICNI, S.; KRETT, N. L.; AHN, R. W.; PENNER-HAHN, J. E.; ROSEN, S. T.; O'HALLORAN, T. V. Coencapsulation of arsenic- and platinum-based drugs for targeted cancer treatment. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, n. 49, p. 9295-9, 2009a.

CHO, K.; WANG, C.; NIE, S.; CHEN, Z.; SHIN, D. M. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, p. 1310-1316, 2008.

CHUNG, K. N.; SAIKAWA, Y.; PAIK, T. H.; DIXON, K. H.; MULLIGAN, T.; COWAN, K. H.; ELWOOD, P. C. Stable Transfectants of Human MCF-7 Breast-Cancer Cells with Increased Levels of the Human Folate Receptor Exhibit an Increased Sensitivity to Antifolates. **Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 4, p. 1289-1294, 1993.

CLERC, S. G.; THOMPSON, T. E. A possible mechanism for vesicle formation by extrusion. **Biophysical Journal**, v. 67, p. 475-477, 1994.

COLDITZ, G. A. Epidemiology and prevention of breast cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, v. 14, p. 768-772, 2005.

CORCORAN, N. M.; COSTELLO, A. J. Combined low-dose imatinib mesylate and paclitaxel lack synergy in an experimental model of extra-osseous hormone-refractory prostate cancer. **BJU International**, v. 96, n. 4, p. 640-6, 2005.

COUVREUR, P.; TULKENS, P.; ROLAND, M.; TROUET, A.; SPEISER, P. Nanocapsules: a new type of lysosomotropic carrier. **FEBS Letters**, v. 84, n. 2, p. 323-326, 1977.

CRAPARO, E. F.; TERESI, G.; BONDI, M. L.; LICCIARDI, M.; CARVALLARO, G. Phospholipid-polyaspartamide micelles for pulmonary delivery of corticosteroids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 406, p. 135-144, 2011.

CUENCA, A. G.; JIANG, H.; HOCHWALD, S. N.; DELANO, M.; CANCE, W. G.; GROBMYER, S. R. Emerging implications of nanotechnology on cancer diagnostics and therapeutics. **Cancer**, v. 107, p. 459-466, 2006.

DAMEN, E. W.; WIEGERINCK, P. H.; BRAAMER, L.; SPERLING, D.; DE VOS, D.; SCHEEREN, H. W. Paclitaxel esters of malic acid as prodrugs with improved water solubility. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 427-32, 2000.

DATE, P. V.; SAMAD, A.; DEVARAJAN, P. V. Freeze thaw: a simple approach for prediction of optimal cryoprotectant for freeze drying, **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 1, p. 304-313, 2010.

DELIE, F.; PETIGNAT, P.; COHEN, M. GRP78-targeted nanotherapy against castrate-resistant prostate cancer cells expressing membrane GRP78. **Targeted Oncology**, 2012.

DONG, X.; ZHANG, M.; WANG, K.; LIU, P.; GUO, D.; ZHENG, X.; GE, X. Sanguinarine inhibits vascular endothelial growth factor release by generation of reactive oxygen species in MCF-7 human mammary adenocarcinoma cells. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

Drug Bank - Open data drug and Drug database. Disponível em: < <http://drugbank.ca/drugs/DB01229> >. Acesso em: 07/11/2012.

DURGADAS, C. V.; SHARMA, C. P.; SREENIVASAN, K. Fluorescent gold clusters as nanosensors for copper ions in live cells. **Analyst**, v. 136, p. 933-940, 2011.

EDWARDS, K. A.; BAEUMNER, A. J. Liposomes in analyses. **Talanta**, v. 68, p. 1421-1431, 2006.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 2950-2962, 2009.

FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Impact of Nanotechnology on drug delivery. **ACS Nano**, v. 3, n. 1, p. 16-20, 2009.

FRÉZARD, F. Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 181-189, 1999.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

FUJITA, Y.; KOJIMA, K.; OHASHI, R.; HAMADA, N.; NOZAWA, Y.; KITAMOTO, A.; SATO, A.; KONDO, S.; KOJIMA, T.; DEGUCHI, T.; ITO, M. MiR-148a attenuates paclitaxel resistance of hormone-refractory, drug-resistant prostate cancer PC3 cells by regulating MSK1 expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 25, p. 19076–19084, 2010.

GABIZON, A.; GOREN, D.; COHEN, R.; BARENHOLZ, Y. Development of liposomal anthracyclines: from basics to clinical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 53, p. 275–279, 1998.

GHOSH, R.; LIPSON, K. L.; SARGENT, K. E.; MERCURIO, A. M.; HUNT, J. S.; RON, D.; URANO, F. Transcriptional regulation of VEGF-A by the unfolded protein response pathway. **Plos One**, v. 5, n. 3, p. e9575, 2010.

GÓMEZ-HENS, A.; FERNÁNDEZ-ROMERO, J. M. Analytical methods for the control of liposomal delivery systems. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 167-178, 2006.

GRANT, G. J.; BARENHOLZ, Y.; PISKOUN, B.; BANSINATH, M.; TURNDORF, H.; BOLOTIN, E. M. DRV Liposomal Bupivacaine: Preparation, Characterization, and In Vivo Evaluation in Mice. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 3, p. 336-343, 2001.

GULATI, M.; GROVER, M.; SINGH, S.; SINGH, M. Lipophilic drug derivatives in liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 165, p. 129-168, 1998.

GUO, P.; FANG, Q.; TAO, H. Q.; SCHAFER, C. A.; FENTON, B. M.; DING, I.; HU, B.; CHENG, S. Y. Overexpression of vascular endothelial growth factor by MCF-7 breast cancer cells promotes estrogen-independent tumor growth in vivo. **Cancer Research**, v. 63, n. 15, p. 4684-91, 2003.

HALEY, B.; FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 26, p. 57–64, 2008.

HALLING, K. K.; RAMSTEDT, B.; NYSTRÖM, J. H.; SLOTTE, J. P.; NYHOLM, T. K. M. Cholesterol interactions with fluid-phase phospholipids: effect on the lateral organization of the bilayer. **Biophysical Journal**, v. 95, p. 3861–3871, 2008.

HARUSH-FRENKEL, O.; ALTSCHULER, Y.; BENITA, S. Nanoparticle–cell interactions: drug delivery implications. **Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 25, n. 6, p. 485–544, 2008.

HE, Q.; MA, M.; WEI, C.; SHI, J. Mesoporous carbon@silicon-silica nanotheranostics for synchronous delivery of insoluble drugs and luminescence imaging. **Biomaterials**, v. 33, p. 4392-4402, 2012.

HEERKLOTZ, H.; TSAMALOUKAS, A. Gradual change or phase transition: characterizing fluid lipid-cholesterol membranes on the basis of thermal volume changes. **Biophysical Journal**, v. 91, p. 600–607, 2006.

HILLAIREAU, H.; COUVREUR, P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, p. 2873–2896, 2009.

HO, E. A.; RAMSAY, E.; GINJ, M.; ANANTHA, M.; BREGMAN, I.; SY, J.; WOO, J.; OSOOLY-TALESH, M.; YAPP, D. T.; BALLY, M. B. Characterization of cationic liposome formulations designed to exhibit extended plasma residence times and tumor vasculature targeting properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 6, p. 2839-2853, 2010.

HO, J. A.; HUNG, C.; WU, L.; LIAO, M. Folic acid-anchored peggylated phospholipid bioconjugate and its application in a liposomal immunodiagnostic assay for folic acid. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 14, p. 5671-5677, 2009.

HOBBS, S. K.; MONSKY, W. L.; YUAN, F.; ROBERTS, W. G.; GRIFFITH, L.; TORCHILIN, V. P.; JAIN, R. K. Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. **PNAS**, v. 95, p. 4607-4612, 1998.

HORTOBAGYI, G. N.; SALAZER, J. G.; PRITCHARD, K.; AMADORI, D.; HAIDINGER, R.; HUDIS, C. A.; KHALED, H.; LIU, M. C.; MARTIN, M.; NAMER, M.; O'SHAUGHNESSY, J. A.; SHEN, Z. Z.; ALBAIN, K. S. The Global Breast Cancer Burden: Variations in Epidemiology and Survival. **Clinical Breast Cancer**, v. 6, n. 5, p. 391-401, 2005.

HUANG, Y.; CHEN, X.; ZHAO, B.; KE, X.; ZHAO, B.; ZHAO, X.; WANG, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, Q. Antiangiogenic activity of sterically stabilized liposomes containing paclitaxel (SSL-PTX): in vitro and in vivo. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 2, p. 752-759, 2010.

HUNTER, D. G.; FRISKEN, B. J. Effect of extrusion pressure and lipid properties on the size and polydispersity of lipid vesicles. **Biophysical Journal**, v. 74, p. 2996-3002, 1998.

HUWYLER, J.; DREWE, J.; KRÄHENBÜHL, S. Tumor targeting using liposomal antineoplastic drugs. **International Journal of Nanomedicine**, v. 3, n. 1, p. 21-29, 2008.

HWANG, S. Y.; CHO, D. Y.; KIM, H. K.; CHO, S. H.; CHOO, J.; YOON, W. J.; LEE, E. K. Preparation of targeting proteoliposome by postinsertion of a linker molecule conjugated with recombinant human epidermal growth factor. **Bioconjugate Chemistry**, v. 21, p. 345-351, 2010.

ICH - International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use: Validation of Analytical Procedures, Text and Methodology Q2 (R1), 2005.

IVANOVIC, D.; MEDENICA, M.; JANCIC, B.; MALENOVIC, A. Reversed-phase liquid chromatography analysis of imatinib mesylate and impurity product in Glivec capsules. **Journal of Chromatography B**, v. 800, n. 1-2, p. 253-8, 2004.

JAIN, A. K.; THANKI, K.; JAIN, S. Co-encapsulation of tamoxifen and quercetin in polymeric nanoparticles: implications on oral bioavailability, antitumor efficacy, and drug-induced toxicity. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 9, p. 3459-74, 2013.

JAIN, K. K. Advances in the field of nanooncology. **BMC Medicine**, v. 8, p. 1-11, 2010.

KANAVOS, P. The rising burden of cancer in the developing world. **Annals of Oncology**, v. 17, n. 8, p. viii15-viii23, 2006.

KANG, M. J.; PARK, S. H.; KANG, M. H.; PARK, M. J.; CHOI, Y. W. Folic acid-tethered Pep-1 peptide-conjugated liposomal nanocarrier for enhanced intracellular drug delivery to cancer cells: conformational characterization and in vitro cellular uptake evaluation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 1155-1165, 2013.

KARIEL, N.; DAVIDSON, E.; KEOUGH, K. M. W. Cholesterol does not remove the gel-liquid crystalline phase transition of phosphatidylcholines containing two polyenoic acyl chains. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1062, p. 70-76, 1991.

KIM, S. J.; UEHARA, H.; YAZICI, S.; BUSBY, J. E.; NAKAMURA, T.; HE, J.; MAYA, M.; LOGOTHETIS, C.; MATHEW, P.; WANG, X.; DO, K. A.; FAN, D.; FIDLER, I. J. Targeting platelet-derived growth factor receptor on endothelial cells of multidrug-resistant prostate cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, n. 11, p. 783-93, 2006.

KOSHKARYEV, A.; SAWANT, R.; DESHPANDE, M.; TORCHILIN, V. Immunoconjugates and long circulating systems: Origins, current state of the art and future directions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 24–35, 2013.

KOUDELKA, S.; TURÁNEK-KNÖTIGOVÁ, P.; MASEK, J.; KORVASOVÁ, Z.; SKRABALOVA, M.; PLOCKOVÁ, J.; BARTHELDYOVÁ, E.; TURÁNEK, J. Liposomes with high encapsulation capacity for paclitaxel: preparation, characterisation and in vivo anticancer effect. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 5, p.2309-2319, 2010.

KOYNOVA, R.; CAFFREY, M. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1376, p. 91–145, 1998.

KÜBLER, H. R.; VAN RANDENBORGH, H.; TREIBER, U.; WUTZLER, S.; BATTISTEL, C.; LEHMER, A.; WAGENPFEIL, S.; HARTUNG, R.; PAUL, R. In vitro cytotoxic effects of Imatinibin combination with anticancer drugs in human prostate cancer cell lines. **The Prostate**, v. 63, p. 385-394, 2005.

LASIC, D. D. Recent developments in medical applications of liposomes: sterically stabilized liposomes in cancer therapy and gene delivery in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 48, p. 203–222, 1997.

LATIL, A.; BIECHE, I.; PESCHE, S.; VALERI, A.; FOURNIER, G.; CUSSENOT, O.; LIDEREAU, R. VEGF overexpression in clinically localized prostate tumors and neuropilin-1 overexpression in metastatic forms. **International Journal of Cancer**, v. 89, n. 2, p. 167-71, 2000.

LEAMON, C. P.; REDDY, J. A.; VETZEL, M.; DORTON, R.; WESTRICK, E.; PARKER, N.; WANG, Y.; VLAHOV, I. Folate targeting enables durable and specific antitumor responses from a therapeutically null tubulysin B analogue. **Cancer Research**, v. 68, n. 23, p. 9839-9844, 2008.

LEBRET, V.; RAEHM, L.; DURAND, J. O.; SMAIHI, M.; WERTS, M. H. V.; BLANCHARD-DESCE, M.; METHY-GONNOD, D.; DUBERNET, C. Surface functionalization of two-photon dye-doped mesoporous silica nanoparticles with folic acid: cytotoxicity studies with HeLa and MCF-7 cancer cells. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 48, n. 1-2, p. 32-39, 2008.

LEE, R. J.; LOW, P. S. Delivery of Liposomes into Cultured KB Cells via Folate Receptor-mediated Endocytosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 5, p. 3198-3204, 1994.

LEE, R. J.; LOW, P. S. Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped doxorubicin in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1233, p. 134-144, 1995.

LEE, S. C.; HUH, K. M.; LEE, J.; CHO, Y. W.; GALINSKY, R. E.; PARK, K. Hydrotropic polymeric micelles for enhanced paclitaxel solubility: in vitro and in vivo characterization. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 1, p. 202-8, 2007.

LI, P.; ZHAO, L. Developing early formulations: Practice and perspective. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 1–19, 2007.

LIAN, T.; HO, R. J. Y. Trends and developments in liposome drug delivery systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 6, p. 667-680, 2001.

LICCIARDI, M.; PAOLINO, D.; CELIA, C.; GIAMMONA, G.; CAVALLARO, G.; FRESCO, M. Folate-targeted supramolecular vesicular aggregates based on polyaspartyl-hydrazide copolymers for the selective delivery of antitumoral drugs. **Biomaterials**, v. 31, n. 28, p. 7340-7354, 2010.

LILA A. S. A.; ISHIDA, T.; KIWADA, H. Targeting anticancer drugs to tumor vasculature using cationic liposomes. **Pharmaceutical Research**, v. 27, p. 1171–1183, 2010.

LIN, H.; JIANG, S. S.; CHUU, C. Caffeic acid phenethyl ester causes p21cip1 induction, akt signaling reduction, and growth inhibition in PC-3 human prostate cancer cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2012.

LITZ, J.; KRYSTAL, G. W. Imatinib inhibits c-Kit-induced hypoxia-inducible factor-1 α activity and vascular endothelial growth factor expression in small cell lung cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, p. 1415-1422, 2006.

LO, C. C.; WANG, C. H.; CHIEN, P. Y.; HUNG, C. W. An empirical study of commercialization performance on nanoproducts. **Technovation**, v. 32, p. 167-178, 2012.

LOI, M.; MARCHIÒ, S.; BECHERINI, P.; PAOLO, D.; SOSTER, M.; CURNIS, F.; BRIGNOLE, C.; PAGNAN, G.; PERRI, P.; CAFFA, I.; LONGHI, R.; NICO, B.; BUSSOLINO, F.; GAMBINI, C.; RIBATTI, D.; CILLI, M.; ARAP, W.; PASQUALINI, R.; ALLEN, T. M.; CORTI, A.; PONZONI, M.; PASTORINO, F. Combined targeting of perivascular and endothelial tumor cells enhances anti-tumor efficacy of liposomal chemotherapy in neuroblastoma. **Journal of Controlled Release**, v. 145, p. 66–73, 2010.

LU, D.; HICKEY, A. Liposomal Dry Powders as Aerosols for Pulmonary Delivery of Proteins. **AAPS PharmSciTech**, v. 6, n. 4, p. E641-E648, 2005.

MAEDA, H.; NAKAMURA, H.; FANG, J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 71–79, 2013.

MALAVAKI, C. J.; ROUSSIDIS, A. E.; GIALELI, C.; KLETSAS, D.; TSEGENIDIS, T.; THEOCHARIS, A. D.; TZANAKAKIS, G. N.; KARAMANOS, N. K. Imatinib as a key inhibitor of the platelet-derived growth factor receptor mediated expression of cell surface heparan sulfate proteoglycans and functional properties of breast cancer cells. **FEBS Journal**, v. 280, p. 2477–2489, 2013.

MAMOT, C.; DRUMMOND, D. C.; HONG, K.; KIRPOTIN, D. B.; PARK, J. W. Liposome-based approaches to overcome anticancer drug resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 6, p. 271–279, 2003.

MANSOORI, G. A.; BRANDENBURG, K. S.; SHAKERI-ZADEH, A. A Comparative Study of Two Folate-Conjugated Gold Nanoparticles for Cancer Nanotechnology Applications. **Cancers (Basel)**, v. 2, n. 4, p. 1911-1928, 2010.

MARCUCCI, F.; LEFOULON, F. Active targeting with particulate drug carriers in tumor therapy: fundamentals and recent progress. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 5, p. 219-228, 2004.

MARUYAMA, K. Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 3, p. 161-169, 2011.

MASSING, U.; FUXIUS, S. Liposomal formulations of anticancer drugs: selectivity and effectiveness. **Drug Resistance Updates**, v. 3, p. 171-177, 2000.

MATEI, D.; EMERSON, R. E.; SCHILDER, J.; MENNING, N.; BALDRIDGE, L. A.; JOHNSON, C. S.; BREEN, T.; MCCLEAN, J.; STEPHENS, D.; WHALEN, C.; SUTTON, G. Imatinib mesylate in combination with docetaxel for the treatment of patients with advanced, platinum-resistant ovarian cancer and primary peritoneal carcinomatosis : a Hoosier Oncology Group trial. **Cancer**, v. 113, n. 4, p. 723-32, 2008.

MATTHEOLABAKIS, G.; NIE, T.; CONSTANTINIDES, P. P.; RIGAS, B. Sterically stabilized liposomes incorporating the novel anticancer agent phospho-ibuprofen (MDC-917): preparation, characterization, and in vitro/in vivo evaluation. **Pharmaceutical Research**, v. 29, p. 1435-1443, 2012.

MAYER, L. D.; HARASYM, T. O.; TARDI, P. G.; HARASYM, N. L.; SHEW, C. R.; JOHNSTONE, S. A.; RAMSAY, E. C.; BALLY, M. B.; JANOFF, A. S. Ratiometric dosing of anticancer drug combinations: controlling drug ratios after systemic administration regulates therapeutic activity in tumor-bearing mice. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, n. 7, p. 1854-63, 2006.

MCCARTHY, J. R.; BHAUMIK, J.; KARVER, M. R.; ERDEM, S. S.; WEISSLEDER, R. Targeted nanoagents for the detection of cancers. **Molecular Oncology**, v. 4, p. 511-528, 2010.

MENDES, L. P.; GAETI, M. P. N.; ÁVILA, P. H. M.; VIEIRA, M. S.; RODRIGUES, B. S.; MARCELINO, R. I. A.; SANTOS, L. C.; VALADARES, M. C.; LIMA, E. M. Multicompartmental nanoparticles for co-encapsulation and multimodal drug delivery to tumor cells and neovasculature. **Pharmaceutical Research**, disponível online em 11/2013.

MENDONÇA, L. S.; MOREIRA, J. N.; DE LIMA, M. C.; SIMOES, S. Co-encapsulation of anti-BCR-ABL siRNA and imatinib mesylate in transferrin receptor-targeted sterically stabilized liposomes for chronic myeloid leukemia treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 107, n. 5, p. 884-93, 2010.

MENG, S.; SU, B.; LI, W.; DING, Y.; TANG, L.; ZHOU, W.; SONG, Y.; LI, H.; ZHOU, C. Enhanced antitumor effect of novel dual-targeted paclitaxel liposomes. **Nanotechnology**, v. 21, p. 1-7, 2010.

MENG, S.; SU, B.; LI, W.; DING, Y.; TANG, L.; ZHOU, W.; SONG, Y.; CAICUN, Z. Integrin-targeted paclitaxel nanoliposomes for tumor therapy. **Medical Oncology**, v. 28, n. 4, p. 1180-1187, 2011.

MI, Y.; LIU, X.; ZHAO, J.; DING, J.; FENG, S. S. Multimodality treatment of cancer with herceptin conjugated, thermomagnetic iron oxides and docetaxel loaded nanoparticles of biodegradable polymers. **Biomaterials**, v. 33, n. 30, p. 7519-29, 2012.

MI, Y.; ZHAO, J.; FENG, S. S. Targeted co-delivery of docetaxel, cisplatin and herceptin by vitamin E TPGS-cisplatin prodrug nanoparticles for multimodality treatment of cancer. **Journal of Controlled Release**, v. 169, n. 3, p. 185-92, 2013.

MIAO, J.; DU, Y.; YUAN, H.; ZHANG, X.; HU, F. Drug resistance reversal activity of anticancer drug loaded solid lipidnanoparticles in multi-drug resistant cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 110, p. 74– 80, 2013.

MIELKE, S.; SPARREBOOM, A.; BEHRINGER, D.; MROSS, K. Paclitaxel pharmacokinetics and response to chemotherapy in patients with advanced cancer treated with a weekly regimen. **Anticancer Research**, v. 25, p. 4423-4428, 2005.

MISRA, R.; ACHARYA, S.; SAHOO, S. K. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 19 e 20, 2010.

MOHAJER, G.; LEE, E. S.; BAE, Y. H. Enhanced intercellular retention activity of novel pH-sensitive polymeric micelles in wild and multidrug resistant MCF-7 cells. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 9, p. 1618-1627, 2007.

MOHANTY, C.; DAS, M.; KANWAR, J. R.; SAHOO, S. K. Receptor mediated tumor targeting: an emerging approach for cancer therapy. **Current Drug Delivery**, v. 8, p. 45-58, 2011.

MOSCOW, J. A.; GONG, M. K.; HE, R.; SGAGIAS, M. K.; DIXON, K. H.; ANZICK, S. L.; MELTZER, P. S.; COWAN, K. H. Isolation of a Gene Encoding a Human Reduced Folate Carrier (Rfc1) and Analysis of Its Expression in Transport-Deficient, Methotrexate-Resistant Human Breast-Cancer Cells. **Cancer Res**, v. 55, n. 17, p. 3790-3794, 1995.

MUNDHENKE, C.; WEIGEL, M. T.; STURNER, K. H.; ROESEL, F.; MEIHOLD-HEERLEIN, I.; BAUERSCHLAG, D. O.; SCHEM, C.; HILPERT, F.; JONAT, W.; MAASS, N. Novel treatment of ovarian cancer cell lines with Imatinib mesylate combined with Paclitaxel and Carboplatin leads to receptor-mediated antiproliferative effects. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 134, p. 1397–1405, 2008.

NIE, S.; XING, Y.; KIM, G. J.; SIMONS, J. W. Nanotechnology applications in cancer. **The Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 9, p. 257-288, 2007.

NOUNOU, M. M.; EL-KHORDAGUI, L.; KHALLAFALLAH, N.; KHALIL, S. Influence of different sugar cryoprotectants on the stability and physico-chemical characteristics of freeze-dried 5-fluorouracil plurilamellar vesicles. **DARU**, v. 13, n. 4, p. 133-142, 2005.

OHVO-REKILÄ, H.; RAMSTEDT, B.; LEPPIMÄKI, P.; SLOTTE, P. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. **Progress in Lipid Research**, v. 41, p. 66–97, 2002.

PAN, J.; FENG, S. S. Targeted delivery of paclitaxel using folate-decorated poly(lactide)-vitamin E TPGS nanoparticles. **Biomaterials**, v. 29, n. 17, p. 2663-72, 2008.

PAN, J.; FENG, S. S. Targeting and imaging cancer cells by Folate-decorated, quantum dots (QDs)-loaded nanoparticles of biodegradable polymers. **Biomaterials**, v. 30, n. 6, p. 1176-1183, 2009.

PAN, X. Q.; WANG, H. Q.; LEE, R. J. Antitumor activity of folate receptor-targeted liposomal doxorubicin in a KB oral carcinoma murine xenograft model. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 3, p. 417-422, 2003.

PAPAHADJOPOULOS, D.; JACOBSON, K.; NIR, S.; ISAC, T. Phase transitions in phospholipid vesicles fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 311, p. 330-348, 1973.

PARK, J. W.; BENZ, C. C.; MARTIN, F. J. Future directions of liposome- and immunoliposome-based cancer therapeutics. **Seminars in Oncology**, v. 31, n. 13, p. 196-205, 2004.

PARKIN, D. M.; BRAY, F. I.; DEVESA, S. S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **European Journal of Cancer**, v. 37, p. S4–S66, 2001.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S. K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 8, p. 147–166, 2012.

PASQUALI, D.; ROSSI, V.; STAIBANO, S.; DE ROSA, G.; CHIEFFI, P.; PREZIOSO, D.; MIRONE, V.; MASCOLO, M.; TRAMONTANO, D.; BELLASTELLA, A.; SINISI, A. A. The endocrine-gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF)/prokineticin 1 and 2 and receptor expression in human prostate: Up-regulation of EG-VEGF/prokineticin 1 with malignancy. **Endocrinology**, v. 147, n. 9, p. 4245-51, 2006.

PATTY, P. J.; FRISKEN, B. J. The pressure-dependence of the size of extruded vesicles. **Biophysical Journal**, v. 74, p. 2996–3002, 1998.

PEER, D.; KARP, J. M.; HONG, S.; FAROKHZAD, O. C.; MARGALIT, R.; LANGER, R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nature Nanotechnology**, v. 2, p. 751-760, 2007.

PENG, B.; LLOYD, P.; SCHRAN, H. Clinical Pharmacokinetics of Imatinib. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 44, n. 9, p. 879-894, 2005.

PI, J.; JIN, H.; LIU, R. Y.; SONG, B.; WU, Q.; LIU, L.; JIANG, J.; YANG, F.; CAI, H. H.; CAI, J. Y. Pathway of cytotoxicity induced by folic acid modified selenium nanoparticles in MCF-7 cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 1051-1062, 2013.

PIETRAS, K.; RUBIN, K.; SJÖBLOM, T.; BUCHDUNGER, E.; SJÖQUIST, M.; HELDIN, C. H.; ÖSTMAN, A. Inhibition of PDGF receptor signaling in tumor stroma enhances antitumor effect of chemotherapy. **Cancer Research**, v. 62, p. 5476-5484, 2002.

PINTO, A. C.; MOREIRA, J. N.; SIMÕES, S. Liposomal Imatinib-Mitoxantrone combination: formulation development and therapeutic evaluation in an animal model of prostate cancer. **The Prostate**, v. 71, p. 81-90, 2011.

PISHVAIAN, M. J.; SLACK, R.; KOH, E. Y.; BEUMER, J. H.; HARTLEY, M. L.; COTARLA, I.; DEEKEN, J.; HE, A. R.; HWANG, J.; MALIK, S.; FIROZVI, K.; LIU, M.; ELSTON, B.; STRYCHOR, S.; EGORIN, M. J.; MARSHALL, J. L. A Phase I clinical trial of the combination of imatinib and paclitaxel in patients with advanced or metastatic solid tumors refractory to standard therapy. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 70, n. 6, p. 843-853, 2012.

QUINN, M.; BABB, P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. **BJU International**, v. 90, p.162–173, 2002.

RIVIERE, K.; HUANG, Z. H.; JERGER, K.; MACARAEG, N.; SZOKA, F. C. Antitumor effect of folate-targeted liposomal doxorubicin in KB tumor-bearing mice after intravenous administration. **Journal of Drug Targeting**, v. 19, n. 1, p. 14-24, 2011.

ROUSSIDIS, A. E.; THEOCHARIS, A. D.; TZANAKAKIS, G. N.; KARAMANOS, N. K. The importance of c-Kit and PDGF receptors as potential targets for molecular therapy in breast cancer. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 735-743, 2007.

ROWINSKY, E.; DONEHOWER, R. Paclitaxel (Taxol). **The New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 15, p. 1004-1014, 1995.

SAFRA, T.; ANDREOPOULOU, E.; LEVINSON, B.; BORGATO, L.; POTHURI, B.; BLANK, S.; TIERSTEN, A.; BOYD, L.; CURTIN, J.; MUGGIA, F. Weekly paclitaxel with intermittent imatinib mesylate (Gleevec): tolerance and activity in recurrent epithelial ovarian cancer. **Anticancer Research**, v. 30, n. 9, p. 3243-7, 2010.

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

SAHOO, S. K.; LABHASETWAR, V. Enhanced antiproliferative activity of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles is mediated via sustained intracellular drug retention. **Molecular Pharmaceutics**, v. 2, n. 5, p. 373-383, 2005.

SAHOO, S. K.; MA, W.; LABHASETWAR, V. Efficacy of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles in a murine model of prostate cancer. **International Journal of Cancer**, v. 112, p. 335-340, 2004.

SAPRA, P.; ALLEN, T. M. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. **Progress in Lipid Research**, v. 42, p. 439–462, 2003.

SAXENA, V.; NAGUIB, Y.; HUSSAIN, M. D. Folate receptor targeted 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) loaded polymeric nanoparticles for breast cancer. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 94, p. 274-280, 2012.

SAWANT, R. R.; TORCHILIN, V. P. Liposomes as 'smart' pharmaceutical nanocarriers. **Soft Matter**, v. 6, p. 4026–4044, 2010.

SCHULTZ, J. D.; ROTUNNO, S.; RIEDEL, F.; ANDERS, C.; ERBEN, P.; HOFHEINZ, R. D.; FABER, A.; THORN, C.; SOMMER, J. U.; HORMANN, K.; SAUTER, A. Synergistic effects of imatinib and carboplatin on VEGF, PDGF and PDGF-R α /ss expression in squamous cell carcinoma of the head and neck in vitro. **International Journal of Oncology**, v. 38, n. 4, p. 1001-12, 2011.

SENGUPTA, S.; EAVARONE, D.; CAPILA, I.; ZHAO, G.; WATSON, N.; KIZILTEPE, T.; SASISEKHARAN, R. Temporal targeting of tumour cells and neovasculature with a nanoscale delivery system. **Nature**, v. 436, n. 7050, p. 568-72, 2005.

SHAIKH, I. M.; TAN, K. B.; CHAUDHURY, A.; LIU, Y.; TAN, B. J.; TAN, B. M.; CHIU, G. N. Liposome co-encapsulation of synergistic combination of irinotecan and doxorubicin for the

treatment of intraperitoneally grown ovarian tumor xenograft. **Journal of Controlled Release**, 2013.

SHARMA, A.; SHARMA, U. S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 154, p. 123-140, 1997.

SIMÕES, S.; MOREIRA, J. N.; FONSECA, C.; DÜZGÜNES, N.; LIMA, M. C. P. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p.947– 965, 2004.

SINHA, R.; KIM, G. J.; NIE, S.; SHIN, D. M. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, n. 8, p. 1909-1917, 2006.

SLOAN, F. A.; GELBAND, H. Cancer control opportunities in low- and middle-income countries. **National Academy of Sciences**, 2007.

STARK, B.; PABST, G.; PRASSL, R. Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: Effects of cryoprotectants on structure. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, p. 546–555, 2010.

SZNITOWSKA, M.; KLUNDER, M.; PLACZEK, M. Paclitaxel solubility in aqueous dispersions and mixed micellar solutions of lecithin. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)**, v. 56, n. 1, p. 70-4, 2008.

TANIGUCHI, Y.; KAWANO, K.; MINOWA, T.; SUGINO, T.; SHIMOJO, Y.; MAITANI, Y. Enhanced antitumor efficacy of folate-linked liposomal doxorubicin with TGF-beta type I receptor inhibitor. **Cancer Science**, v. 101, n. 10, p. 2207-2213, 2010.

TARDI, P. G.; GALLAGHER, R. C.; JOHNSTONE, S.; HARASYM, N.; WEBB, M.; BALLY, M. B.; MAYER, L. D. Coencapsulation of irinotecan and floxuridine into low cholesterol-containing liposomes that coordinate drug release in vivo. **Biochimica & Biophysica Acta**, v. 1768, p. 678–687, 2007.

TOMASINA, J.; LHEUREUX, S.; GAUDUCHON, P.; RAULT, S.; MALZERT-FRÉON, A. Nanocarriers for the targeted treatment of ovarian cancers. **Biomaterials**, v. 34, p. 1073-1101, 2013.

TORCHILIN, V. P. Affinity liposomes in vivo: factors influencing target accumulation. **Journal of Molecular Recognition**, v. 9, p. 335-346, 1996.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Drug Discovery**, v. 4, p. 145-160, 2005.

TORCHILIN, V. P. Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example. **Handbook of Experimental Pharmacology**, Springer: Berlin, v. 97, p. 3-53, 2010.

TORCHILIN, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 131–135, 2011.

URAMOTO, H.; NAKANISHI, R.; NAGASHIMA, A.; UCHIYAMA, A.; INOUE, W.; OSAKI, T.; YOSHIMATSU, T.; SAKATA, H.; NAKANISHI, K.; YASUMOTO, K. A randomized Phase II trial of adjuvant chemotherapy with bi-weekly carboplatin plus paclitaxel versus carboplatin

plus gemcitabine in patients with completely resected non-small cell lung cancer. **Anticancer Research**, v. 30, p. 4695-4700, 2010.

USTER, P. S.; ALLEN, T. M.; DANIEL, B. E.; MENDEZ, C. J.; NEWMAN, M. S.; ZHU, G. Z. Insertion of poly(ethylene glycol) derivatized phospholipid into pre-formed liposomes results in prolonged in vivo circulation time. **FEBS Letters**, v. 386, p. 243-246, 1996.

VAJDA, A.; MARIGNOL, L.; BARRETT, C.; MADDEN, S. F.; LYNCH, T. H.; HOLLYWOOD, D.; PERRY, A. S. Gene expression analysis in prostate cancer: the importance of the endogenous control. **Prostate**, v. 73, n. 4, p. 382-90, 2013.

VASIR, J. K.; LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 718-728, 2007.

VLAHOVIC, G.; PONCE, A. M.; RABBANI, Z.; SALAHUDDIN, F. K.; ZGONJANIN, L.; SPASOJEVIC, I.; VUJASKOVIC, Z.; DEWHIRST, M. W. Treatment with imatinib improves drug delivery and efficacy in NSCLC xenografts. **British Journal of Cancer**, v. 97, n. 6, p. 735-40, 2007.

XIANG, B.; DONG, D.; SHI, N.; GAO, W.; YANG, Z.; CUI, Y.; CAO, D.; QI, X. PSA-responsive and PSMA-mediated multifunctional liposomes for targeted therapy of prostate cancer. **Biomaterials**, v. 34, p. 6976-6991, 2013.

XU, S.; OLENYUK, B. Z.; OKAMOTO, C. T.; HAMM-ALVAREZ, S. F. Targeting receptor-mediated endocytotic pathways with nanoparticles: Rationale and advances. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 121-138, 2013.

WALDE, P.; ICHIKAWA, S. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. **Biomolecular Engineering**, v. 18, p. 143-177, 2001.

WANG, C.; ZHU, G.; YU, L.; SHI, B. Preparation, in vitro, and in vivo antitumor activity of folate receptor-targeted nanoliposomes containing oridonin. **Drug Development Research**, v. 74, p. 43-49, 2013.

WANG, F. H.; CHEN, Y. X.; ZHANG, D. R.; ZHANG, Q.; ZHENG, D. D.; HAO, L. L.; LIU, Y.; DUAN, C. X.; JIA, L. J.; LIU, G. P. Folate-mediated targeted and intracellular delivery of paclitaxel using a novel deoxycholic acid-O-carboxymethylated chitosan-folic acid micelles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 325-337, 2012.

WANG, J.; WANG, Y.; LIANG, W. Delivery of drugs to cell membranes by encapsulation in PEG-PE micelles. **Journal of Controlled Release**, v. 160, p. 637-651, 2012.

WANG, J. C.; GOH, B. C.; LU, W. L.; ZHANG, Q.; CHANG, A.; LIU, X. Y.; TAN, T. M. C.; LEE, H. S. *In Vitro* cytotoxicity of Stealth liposomes co-encapsulating doxorubicin and verapamil on doxorubicin-resistant tumor cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 5, p. 822-828, 2005.

WANG, X.; LI, J.; WANG, Y. X.; KOENIG, L.; GJYREZI, A.; GIANNAKAKOU, P.; SHIN, E. H.; TIGHIOUART, M.; CHEN, Z.; NIE, S. M.; SHIN, D. M. A Folate Receptor-Targeting Nanoparticle Minimizes Drug Resistance in a Human Cancer Model. **Acs Nano**, v. 5, n. 8, p. 6184-6194, 2011.

WANG, X.; YANG, L.; CHEN, Z.; SHIN, D. M. Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging. **Cancer Journal for Clinicians**, v. 58, p. 97-110, 2008.

WANG, Y. Z.; YU, L.; HAN, L. M.; SHA, X. Y.; FANG, X. L. Difunctional Pluronic copolymer micelles for paclitaxel delivery: Synergistic effect of folate-mediated targeting and Pluronic-mediated overcoming multidrug resistance in tumor cell lines. **Int J Pharm**, v. 337, n. 1-2, p. 63-73, 2007.

WEIGEL, M. T.; DAHMKE, L.; SCHEM, C.; BAUERSCHLAG, D. O.; WEBER, K.; NIEHOFF, P.; BAUER, M.; STRAUSS, A.; JONAT, W.; MAASS, N.; MUNDHENKE, C. In vitro effects of imatinib mesylate on radiosensitivity and chemosensitivity of breast cancer cells. **BMC Cancer**, v. 10, p. 412, 2010.

WEIGEL, M. T.; MEINHOLD-HEERLEIN, I.; BAUERSCHLAG, D. O.; SCHEM, C.; BAUER, M.; JONAT, W.; MAASS, N.; MUNDHENKE, C. Combination of imatinib and vinorelbine enhances cell growth inhibition in breast cancer cells via PDGFR β signaling. **Cancer Letters**, v. 273, p. 70–79, 2009.

WHO (World Health Organization). Preventing chronic diseases: a vital investment: WHO global report. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**, 2005.

WU, J.; LIU, Q.; LEE, R. J. A folate receptor-targeted liposomal formulation for paclitaxel. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 316, n. 1-2, p. 148–153, 2006.

YANG, T.; CUI, F. D.; CHOI, M. K.; LIN, H.; CHUNG, S. J.; SHIM, C. K.; KIM, D. D. Liposome formulation of paclitaxel with enhanced solubility and stability. **Drug Delivery**, v. 14, n. 5, p. 301-8, 2007.

YUAN, F.; LEUNIG, M.; HUANG, S. K.; BERK, D. A.; PAPAHDJOPOULOS, D.; JAM, R. K. Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft. **Cancer Research**, v. 54, p. 3352-3356, 1994.

ZHANG, C.; ZHAO, L. Q.; DONG, Y. F.; ZHANG, X. Y.; LIN, J.; CHEN, Z. Folate-mediated poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyoctanoate) nanoparticles for targeting drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, p. 10–16, 2010c.

ZHANG, J. A.; ANYARAMBHATLA, G.; MA, L.; UGWU, S.; XUAN, T.; SARDONE, T.; AHMAD, I. Development and characterization of a novel Cremophor EL free liposome-based paclitaxel (LEP-ETU) formulation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 59, p. 177–187, 2005.

ZHANG, Y.; TANG, L.; SUN, L.; BAO, J.; SONG, C.; HUANG, L.; LIU, K.; TIAN, Y.; LI, Z.; SUN, H.; MEI, L. A novel paclitaxel-loaded poly(e-caprolactone)/Poloxamer 188 blend nanoparticle overcoming multidrug resistance for cancer treatment. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 2045–2052, 2010b.

ZHANG, Y. F.; WANG, J. C.; BIAN, D. Y.; ZHANG, X.; ZHANG, Q. Targeted delivery of RGD-modified liposomes encapsulating both combretastatin A-4 and doxorubicin for tumor therapy: in vitro and in vivo studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 74, n. 3, p. 467-73, 2010a.

ZHANG, Z.; YAO, J. Preparation of irinotecan-loaded folate-targeted liposome for tumor targeting delivery and its antitumor activity. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, n. 3, p. 802-810, 2012.

ZHAO, R. B.; GAO, F.; HANSCOM, M.; GOLDMAN, I. D. A prominent low-pH methotrexate transport activity in human solid tumors: Contribution to the preservation of methotrexate

pharmacologic activity in HeLa cells lacking the reduced folate carrier. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 2, p. 718-727, 2004.

ZHAO, X. B.; MUTHUSAMY, N.; BYRD, J. C.; LEE, R. J. Cholesterol as a bilayer anchor for PEGylation and targeting ligand in folate-receptor-targeted liposomes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 9, p. 2424-2435, 2007.

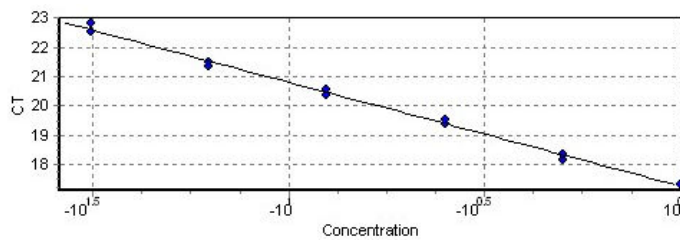
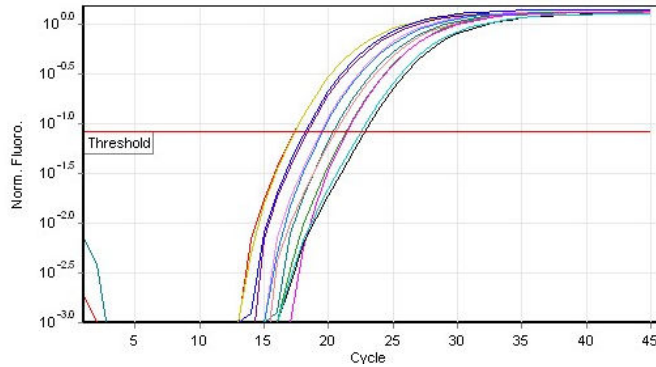
ZHAO, Y.; LI, J.; YUC, H.; WANG, G.; LIU, W. Synthesis and characterization of a novel polydepsipeptide contained tri-block copolymer (mPEG-PLLA-PMMD) as self-assembly micelle delivery system for paclitaxel. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430, p. 282– 291, 2012.

ZHOU, M.; ZHANG, X.; YANG, Y.; LIU, Z.; TIAN, B.; JIE, J.; ZHANG, X. Carrier-free functionalized multidrug nanorods for synergistic cancer therapy. **Biomaterials**, v. 34, p. 8960-8967, 2013.

ZUCKER, D.; BARENHOLZ, Y. Optimization of vincristine-topotecan combination — Paving the way for improved chemotherapy regimens by nanoliposomes. **Journal of Controlled Release**, v. 146, p. 326–333, 2010.

ANEXO 1 - Curvas de padronização dos genes β -actina, TBP e VEGF

Curva de padronização do gene β -actina

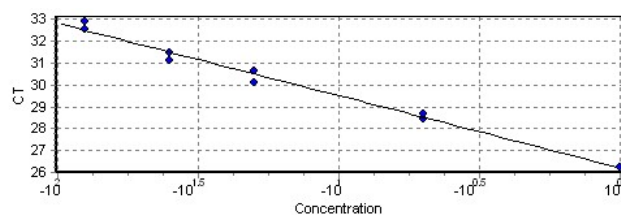
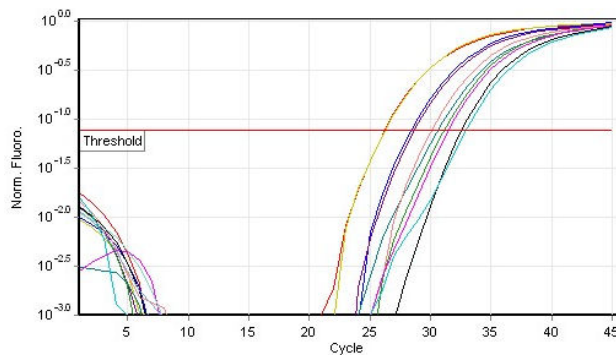


$$R^2 = 0,9958$$

$$\text{Eficiência da Reação} = 0,9215$$

$$CT = -3.525$$

Curva de padronização do gene TBP

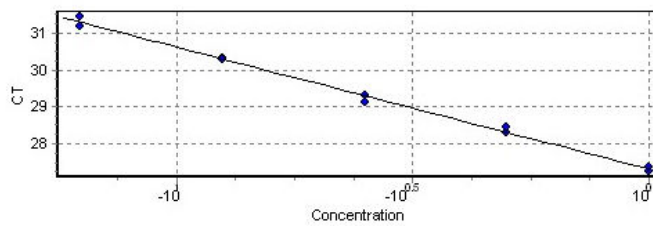
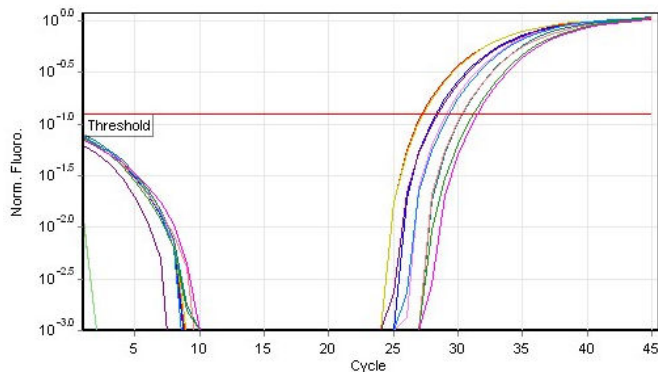


$$R^2 = 0.98963$$

$$\text{Eficiência da Reação} = 1,0$$

$$CT = -3.30764$$

Curva de padronização do gene VEGF



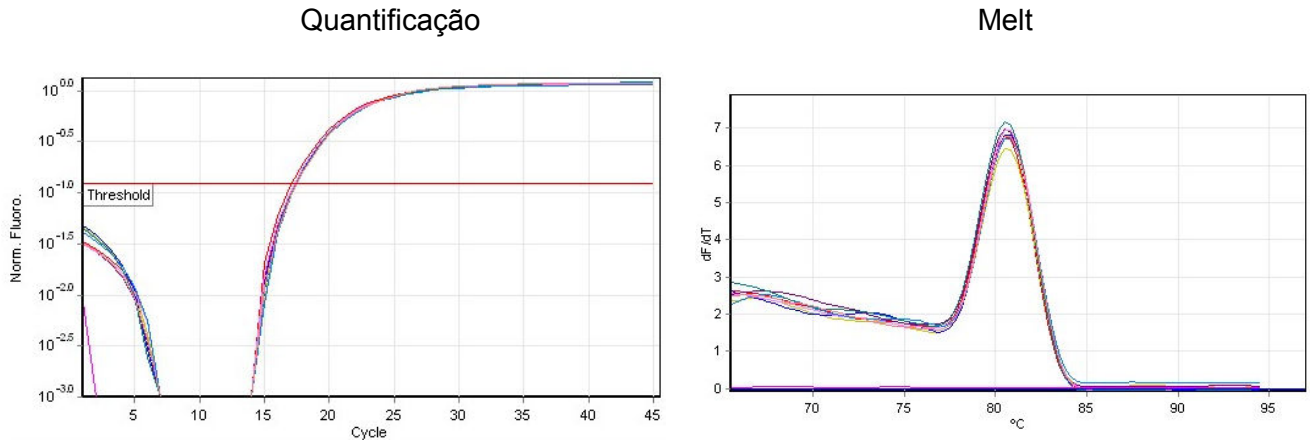
$$R^2 = 0.9954$$

Eficiência da Reação = 0,9941

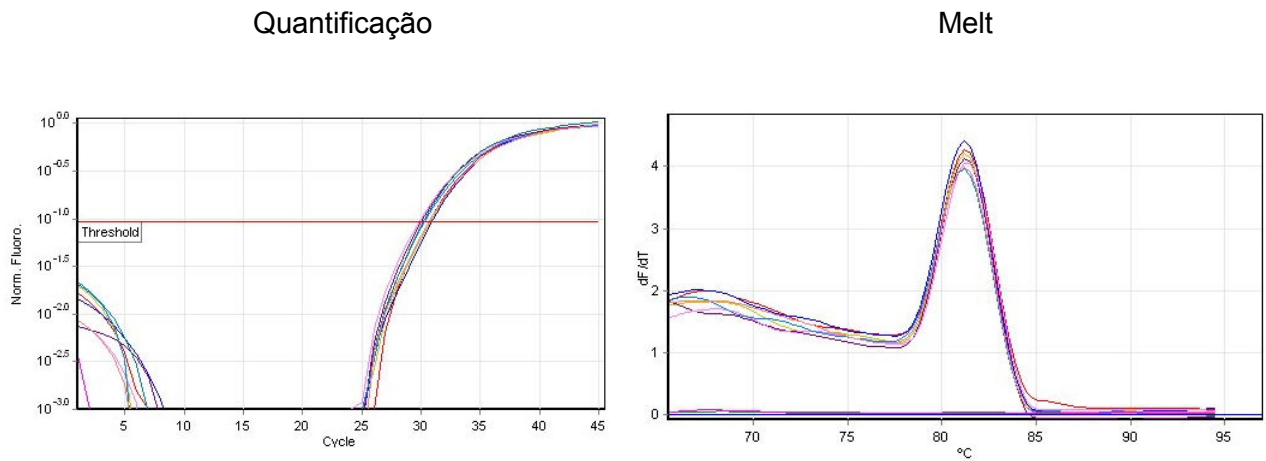
$$CT = -3.336$$

ANEXO 2 - Quantificação dos genes endógenos β -actina (MCF7) e TBP (PC3) e do gene VEGF (MCF7 e PC3)

Quantificação de β -actina (gene endógeno, MCF7)

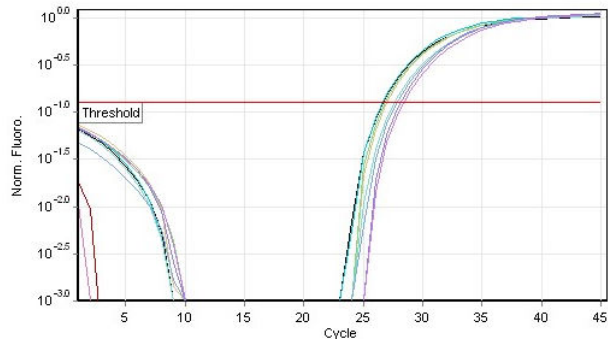


Quantificação de TBP (gene endógeno, PC3)

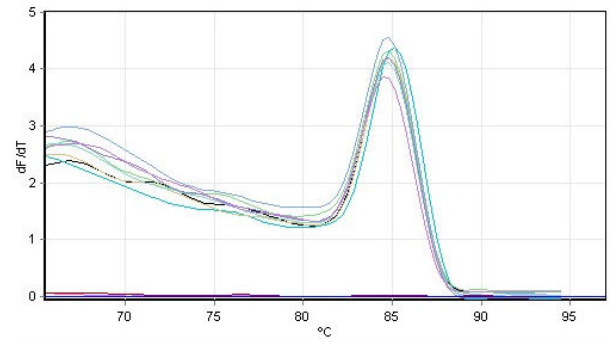


Quantificação do VEGF (amostra MCF7)

Quantificação

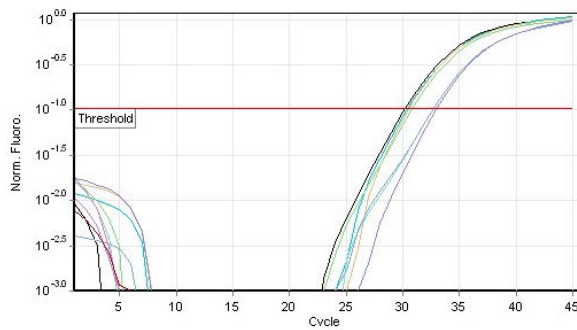


Melt



Quantificação do VEGF (amostra PC3)

Quantificação



Melt

