



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



**Avaliação do potencial de carreadores lipídicos nanoestruturados
funcionalizados com bevacizumabe para veiculação de docetaxel no
tratamento de glioblastoma multiforme**

Leonardo Delello Di Filippo

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara

2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



**Avaliação do potencial de carreadores lipídicos nanoestruturados
funcionalizados com bevacizumabe para veiculação de docetaxel no
tratamento de glioblastoma multiforme**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre
em Ciências Farmacêuticas.

L
Leonardo Delello Di Filippo

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara

2021

D536a Di Filippo, Leonardo Delello.
Avaliação do potencial de carreadores lipídicos
nanoestruturados funcionalizados com bevacizumabe para
veiculação de docetaxel no tratamento de glioblastoma multiforme
/ Leonardo Delello Di Filippo. – Araraquara: [S.n.], 2021.
62 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Marlus Chorilli.

1. Carreador lipídico nanoestruturado. 2. Docetaxel. 3. Glioblastoma multiforme. 4. Bevacizumabe. 5. Nanotecnologia farmacêutica. I. Chorilli, Marlus, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada



DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

DISCENTE: Leonardo Delello Di Filippo

TÍTULO DA TESE: Avaliação do potencial de carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com bevacizumabe para veiculação de docetaxel no tratamento de glioblastoma multiforme”.

DATA: 04/03/2021

☒ **APROVADO**

☐ **REPROVADO**

PARECER A SER EMITIDO NO MOMENTO DA DEFESA: O candidato fez uma excelente apresentação, no prazo regulamentar. Respondeu aos questionamentos com segurança. O trabalho escrito é excelente e acredita-se que os dados poderão ser publicados em periódicos de seletiva política editorial.

Araraquara, 04 de março de 2021

Prof. Dr. Marlus Chorilli

Membro Titular participante por meio de vídeo-conferência

DEDICATÓRIA

Este trabalho é fruto do suporte, amor e cuidado dos meus pais, **Jonas e Maria**, que nunca tiveram se quer a chance de cogitar estar num curso de nível superior, pois cresceram num cenário financeiro humilde e acesso bastante restrito ao ensino superior. Mesmo com todas as limitações financeiras e divergências de realidade, meus pais fizeram o possível – e o impossível – garantindo que eu tivesse todo o necessário e, até mais, para que eu chegasse aqui. E ainda continuam fazendo, me incentivando a ser um homem responsável, acreditando comigo nos meus sonhos e sonhando junto. Então, essa conquista é de nós três. Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. Marlus Chorilli, a gratidão pelos conhecimentos técnicos, pela atenção e tempo dispensados com muito cuidado ao meu projeto, além de tantos outros ensinamentos pessoais, infundindo inspiração com seu exemplo de profissionalismo e pelo ser humano que é. Obrigado por acreditar no meu potencial e por tantas oportunidades incríveis de crescimento!

Aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Pesquisa em Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica, Victor Hugo, Suzana, Bruno Fonseca-Santos, Amanda, Tais e Aline, minha gratidão por toda ajuda, aprendizado, por todo apoio, pelo carinho, por tornarem a caminhada mais fácil e agradável. Aprendi muito com cada um de vocês, como profissionais e seres humanos.

Um agradecimento especial ao meu querido Jonatas, por ser porto seguro, por me apoiar e pelos incríveis esquemas ilustrados e sugestões feitas à presente dissertação. Obrigado por fazer parte da minha vida de tantos modos diferentes e pelo cuidado de sempre!

Meus sinceros agradecimentos aos colegas Marcela Tavares, Juliana Azambuja, Rúbia Mancuso, Bruno Motta, Carlos Sabino e Lucas Barreto por todos os ensinamentos e disponibilidade em ajudar com meu projeto.

Agradeço também o apoio financeiro dispensado ao meu projeto, na forma de bolsa de mestrado concedida pela CAPES – código de financiamento 001 e também à FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de mestrado (2018/18488-3) e pela Bolsa de Estágio e Pesquisa no Exterior (2019/26255-5).

RESUMO

O glioblastoma (GBM) é a neoplasia maligna primária mais comum do Sistema Nervoso Central, responsável por cerca de 4% dos óbitos associados a neoplasias, caracterizando-se como um dos cânceres mais fatais. A quimioterapia é extensamente utilizada no tratamento e, dentre os fármacos disponíveis, o docetaxel (DTX) é um quimioterápico que vem demonstrando eficiência no tratamento do GBM, inibindo a proliferação celular a partir do bloqueio mitótico, impedindo a despolimerização dos microtúbulos, tornando-os instáveis e não funcionais, de modo que a célula não é capaz de se dividir e morre por apoptose. No entanto, a apresentação comercial deste fármaco, o Taxotere®, apresenta efeitos colaterais associados à biodistribuição sistêmica, bem como biodisponibilidade cerebral limitada, o que dificulta seu uso clínico. A fim de vencer a barreira hematoencefálica (BHE) e disponibilizar o fármaco de maneira mais eficiente, uma abordagem bastante atrativa é a encapsulação em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) funcionalizados com ligantes específicos de receptores VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) superexpressos em células tumorais de GBM, como o bevacizumabe. Os CLN podem ser úteis no tratamento quimioterápico, pois melhoram a biodisponibilidade dos fármacos, podendo entregá-los de modo seletivo às células cancerígenas, diminuindo a toxicidade sistêmica e aumentando a eficácia do tratamento. O presente trabalho objetivou avaliar o potencial de carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com bevacizumabe para veiculação de docetaxel no tratamento do glioblastoma multiforme. Os CLNs foram obtidos com sucesso por meio da técnica de fusão-emulsificação seguida de ultrassonicação, apresentando tamanhos na faixa de 110 a 149 nm, confirmados por técnicas de DLS e NTA, além de potencial zeta variando de -17.4 a -24.8 mV, bem como índice de polidispersividade variando de 0,148 a 0,388. Os CLN apresentaram morfologia esférica conforme demonstrado por análises de MET. A eficiência de encapsulação (EE%) para os CLN convencionais ou funcionalizados foi de 93,22% e 90,30% respectivamente. Os CLN foram funcionalizados por reação de tiolação do bevacizumabe e a eficiência de funcionalização (EF%) encontrada foi superior a 62%. A integridade do bevacizumabe nos CLN após o processo de funcionalização foi confirmada por ensaios de SDS-PAGE e espectroscopia de fluorescência. Análises de DSC confirmaram a estabilidade térmica do sistema convencional e funcionalizado. Os CLN funcionalizados apresentaram perfil de liberação gradual e sustentada. Ensaios celulares para avaliação da atividade antitumoral *in vitro* dos CLN funcionalizados ou não demonstraram que a formulação funcionalizada potencializou seletivamente a atividade citotóxica do DTX em células que superexpressam VEGF, como U87MG e A172, mas não em células saudáveis (PMBCs, níveis basais de VEGF), sendo capaz de provocar redução da viabilidade celular devido à morte por apoptose. Estes resultados indicam que a encapsulação do DTX em CLN funcionalizados com BVZ foi capaz de preservar sua atividade citotóxica e potencializar sua citotoxicidade em células que superexpressam VEGF, representando um importante avanço na obtenção de medicamentos mais eficientes e menos tóxicos, com auxílio da nanotecnologia.

Palavras-chave: Carreador lipídico nanoestruturado; Docetaxel; Glioblastoma multiforme; Bevacizumabe; Nanotecnologia farmacêutica.

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common primary malignant cancer of the Central Nervous System, responsible for about 4% of deaths associated with neoplasms, being characterized as one of the most fatal human cancers. Chemotherapy is widely used in the treatment and, among the available drugs, docetaxel (DTX) is a chemotherapy that has been showing efficiency in the treatment of GBM, inhibiting cell proliferation from the mitotic block, preventing the depolymerization of the microtubules, making them unstable and non-functional, so the cell is unable to divide and dies from apoptosis. However, the commercial presentation of this drug, Taxotere[®], has side effects associated with systemic biodistribution, as well as limited brain bioavailability, which makes its clinical use difficult. In order to overcome the blood-brain barrier (BBB) and make the drug available more efficiently, a very attractive approach is encapsulation in nanostructured lipid carriers (NLC) functionalized with specific ligands of VEGF (vascular endothelial growth factor) receptors overexpressed in GBM tumor cells, such as bevacizumab (BVZ). NLC can be useful in chemotherapy treatment, as they improve the bioavailability of drugs, being able to selectively deliver them to cancer cells, reducing systemic toxicity and increasing the effectiveness of the treatment. The current work aimed to evaluate the potential of NLC functionalized with BVZ for the delivery of docetaxel in the treatment of glioblastoma multiforme. The NLC were successfully obtained using the fusion-emulsification technique followed by ultrasonication, with sizes ranging from 110 to 149 nm, confirmed by TEM, NTA and DLS analysis, zeta potential ranging from -17.4 to -24.8 mV, as well as polydispersity index ranging from 0.148 to 0.388, in addition to presenting spherical morphology, as evidenced by transmission electron microscopy. The encapsulation efficiency (EE%) for conventional or functionalized NLC was 93.22% and 90.30% respectively. The NLC were functionalized by a BVZ thiol reaction and the functionalization efficiency (EF%) found was higher than 62%. The integrity of BVZ in the CLN after the functionalization process was confirmed by SDS-PAGE assays and fluorescence spectroscopy. DSC analyzes confirmed the thermal stability of the conventional and functionalized system. Functionalized NLC showed a gradual and sustained release profile. Cellular assays for evaluating the in vitro antitumor activity of functionalized NLC or did not demonstrate that the functionalized formulation selectively potentiated the cytotoxic activity of DTX in cells that overexpress VEGF, such as U87MG and A172, but not in healthy cells (PMBCs, basal VEGF levels), being able to reduce cell viability due to death by apoptosis. These results indicate that DTX encapsulation in BVZ functionalized NLC was able to preserve its antitumor activity and potentiate its cytotoxicity in cells that overexpress VEGF, representing an important advance in obtaining more efficient and less toxic drugs, with the help of nanotechnology.

Keywords: Nanostructured lipid carrier; Docetaxel; Glioblastoma multiforme; Bevacizumab; Pharmaceutical nanotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular do DTX (GALLETI et al. 2007).....	5
Figura 2. Efeito do docetaxel na função dos microtúbulos, impedindo a desmontagem dos monômeros de tubulina (MONTERO et al. 2005).....	6
Figura 3. Representação de NLS: fármaco hidrofílico adsorvido na superfície (quadrados cinzas) e fármaco hidrofóbico encapsulado no interior lipídico (esferas pretas). Adaptado de OLIVEIRA et al. 2012.....	8
Figura 4. Esquema representativo do processo de incorporação do ativo em carreadores lipídicos nanoestruturados. Adaptado de Guimarães e Ré, 2011.	9
Figura 5. Esquema ilustrado de obtenção dos CLN carregados com DTX. Fase aquosa (FA) vertida sobre fase oleosa (FO) em agitação magnética até formação de microemulsão (ME), que será então sonicada para diminuição do tamanho de partícula que dará origem aos CLN.	21
Figura 6. Aspecto macroscópico da suspensão de CLN contendo DTX após processo de obtenção. Fonte: autor.	21
Figura 7. Ilustração esquemática do processo de purificação das frações Bv-SH, após tiolação com reagente de Traut.....	22
Figura 8. Aspecto macroscópico da suspensão de CLN contendo DTX funcionalizados com BVZ. Fonte: autor.....	22
Figura 9. Fotomicrografias obtidas por MET, sendo: A – CLN vazios; B – CLN contendo DTX; Aumento de 100 mil vezes; Fonte: autor.	23
Figura 10. Variação no diâmetro hidrodinâmico médio das partículas após 90 dias de obtenção.	25
Figura 11. Curva analítica obtida através de solução de DTX em ACN.....	27
Figura 12. Esquema reacional ilustrando a formação da ligação tioéter a partir do anticorpo (BVZ) tratado com reagente de Traut. Fonte: autor.....	30
Figura 13. Perfil eletroforético do CLN contendo DTX funcionalizados com BVZ (CLN), do anticorpo tiolado (Bv-SH) e também do padrão comercial (BVZ), Avastin®.	31
Figura 14. Espectro de fluorescência normalizado do bevacizumabee em solução e bevacizumabee tiolado com excitação a 280nm (A) e 295nm (B).	32
Figura 15. Espectro de fluorescência dos CLN contendo DTX, do BVZ em solução, do BVZ tiolado e dos CLN contendo DTX funcionalizados com BVZ, com excitação a 295nm.	33
Figura 16. Perfis de liberação para DTX em solução, CLN-DTX e CLN-DTX-BVZ, em meio receptor, a 37 graus celsius, a 150 RPM.....	35
Figura 17. Termogramas obtidos nas análises de DSC, referentes as amostras de CLN contendo ou não DTX, funcionalizados ou não.	37
Figura 18. Viabilidade celular (%) da linhagem U87MG após 72 horas de tratamento com as formulações: DTX solução (DTX. sol), CLN, CLN-BVZ, CLN-DTX e CLN-DTX-BVZ.....	39
Figura 19. Viabilidade celular (%) da linhagem A172 após 72 horas de tratamento com as formulações: DTX solução (DTX. sol), CLN, CLN-BVZ, CLN-DTX e CLN-DTX-BVZ.....	40
Figura 20. Viabilidade celular (%) dos PMBCs após 72 horas de tratamento com as formulações: DTX solução (DTX. sol), CLN, CLN-BVZ, CLN-DTX e CLN-DTX-BVZ.....	41
Figura 21. (A) Efeito dos CLN contendo ou não DTX, funcionalizados ou não, em células U87MG tratadas por 72 horas, nas concentrações de 0.5, 5 e 50 nM, que foram posteriormente analisadas por citometria de fluxo; (B) Taxa de apoptose das células U87MG após o experimento. As células controles foram tratadas com DMEM.	43

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Descrição quali-quantitativa das matérias primas empregadas na obtenção de 1 mL da dispersão de CLN carregados com DTX.	16
Tabela 2. Parâmetros analíticos empregados na determinação da EE% de DTX presente nos CLN.....	22
Tabela 3. Resultados médios $\pm$ desvio padrão encontrados após 90 dias para as formulações.	24
Tabela 4. Resultados médios $\pm$ desvio padrão encontrados após 90 dias para as formulações funcionalizadas ou não, contendo ou não DTX.	26
Tabela 5. Quantidades de DTX em $\mu\text{g/mL}$ e respectivas EE% encontradas para as formulações de CLN total (analisadas imediatamente após processo de obtenção); CLN purificado (em cromatografia CL-4B) e CLN funcionalizados.	28
Tabela 6. Perfis de liberação de CLN-DTX e CLN-DTX-BVZ ajustado aos modelos matemáticos mais comumente utilizados para descrever o mecanismo de liberação.	36
Tabela 7. Relação de amostra e seus respectivos pontos de fusão e variações de entalpia (ΔH)	36

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATCC - american type cell culture

APC - alofococianina

BCA - ácido bicinconínico

Bv-SH - sulfidril-bevacizumabe

BVZ - bevacizumabe

CCTG - triglicérides de ácido cáprico/caprílico

CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

CLN - carreador lipídico nanoestruturado

CO₂ - dióxido de carbono

DLS - dispersão de luz dinâmica

DSC – calorimetria exploratória diferencial

DTX - docetaxel

E40 - estearato de polioxietileno 40

EE% - eficiência de encapsulação

EF - espectroscopia de fluorescência

EF% - eficiência de funcionalização

FA - fase aquosa

FO - fase oleosa

GBM - glioblastoma multiforme

IC₅₀ - índice de morte celular

ME - microemulsão

MET - microscopia eletrônica de transmissão

NLS - nanopartícula lipídica sólida

NTA – nanocarrier tracking assay

P407 - poloxamer 407

PBS - tampão fosfato

PDI - índice de polidispersividade

PEG40 - óleo de rícino hidrogenado etoxilado

PEG-MAL - DSPE-PEG-2000-MALEIMIDA

PZ - potencial zeta

SNC - sistema nervoso central

VEGF - fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Glioblastoma multiforme	3
2.2. Tratamentos convencionais utilizados no combate ao glioblastoma multiforme	4
2.2.1. Docetaxel	5
2.2.2. Bevacizumabe	7
2.3. Sistemas de liberação de fármacos e nanotecnologia	7
3. OBJETIVOS	10
3.1. Objetivo geral	10
3.2. Objetivos específicos	10
4. MATERIAIS E MÉTODOS	11
4.1. MATERIAL	11
4.1.1. Solventes, reagentes e matérias primas;	11
4.1.2. Equipamentos	12
4.2. MÉTODOS	13
4.2.1. Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados carregados com docetaxel	13
4.2.2. Funcionalização dos carreadores lipídicos nanoestruturados com bevacizumabe	14
4.2.3. Caracterização físico-química dos sistemas	15
4.2.3.1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	15
4.2.3.2. Diâmetro hidrodinâmico médio, IPD e potencial zeta	15
4.2.3.3. Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)	15
4.2.3.4. Quantificação do DTX	16
4.2.3.4.1. Metodologia analítica	16
4.2.3.4.2. Avaliação da eficiência da encapsulação do DTX	16
4.2.3.5. Avaliação da eficiência de funcionalização (EF%)	17
4.2.3.6. Avaliação da integridade da proteína por SDS-PAGE	17
4.2.3.7. Espectroscopia de Fluorescência	18
4.2.3.8. Estudo da cinética de liberação <i>in vitro</i>	18
4.2.3.9. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	18
4.2.4. Estudos em cultura celular: avaliação da citotoxicidade e internalização celular	19
4.2.4.1. Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)	19
4.2.4.2. Avaliação da atividade antitumoral <i>in vitro</i> em células de glioblastoma multiforme e células saudáveis	19
4.2.4.3. Avaliação do mecanismo de morte celular por citometria de fluxo	20
5. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	20
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
6.1. Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados carregados com docetaxel	21
6.2. Funcionalização dos carreadores lipídicos nanoestruturados com bevacizumabe	22
6.3. Caracterização físico-química dos sistemas	23
6.3.1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	23
6.3.2. Diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade e potencial zeta	23
6.3.3. Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)	25
6.3.4. Avaliação da eficiência da encapsulação (EE%) do docetaxel	27
6.3.5. Avaliação da eficiência de funcionalização (EF%)	29
6.3.6. Avaliação da integridade da proteína por SDS-PAGE	30
6.3.7. Espectroscopia de Fluorescência (EF)	31
6.3.8. Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do DTX	33
6.3.9. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	36
6.4. Avaliação da citotoxicidade em células de glioblastoma multiforme e células saudáveis	38
6.5. Avaliação do mecanismo de morte celular por citometria de fluxo	42
7. CONCLUSÕES	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1. INTRODUÇÃO

De forma genérica, uma neoplasia maligna do Sistema Nervoso Central (SNC) pode ser definida como um crescimento anormal em quantidade ou tamanho – hiperplasia e hipertrofia - de células provenientes dos tecidos encontrados no cérebro ou medula espinal (USA National Cancer Institute and PDQ Adult Treatment Editorial Board, 2020). Este termo genérico compreende, hoje, um grupo heterogêneo de mais de 120 tipos distintos de neoplasias (Brain Tumor Types & Symptoms - USA National Brain Tumor Society). Dentre essas neoplasias, destaca-se o glioblastoma multiforme (GBM), como um dos tipos mais agressivos e letais de neoplasias do SNC.

Os sinais e sintomas indicativos de neoplasias que acometem o SNC podem acontecer gradualmente seguidos de progressão de intensidade ou frequência, bem como podem ocorrer repentinamente e em sua plenitude. Esses sintomas ainda podem variar de acordo com a idade do paciente bem como de acordo com o tecido do SNC que foi acometido. De forma geral, os sintomas mais comumente presentes nas neoplasias que acometem o SNC são: dor de cabeça, visão borrada, náusea, vômito, distúrbios de equilíbrio, mudanças na personalidade ou comportamento, convulsões, desorientação e até mesmo coma (Signs and Symptoms of Adult Brain and Spinal Cord Tumors, American Cancer Society).

A incidência de tumores malignos primários acometendo o SNC vem crescendo nos últimos anos (PHILIPS et al., 2018). Entretanto, a causa mais comum de tumores no SNC são as metástases, cuja incidência é cerca de 10 vezes maior em relação aos tumores primários. Estima-se que 20% a 40% de pacientes com tumores sistêmicos primários irão desenvolver algum tipo de metástase no SNC (PATCHELL, 2003). Nos Estados Unidos da América, neoplasias malignas do SNC representam a terceira maior causa de morte entre jovens e adultos na faixa etária de 15 a 34 anos (BUCKNER et al. 2007).

Em 2020, os Estados Unidos da América (Cancer Facts and Figures, American Cancer Society, 2020) estimam cerca de 23.890 mil novos casos de neoplasias malignas acometendo o SNC e ainda 18.020 mortes. Dentro dessa perspectiva, os astrocitomas anaplásticos e o GBM representam juntos 38% do total.

Atualmente os tratamentos convencionais empregados na terapêutica do GBM se demonstram ineficazes, devido às características biológicas e moleculares desta

neoplasia, que possibilitam o processo de resistência e progressão tumoral. Um dos principais quimioterápicos disponíveis comercialmente utilizados para tratar o GBM, o docetaxel, Taxotere®, apresenta limitações quanto ao seu uso clínico e consequentemente tem sua eficiência terapêutica comprometida. Ainda, o BVZ é recomendado atualmente em casos de GBM metastático ou resistente à quimioterapia convencional, pois parece aumentar a sobrevida dos pacientes além de diminuir a densidade e a angiogênese tumoral (DIAZ et al. 2017).

Além disso, estudos demonstram que sistemas nanoestruturados vêm ganhando destaque no tratamento de cânceres, por se demonstrarem alternativas promissoras, capazes de otimizar a entrega de ativos às células cancerígenas, além de melhorarem o perfil de efeitos adversos, diminuindo a toxicidade sistêmica de formulações contendo docetaxel (SÉHÉDIC et al. 2015; MUJOKORO et al. 2016). Ainda, não existem atualmente no mercado formulações que empreguem nanocarreadores funcionalizados associando o docetaxel a um agente anti-angiogênico, como o bevacizumabe.

Portanto, justifica-se o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos, destacando os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) funcionalizados com bevacizumabe (BVZ) para a veiculação de docetaxel, constituindo uma abordagem inovadora para ressignificar o tratamento do GBM, representando uma perspectiva de melhora da eficácia do tratamento e da redução de efeitos colaterais, uma vez que se usa uma ferramenta nanotecnológica associada à agentes terapêuticos que impedem a progressão do tumor bem como sua metástase através da migração de células resistentes para outros sítios, ocasionada frequentemente pela elevada angiogênese que pode ocorrer no GBM.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Glioblastoma multiforme (GBM)

O GBM, um astrocitoma grau IV (AGNIHOTRI et al., 2013), é o tipo de neoplasia cerebral maligna mais comum e mais invasiva, representando mais de 60% dos tumores cerebrais primários em adultos (ROCK et al., 2014). É responsável por cerca de 4% de todos os óbitos associados a neoplasias. Apesar do GBM ocorrer majoritariamente no cérebro (em 60% dos casos), também pode acometer outras estruturas componentes do Sistema Nervoso Central (SNC), como o tronco encefálico, o cerebelo e a medula espinhal (AANN, 2014). O GBM se manifesta mais frequentemente na faixa etária dos 60 aos 64 anos, acometendo mais homens que mulheres (1,6:1), bem como populações de etnia caucasiana (ELLOR; PAGANO-YOUNG; AVGEROPOULOS, 2014) em detrimento das demais.

Atualmente, esforços vêm sendo empregados a fim de determinar possíveis fatores de risco no desenvolvimento de GBM, mas este cenário ainda é bastante incipiente e inconclusivo. Sabe-se que a exposição à radiação ionizante é um fator de risco conhecido por aumentar o risco de desenvolvimento de GBM (JOHNSON et al. 2015). Alguns outros fatores de risco atualmente considerados na etiologia do GBM são: exposição à cloreto de vinila; infecção pelo vírus Epstein-Barr; transplante de órgãos, bem como AIDS (National Cancer Institute and PDQ Adult Treatment Editorial Board, 2020). Ainda, é sabido que países desenvolvidos possuem maior taxa de incidência de GBM (THAKKAR et al. 2014), fator que pode ser atribuído à deficiência na notificação de casos de GBM em países subdesenvolvidos, bem como acesso limitado a serviços de saúde que disponham de tecnologias necessárias para diagnóstico do GBM (ex: tomografia computadorizada, ressonância magnética) além de diferentes protocolos diagnósticos, em países emergentes (OHGAKI 2009).

Suas manifestações clínicas podem ser causadas basicamente por três mecanismos (HANIF et al. 2017): (1) como efeito direto da destruição do tecido cerebral provocada pela necrose tecidual; (2) como efeito secundário da pressão intracranial elevada, provocada pelo crescimento da massa tumoral e edema tecidual ou ainda; (3) em função da localidade e do tamanho do tumor, bem como das estruturas anatômicas cerebrais acometidas (LOBERA, 2015; YOUNG et al. 2015). Pacientes acometidos por GBM frequentemente apresentam pressão intracranial elevada, cefaleia e déficits neurológicos focais ou progressivos. Em 25%

dos pacientes, ocorrem convulsões, sintomas característicos de estágios mais avançados do GBM (PERRY et al. 2006; SCHIFF et al. 2015).

O diagnóstico inicial é feito por meio de imageamento digital, que inclui tomografia computadorizada e ressonância magnética, como técnicas complementares. Quando visto através de uma ressonância magnética, o GBM aparece na forma de uma lesão com realce em anel. Entretanto, todos os tumores do SNC devem ser confirmados por biópsia estereotática ou craniotomia com ressecção do tumor, uma vez que esse aspecto de lesão não é patognomônico para GBM, podendo ser encontrado em outras lesões como abscessos, metástases, esclerose múltipla tumefativa, ente outros (SMIRNIOTOPOULOS et al. 2007).

2.2. Tratamentos convencionais utilizados no combate ao glioblastoma multiforme

As diretrizes terapêuticas atuais empregadas no tratamento do GBM preconizam uma abordagem multidisciplinar, majoritariamente com remoção cirúrgica, associadas à rádio e quimioterapia quando conveniente. Entretanto, estes tratamentos são bastante invasivos e acabam por debilitar consideravelmente a saúde dos pacientes. Além disso, devido à sua alta invasividade, a remoção cirúrgica do GBM não possui caráter curativo, de modo que, invariavelmente, algumas células persistentes permanecerão no cérebro, podendo levar à progressão da doença ou recidiva (WILSON et al. 2014), sendo necessário associar a esta técnica, frequentemente, rádio e/ou quimioterapia.

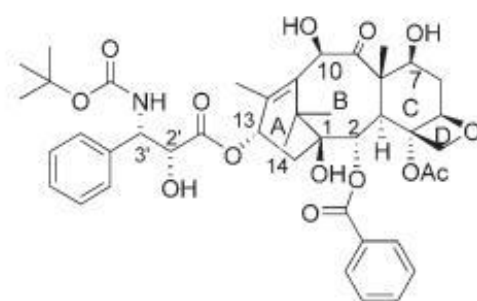
Ainda que novas tecnologias estejam sendo desenvolvidas para o tratamento do GBM, esta neoplasia ainda se caracteriza como bastante letal e de prognóstico ruim, uma vez que os tratamentos atualmente disponíveis não possuem caráter curativo, possuindo apenas o papel de prolongar a sobrevida do paciente (BATASH et al. 2017), pois estima-se que os pacientes tenham tempo médio de sobrevida de 14 a 15 meses a partir do diagnóstico (THAKKAR et al. 2014).

2.2.1. Docetaxel

O docetaxel (DTX, Figura 1) é um antineoplásico pertencente à classe dos taxanos. Pode ser obtido por rota semissintética a partir do 10-deacetilbaccarina III, substância não-citotóxica isolada a partir das folhas das árvores de Teixo europeu (*Taxus baccata*) (HERBST & KHURI, 2003). Em relação ao seu análogo paclitaxel, o DTX apresenta absorção mais rápida, menor toxicidade sistêmica, além de melhor solubilidade em água. Isso ocorre devido às pequenas modificações estruturais em sua molécula, em duas posições específicas: o grupo tert-butoxi C-13, em vez do grupo fenil benzamida encontrado no paclitaxel, e o grupo hidroxila C-10 substituindo o grupo acetila (SILVA et al. 2018).

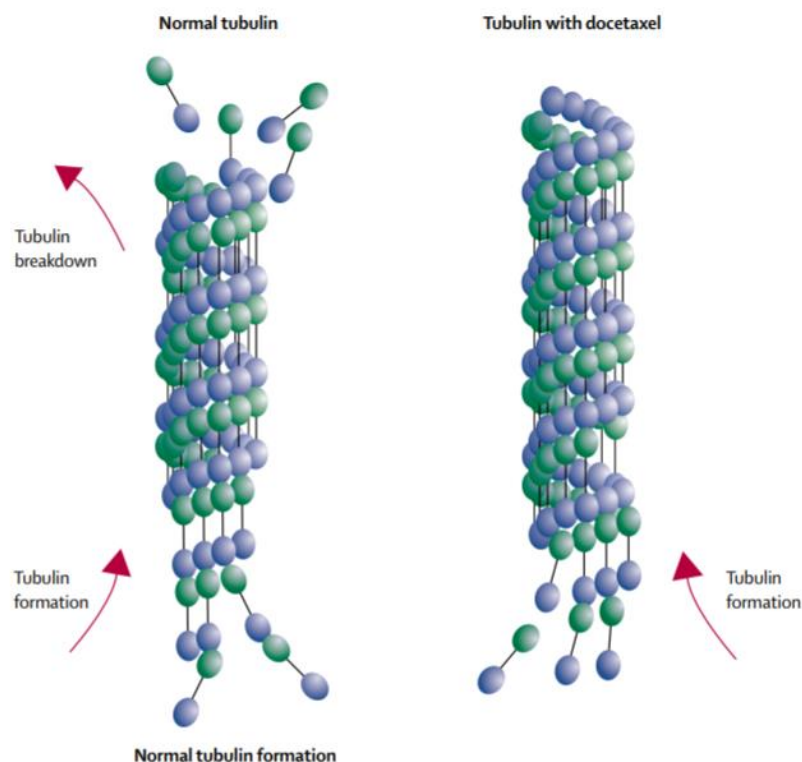
Foi clinicamente aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) em 2004, e faz parte da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) do Brasil. Desde quando aprovado, sua utilização vem crescendo devido à eficácia no tratamento de diversas neoplasias malignas primárias bem como metástases, incluindo o GBM (HESS et al. 2005). Além de sua destacada propriedade anti-tumoral, o DTX apresenta maior *uptake* e acumulação intracelular, bem como maior afinidade pelos microtúbulos quando comparado a outros taxanos (VON HOFF, 1997). Dentre os quimioterápicos atualmente disponíveis, o DTX é considerado um dos fármacos mais eficazes no tratamento de neoplasias que acometem o SNC (LI et al. 2015).

Figura 1. Estrutura molecular do DTX (GALLETI et al. 2007).



Seu mecanismo de ação consiste na inibição da proliferação celular a partir do bloqueio mitótico sustentado (Figura 2) nas fases de metáfase e anáfase do ciclo celular. O DTX promove a polimerização de microtúbulos, tornando-os estáveis e prevenindo sua desmontagem, levando a apoptose celular (PEREIRA et al. 2016).

Figura 2. Efeito do docetaxel na função dos microtúbulos, impedindo a desmontagem dos monômeros de tubulina (MONTERO et al. 2005).



No entanto, a formulação atualmente disponível comercialmente contendo DTX, Taxotere[®], apresenta efeitos colaterais significativos resultantes da distribuição não-seletiva do fármaco propriamente, bem como dos adjuvantes farmacotécnicos presentes na formulação, como altas concentrações de polisorbato 80 e etanol, para contornar a baixa solubilidade aquosa apresentada pelo DTX. As reações adversas medicamentosas mais comuns incluem neutropenia, toxicidade musculoesquelética, neuropatia periférica e reações de hipersensibilidade em grande parcela dos pacientes. Estes efeitos estão relacionados à oxidação do polisorbato 80 na presença de ácido oleico, promovendo liberação sistêmica de histamina, que desencadeia reações de hipersensibilidade (BAKER et al. 2008).

Desta forma, embora possua grande potencial para o tratamento de neoplasias malignas do SNC, devido às reações adversas e às propriedades farmacocinéticas desfavoráveis do fármaco, a utilização clínica de Taxotere[®] se tornou limitada, de modo que é necessário explorar novas formulações que apresentem menos toxicidade sistêmica e mais seletividade para as células tumorais, a fim de obter-se um perfil de efeitos adversos clinicamente mais brando

(TAN et al. 2012; BERTHOLD et al. 2008; MANJAPPA et al. 2013) e melhorar sua eficácia terapêutica.

2.2.2. Bevacizumabe

O bevacizumabe (BVZ) é um anticorpo monoclonal humanizado recombinante, cujo alvo é o VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular), cujos receptores estão frequentemente superexpressos em vários tipos de células cancerígenas, como no caso do GBM. O BVZ atua capturando o VEGF livre, impedindo que este fator de crescimento se ligue a seus receptores (Flt-1 e KDR) na superfície das células endoteliais. Ao bloquear a ação do VEGF, impede a angiogênese necessária para alimentar tumores malignos, que também confere capacidade metastática. A formulação comercialmente disponível, Avastin®, foi aprovada pelo FDA em dezembro de 2017 para o tratamento de GBM recorrente em pacientes adultos. Além disso, o BVZ tem uso recomendado em associação com outros antineoplásicos, para tratamento de câncer colorretal, renal e pulmonar.

Uma vez que o GBM é uma das neoplasias humanas mais vascularizadas (LOUIS et al., 2007), o BVZ vem sendo utilizado como tratamento de escolha quando ocorre falha terapêutica da rádio e/ou quimioterapia convencionais (WENGER et al. 2017), com quadros de reincidência do tumor (CASTRO; AGHI, 2014). Nestes casos, o BVZ parece aumentar o tempo de sobrevida dos pacientes. Em pacientes tratados com BVZ, o tumor apresentou uma redução de volume, bem como diminuição da densidade vascular local (DIAZ et al. 2017).

Ainda, o BVZ apresenta padrão de distribuição consistente (LEVÊQUE; WISNIEWSKI; JEHI, 2005), limitada à vasculatura tumoral, com distribuição extravascular mínima (LIN et al. 1999), características farmacocinéticas que favorecem propriedades clínicas seguras para os pacientes em tratamento.

2.3. Sistemas de liberação de fármacos e nanotecnologia

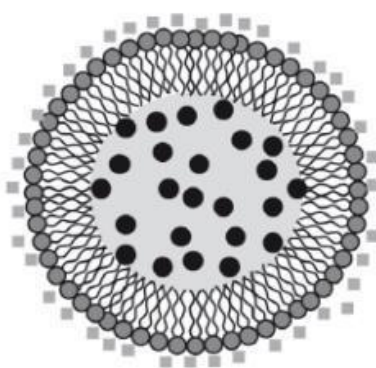
O processo que compreende a chegada de um medicamento ao mercado é bastante demorado e dispendioso. Desta forma, ferramentas da Tecnologia Farmacêutica vêm sendo utilizadas com o objetivo de aumentar a eficácia de fármacos e tratamentos já existentes (SINGH et al. 2012). Dentro deste contexto, os sistemas de liberação de fármacos são amplamente utilizados, uma vez que

esses sistemas permitem alterar propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas do fármaco, promovendo uma liberação controlada e efeitos adversos mais brandos e manejáveis (WICKI et al. 2015) além da melhora do efeito terapêutico.

Dentre os sistemas nanoestruturados empregados atualmente, destacam-se os sistemas baseados em lipídeo-tensoativo, como as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). Os primeiros relatos destes tipos de carreadores se dão no final da década de 1990, como uma alternativa plausível e comercialmente aceitável aos carreadores coloidais convencionais – como lipossomas, micro e nanopartículas poliméricas e emulsões (NASERI; VALIZADEH; ZAKERI-MILANI, 2015). O interesse nos sistemas baseados em lipídeo-tensoativos como sistema de liberação de fármacos se dá principalmente por suas diversas vantagens em relação a outras formulações, como: biocompatibilidade, tolerabilidade, estabilidade, liberação controlada, facilidade de produção em larga escala, elevada estabilidade química e biológica, proteção contra degradação enzimática, permitir processos de esterilização (WANG et al. 2002; WISSING et al. 2004; MANJUNATH et al. 2005; OLIVEIRA et al. 2012; MASSERINI, 2013), além da capacidade de direcionar o fármaco ao seu alvo terapêutico.

As NLS são compostas por um núcleo hidrofóbico sólido, revestido por uma monocamada de fosfolipídios: suas extremidades hidrofóbicas encontram-se incorporadas na matriz (Figura 3). Podem transportar fármacos lipofílicos dissolvidos ou dispersos no núcleo, bem como fármacos hidrofílicos adsorvidos em sua superfície (ANDRESEN et al. 2005; LAI et al. 2007; SUBEDI et al. 2009).

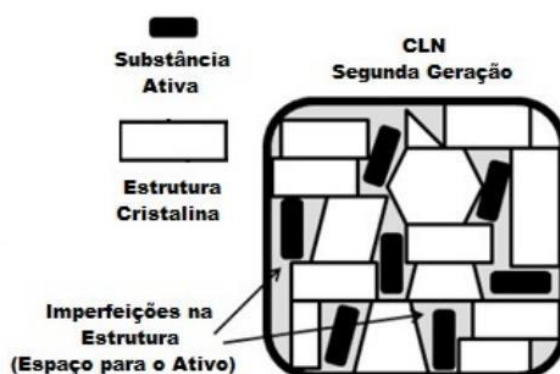
Figura 3. Representação de NLS: fármaco hidrofílico adsorvido na superfície (quadrados cinzas) e fármaco hidrofóbico encapsulado no interior lipídico (esferas pretas). Adaptado de OLIVEIRA et al. 2012.



Entretanto, as NLS apresentam baixa capacidade de encapsulação, ocorrência de transições no estado polimórfico dos lipídios utilizados na formulação (levando a problemas de estabilidade durante armazenamento à longo prazo), bem como possibilidade de expulsão do fármaco da matriz. Para contornar este problema, surgiu no final da década de 1990 uma geração de NLS que continha incorporado à sua matriz um lipídio líquido, aumentando a eficiência de encapsulação, mantendo a estabilidade física da partícula, além de diminuir a expulsão do fármaco da matriz. Essa geração foi denominada de carreador lipídico nanoestruturado (CLN) (SOUTO; LOPES, 2011; MONTENEGRO et al. 2016).

A presença do lipídeo líquido gera um grau mais acentuado de desorganização da matriz lipídica, que acaba por aumentar a estabilidade bem como a capacidade de carregamento. As principais vantagens dos NLC em relação às SLN são: (1) maior capacidade de carregamento; (2) menos água na composição, prevenindo ou minimizando a expulsão do fármaco da matriz lipídica durante armazenamento (BELOQUI et al. 2014). Os CLN podem ser obtidos pelas mesmas técnicas que os NLS (TAMJIDI et al. 2013). Por possuírem quantidades variáveis de lipídios líquidos em sua composição, formam estruturas mais densas e com mais imperfeições, o que resulta no aumento dos espaços para acomodar o fármaco, acarretando em uma maior eficiência de encapsulação (Figura 4), devido à inibição do processo de cristalização (WISSING et al. 2004).

Figura 4. Esquema representativo do processo de incorporação do ativo em carreadores lipídicos nanoestruturados. Adaptado de Guimarães e Ré, 2011.



Estudos demonstram que os CLN são alternativas eficientes na terapêutica do câncer (SELVAMUTHUKUMAR; VELMURUGAN, 2012). De acordo com o descrito por Zhang et al (2011), estes carreadores demonstraram melhora no potencial do

docetaxel, aumentando a eficácia terapêutica e minimizando os efeitos adversos do Taxotere®. Ainda, os CLN vêm ganhando atenção especial no tratamento do GBM, uma vez que este sistema demonstrou otimizar a entrega de fármacos em células de glioblastoma (ZHU et al. 2016), além de aumentar a eficácia de inibição destas células *in vitro* (LI et al. 2016). Ainda, a funcionalização da superfície destes nanocarreadores demonstrou-se muito promissora como ferramenta para o tratamento quimioterápico, uma vez que pode ser utilizada para contornar o problema de resistência a alguns fármacos, além de modular o perfil de liberação do fármaco, bem como para promover uma liberação sítio-específica, de modo a melhorar a eficácia terapêutica e diminuir a toxicidade do tratamento (RIZWANULLAH; AHMAD; AMIN, 2016). Outra vantagem de se utilizar sistemas de liberação nanoestruturados está no fato de que estes sistemas podem acumular-se passivamente em tumores devido ao efeito de permeabilidade e retenção aumentados (ELOY et al. 2014) característico de tumores sólidos como o GBM.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Obter e avaliar o potencial de carreadores lipídicos nanoestruturados funcionalizados com bevacizumabe para veiculação de docetaxel no tratamento do glioblastoma multiforme.

3.2. Objetivos específicos

- Desenvolver carreadores lipídicos nanoestruturados contendo docetaxel funcionalizados com bevacizumabe;
- Caracterizar físico-quimicamente o sistema obtido por técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET), medidas do tamanho de partícula (DLS e NTA), índice de polidispersividade (IPD), potencial zeta (PZ) e calorimetria exploratória diferencial (DSC);
- Avaliar a eficiência de encapsulação do docetaxel no sistema obtido via CLAE;
- Determinar a eficiência de funcionalização dos carreadores lipídicos nanoestruturados com bevacizumabe;

- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* por diálise seguida de filtração e análise cromatográfica via CLAE;
- Avaliar a atividade antitumoral *in vitro* das formulações desenvolvidas em células de GBM que superexpressam VEGF e em células saudáveis;
- Determinar o mecanismo de morte celular utilizando citometria de fluxo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Solventes, reagentes e matérias primas;

- 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethyleneglycol)-2000] (ammonium salt) DSPE-PEG-Maleimida (Laysan Bio, Inc)
- 2-mercapto-etanol
- acetato de uranila
- acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker®, EUA)
- água deionizada MilliQ
- anexina-APC
- bevacizumabe (Avastin®, Roche)
- brometo de (4,5-dimetil) -2,5difeniltetrazólio (MTT)
- corante azul de Coomassie
- corante azul de Tripán
- docetaxel (Apichem, China)
- DMEM
- DMSO
- estearato de polioxietileno 40
- estreptomicina
- gelo triturado
- HCl 0,1 N
- iodeto propídio
- Kit BCA protein assay (Thermo-Fisher)
- meio de cultura RPMI 1640
- óleo de rícino hidrogenado etoxilado (PEG40)

- padrão proteico Precision Plus Dual Color Protein (Bio-Rad)
- penicilina
- poliacrilamida
- polisorbato 80 (Synth)
- poloxamer 407 (Sigma-Aldrich)
- reagente de Traut (Thermo-Fisher)
- soro fetal bovino inativado 10%
- tampão Laemmli
- tampão PBS pH 7.4
- tampão PBS-EDTA pH 8.0
- tampão tris/glicina/SDS
- triglicérides de ácido cáprico/caprílico
- tripsina

4.1.2. Equipamentos

- agitador magnético (Quimis)
- balança analítica, MARTE;
- banho de ultrassom Elmasonic S, ELMA
- câmara de Neubauer
- centrífuga (Eppendorf, modelo 5804R);
- coluna de cromatografia em gel PD-10 (Sigma-Aldrich)
- coluna de cromatografia em gel Sepharose CL-4B (Sigma-Aldrich)
- coluna HPLC 250X4,6 mm; 5 µm ZORBAX Eclipse Plus C18
- DLS (Zetasizer Nano NS, Malvern Instruments, Malvern, UK) - fonte de laser HeNe 4,0 mW, 633nm;
- FACS Calibur (BD Bioscience)
- HPLC Agilent 1220 Infinity II LC com detector UV-Vis
- incubadora shaker aquecida (Nova técnica, Brasil)
- incubadora de células
- leitor de microplacas Synergy2, Biotek Instruments INC
- micropipeta de 10 e 100µL – Eppendorf;

- micropipeta de 100 e 1000µL – Eppendorf;
- microplaca de 96 orifícios (Kasvi®, Brasil);
- NanoSight NS300 (Malvern Instruments, Malvern, UK)
- peagômetro (Gehaka®, Brasil);
- sistema de Purificação de água Milipore, MiliQ Plus;
- sonificador, Ultrasonic processor, Qsonica, modelo Q700;

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados carregados com docetaxel

Os CLN foram obtidos empregando a técnica de fusão-emulsificação seguida de sonicação. Após ambas as fases, aquosa (FA; poloxamer 407 e água Milli-Q) e oleosa (FO; estearato de polioxietileno 40, triglicérides de ácido cáprico/caprílico, óleo de rícino hidrogenado etoxilado, DSPE-PEG-MAL-2000 e DTX) atingirem 75 °C, a fase aquosa foi vertida sob a fase oleosa, durante agitação magnética, até formação de uma microemulsão (ME) de aspecto leitoso e opaco. Após completa homogeneização, a mistura foi rapidamente sonicada (amplitude: 35%, pulse on: 1:00 minuto; pulse off: 0:30 segundos, durante 5 minutos) em banho de gelo, originando os CLN. Antes de prosseguir com as análises subsequentes, as alíquotas da formulação foram centrifugadas (Spectrafuge™, 16M Microcentrifuge, Labnet International, Inc., Edison, NJ, USA) a 5,000 rpm, durante 10 min, a fim de remover o titânio liberado durante o processo de sonicação. A formulação foi acondicionada em frascos de vidro com tampa plástica e armazenada em geladeira (4°C±2°C). A incorporação do docetaxel nos CLN foi feita durante a fase de pré-emulsão, na concentração de 2 mg/mL. A Tabela 1 descreve a composição para obtenção de 1 mL de formulação.

Tabela 1. Descrição quali-quantitativa das matérias primas empregadas na obtenção de 1 mL da dispersão de CLN carregados com DTX.

Matéria-prima	Massa (g)
P407	0,0350
Água Milli-Q	0,9125
E40	0,0207
CCTG	0,0205
PEG40	0,0088
PEG-MAL	0,0025
DTX	0,0084

P407: poloxamer 407; E40: estearato de polioxietileno 40; CCTG: triglicérides de ácido cáprico/caprílico; PEG40: óleo de rícino hidrogenado etoxilado; PEG-MAL: DSPE-PEG-2000-MALEIMIDA; DTX: docetaxel;

4.2.2. Funcionalização dos carreadores lipídicos nanoestruturados com bevacizumabe

Para a funcionalização dos CLN com BVZ foi empregado o protocolo descrito no trabalho de Eloy et al (2016), com modificações. Após o preparo das dispersões de CLN contendo DTX, o anticorpo BVZ, foi diluído em tampão PBS-EDTA pH 8,0 (5mM) e o pH da solução foi ajustado a 8,0 com NaOH (0,1 M). Após, 200 µL da solução de BVZ (5mg/mL) foi adicionada à solução do reagente de Traut (2 mg/mL), na proporção de 40:1 em relação ao anticorpo. Esta solução foi incubada por 1h a 37°C em banho aquecido para permitir que a reação de tiolação se complete. A separação do anticorpo tiolado do reagente de Traut livre foi realizada em cromatografia de gel filtração, empregando coluna PD-10, utilizando como eluente o mesmo tampão PBS-EDTA pH 8,0. Após determinação da concentração total de BVZ em cada fração coletada por ensaio BCA (ácido bicinconínico), as frações 4 e 5, que contém o anticorpo tiolado, foram combinadas e adicionadas à dispersão de CLN contendo DTX, previamente preparada, na proporção de 1:1. Então a mistura foi incubada *overnight* em temperatura ambiente para que a reação de acoplamento responsável pela funcionalização ocorra.

4.2.3. Caracterização físico-química dos sistemas

4.2.3.1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As amostras foram diluídas previamente em tampão PBS pH 7,4 de forma que a concentração final de lipídeos obtida é de 0,5 mg/mL. Em seguida foram colocadas na grade de cobre de 200 mesh e deixadas em repouso até adsorção, e então o excesso foi removido com papel de filtro. Subsequentemente, uma gota de solução a 1% (p/v) de acetato de uranila foi adicionado para contrastação negativa. Depois de 2 minutos o excesso foi removido e a amostra foi seca à temperatura ambiente. As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão com aceleração de 100 kV e aumento de 100.000 vezes (ELOY et al. 2016).

4.2.3.2. Diâmetro hidrodinâmico médio, IPD e potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade (IPD) e potencial zeta dos CLN funcionalizados ou não foram avaliados utilizando método de dispersão de luz dinâmica (DLS), em aparelho Zetasizer 3000 HSA (Malvern Instruments), utilizando um laser de 10 mW HeNe operado a 633 nm com um ângulo de incidência de detecção de 173°, a 25°C. A análise de dados foi realizada em modo automático. Os resultados foram apresentados como a média $\pm$ desvio padrão (DP). A carga superficial das dispersões foi determinada pela mobilidade eletroforética das partículas dispersas submetidas a um campo elétrico. As análises foram realizadas utilizando o equipamento Zetasizer 3000 HSA.

4.2.3.3. Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

O tamanho das partículas e a concentração dos CLN foram avaliados pela técnica de NTA, utilizando o equipamento NanoSight NS300 (Malvern Instruments, Reino Unido) equipado com uma câmara de amostra e um laser de 638nm. As amostras foram previamente diluídas (1:1000 v/v) em água ultrapura até um volume final de 1 mL. As concentrações ideais de medição foram encontradas pré-testando o valor ideal de partícula por quadro (20–100 partículas/quadro). As suspensões de

CLN foram injetadas na câmara de amostra com seringas estéreis até o líquido se estender até a ponta do injetor. As medidas foram realizadas em triplicata à temperatura ambiente (25 °C), e os dados estão representados na forma de tamanho médio $\pm$ desvio padrão.

4.2.3.4. Quantificação do DTX

4.2.3.4.1. Metodologia analítica

Os parâmetros analíticos utilizados para obtenção da curva analítica utilizada na quantificação do DTX foram baseados na metodologia proposta por Taymouri e colaboradores (TAYMOURI et al. 2018), com modificações. Estes parâmetros encontram-se sumarizados na Tabela 2. A curva analítica utilizada para obtenção da equação da reta empregada na quantificação do DTX foi obtida à partir de uma solução padrão de DTX em acetonitrila (400 $\mu\text{g/mL}$), com diluições de 1,56 $\mu\text{g/mL}$, 3,125 $\mu\text{g/mL}$, 6,25 $\mu\text{g/mL}$, 12,5 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ e 400 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 2. Parâmetros analíticos empregados na determinação da EE% de DTX presente nos CLN

Parâmetros analíticos	
Fase estacionária	Coluna HPLC ZORBAX Eclipse Plus C18 (250x4,6 mm; 5 μm)
Fase móvel	Acetonitrila:Água (65:35)
Fluxo	0,8 mL/min
λ de detecção	230 nm
Volume de injeção	10 μL
Temperatura do forno	45 °C
Tempo de corrida	8 min

4.2.3.4.2. Avaliação da eficiência da encapsulação do DTX

Para análise da eficiência de encapsulação (EE%), os CLN purificados (sem excesso de fármaco não encapsulado, separado por cromatografia CL-4B) ou fração total foram diluídos em acetonitrila (50 μL de amostra + 450 μL de acetonitrila). As amostras foram submetidas a banho ultrassônico durante 15 minutos, em temperatura ambiente, a fim de romper as partículas lipídicas e liberar

o fármaco encapsulado no sistema. Então, essas amostras foram analisadas por CLAE. A eficiência da encapsulação foi calculada de acordo à equação 01:

Equação 1. Cálculo da porcentagem de eficiência de encapsulação (EE%) do fármaco pelos CLN.

$$EE (\%) = \left(\frac{\text{Quantidade de fármaco na fração da Nanodispersão Purificada } (\mu\text{g})}{\text{Quantidade de fármaco na fração da Nanodispersão Total } (\mu\text{g})} \right) \times 100$$

4.2.3.5. Avaliação da eficiência de funcionalização (EF%)

Para determinar a eficiência de conjugação do BVZ aos CLN foi utilizado o ensaio BCA, de acordo com o protocolo do fabricante (Thermo Scientific). O reagente de trabalho foi preparado a partir da mistura dos reagentes A e B (50:1). Foram adicionados 25 µL de cada padrão de albumina (20 – 2000 µg/mL) para a curva padrão e 25 µL de amostra em placa de 96 poços. A placa contendo 200 µL de reagente de trabalho foi homogeneizada por 30 segundos e incubada a 37°C por 30 min, em seguida passando por resfriamento. A absorbância foi lida em 562 nm em leitor de microplacas. Para realizar o cálculo da eficiência de conjugação foi feita a relação entre a porcentagem de proteína quantificada nos CLN (purificados em coluna Sepharose CL-4B) e o total de proteína empregado inicialmente no experimento.

4.2.3.6. Avaliação da integridade da proteína por SDS-PAGE

Para avaliar a integridade do anticorpo monoclonal BVZ nos CLN funcionalizados foi realizado o procedimento descrito por Yang et al (2007) e Eloy et al (2017), com modificações, a partir da eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras (SDS-PAGE), de acordo com as orientações do fabricante (Bio-Rad). Inicialmente utilizando 2-mercapto-etanol para incubação das amostras, em seguida para que ocorra o processo de redução foi utilizado agente redutor, tampão de amostra Laemmli e incubação a 60°C por 10 minutos. As condições de eletroforese foram de 175V por 30 minutos, com o uso de cubas eletroforéticas Mini-PROTEAN e tampão de corrida contendo Tris/glicina/SDS. O padrão de proteínas usado foi o Precision Plus Dual Color Protein (Bio-Rad). Foi empregado o azul de Coomassie para coloração e água deionizada para descorar os géis.

4.2.3.7. Espectroscopia de Fluorescência

A partir do BVZ em solução, BVZ tiolado (sulfidril-bevacizumabe), formulações de CLN contendo DTX e formulações funcionalizadas com BVZ contendo DTX foram realizadas análises comparativas entre os espectros de emissão do BVZ antes e depois do processo de tioração, bem como da conjugação com os CLN. O objetivo foi identificar interações e modificações na conformação das proteínas após os protocolos experimentais. As análises foram conduzidas utilizando os comprimentos de onda de excitação em 280 nm e 295nm empregando espectrofotômetro de fluorescência Hitachi F-4500 controlado por computador (Velocidades de varredura de até 30.000 nm por minuto e comprimento de onda de 60.000 nm por min, excitação 300 nm/emissão 400 nm) do laboratório de Bioquímica e Biofísica de Proteínas, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo – USP/São Carlos. Este experimento teve por objetivo investigar a integridade da estrutura terciária da proteína após a funcionalização.

4.2.3.8. Estudo da cinética de liberação *in vitro*

Para o estudo de liberação *in vitro* foram utilizados 20 mL de tampão PBS pH 7.4 contendo 1% de polissorbato 80, a 37 °C e 150 rpm de agitação. Foram analisados CLN contendo o fármaco encapsulado, funcionalizados ou não, além de soluções de DTX, obtida a partir de etanol, tampão PBS pH 7.4 e polissorbato 80 (1:4:15)(KIM et al., 2014). As amostras foram introduzidas em sacos de diálise de peso entre 12-14kDa (DE SOUZA et al., 2015). Em seguida, durante um período de até 84 horas, amostras foram retiradas do meio receptor em tempos distintos (com reposição do meio de dissolução), filtradas e analisadas por CLAE, segundo metodologia proposta por Taymouri et al (TAYMOURI et al. 2018).

4.2.3.9. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises foram realizadas tendo como base os estudos de Prado e colaboradores (DO PRADO et al., 2020), utilizando o equipamento de DSC (TA Instruments, modelo DSC Q10), com temperatura variando de 10 a 85 °C, taxa de

aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio e fluxo de 50 cm³/min. Os resultados foram analisados no software TA Universal Analysis.

4.2.4. Estudos em cultura celular: avaliação da citotoxicidade e internalização celular

4.2.4.1. Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

Amostras de sangue provenientes de doadores saudáveis do Hemocentro da UNICAMP foram utilizadas para realizar o isolamento dos PBMCs. As amostras utilizadas nesse estudo foram obtidas após a assinatura do TCLE pelo responsável da amostra conforme aprovação nº 1.242.880 09-24-09-2015. As células mononucleares sanguíneas foram isoladas a partir de buffy coat utilizando gradiente de densidade Ficoll-Paque (17-1440-03, GE Healthcare Bioscience) como previamente descrito (AZAMBUJA et al., 2020). Este ensaio foi realizado em colaboração com o Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro da UNICAMP, coordenado pela Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad.

Para realização do protocolo, aproximadamente 60 mL de sangue, coletado em bolsa estéril com anticoagulante, foi dividido em tubos cônicos de 50 mL Ficoll-Paque na proporção de 1:2 e posteriormente centrifugado por 30 min a 400 x g em centrífuga com a função freio desativada. Após, a camada mononuclear foi coletada e lavada por centrifugação 3 vezes em PBS (pH 7,4), nas velocidades 239 x g, 179 x g e 129 x g por 10 min cada. Os PBMCs foram ressuspensos em 25 mL de meio RPMI 1640 (31800-022, Gibco) e contados na câmara de Neubauer com o uso de corante vital Azul de Tripán diluído 50 vezes para permitir a contagem. Após a contagem, as células foram semeadas em placas de 96 orifícios.

4.2.4.2. Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* em células de glioblastoma multiforme e células saudáveis

As linhagens celulares de glioma humano U87MG e A172 foram adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC) e gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Roger Frigério Castilho. As células foram mantidas em meio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; 31600-034, Gibco) contendo 0,1% de fungizona (15290-018, Gibco) e 100 U/L de penicilina e estreptomicina (15140-122, Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB; 12657-029, Gibco) pH

7,4 em incubadora de células a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. As células de glioma (U87MG ou A172) e as células saudáveis (PBMCs) foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de 2×10^3 ou 1×10^5 células por poço respectivamente. Após, as células foram tratadas com 0-100 nM de DTX livre ou em CLN, funcionalizados ou não, por 72 h. Células tratadas com volumes equivalentes de DMSO (concentração final 0,3%) foram utilizadas como controle do grupo DTX livre e células mantidas em RPMI 10% foram utilizadas como controle do grupo CLN. A viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio do brometo de (4,5-dimetil) -2,5difeniltetrazólio (MTT), que consiste na medição do número de células com mitocôndrias metabolicamente ativas com base na redução do sal de tetrazólio MTT a formazan. Após 72h de tratamento, 0,5 mg/mL de MTT foi adicionado a placa e incubado por 3 h. Subsequentemente, HCl 0,1 N foi adicionado a isopropanol anidro para solubilizar o formazan. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas a 570 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular.

4.2.4.3. Avaliação do mecanismo de morte celular por citometria de fluxo.

Células de GBM U87MG (2×10^4 células/poço em uma placa de 24 poços) foram tratadas por 72 h. Após, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e transferidas para um tubo de citometria onde foram ressuspensas em um tampão de ligação contendo 1 mg/mL de iodeto de propídio (PI) e 1 mg/mL de anexina-APC por 15 min em temperatura ambiente, protegida da luz; 10.000 eventos foram analisados no FACS Calibur (BD Bioscience).

5. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Foram feitos testes para determinar o tipo de distribuição dos dados e a homogeneidade das variâncias. Posteriormente, foram empregados testes não paramétricos (como Kruskal-Wallis) ou paramétricos (análise e variância seguida do teste de Tukey) quando necessário.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Preparação dos carreadores lipídicos nanoestruturados carregados com docetaxel

A Figura 5 é uma ilustração esquemática do processo de obtenção dos CLN contendo DTX. A Figura 6 apresenta o aspecto macroscópico da suspensão de CLN contendo DTX após o processo de obtenção.

Figura 5. Esquema ilustrado de obtenção dos CLN carregados com DTX. Fase aquosa (FA) vertida sobre fase oleosa (FO) em agitação magnética até formação de microemulsão (ME), que será então sonicada para diminuição do tamanho de partícula que dará origem aos CLN.

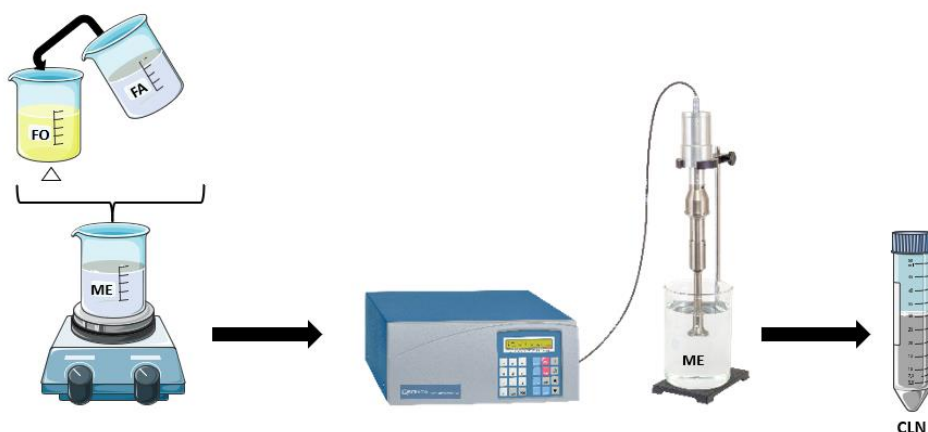


Figura 6. Aspecto macroscópico da suspensão de CLN contendo DTX após processo de obtenção.
Fonte: autor.



6.2. Funcionalização dos carreadores lipídicos nanoestruturados com bevacizumabe

A Figura 7 demonstra o processo esquemático de purificação das frações de sulfidril-bevacizumabe (Bv-SH) e a Figura 8 demonstra o aspecto macroscópico dos CLN contendo DTX após serem funcionalizados com BVZ.

Figura 7. Ilustração esquemática do processo de purificação das frações Bv-SH, após tiorilação com reagente de Traut.

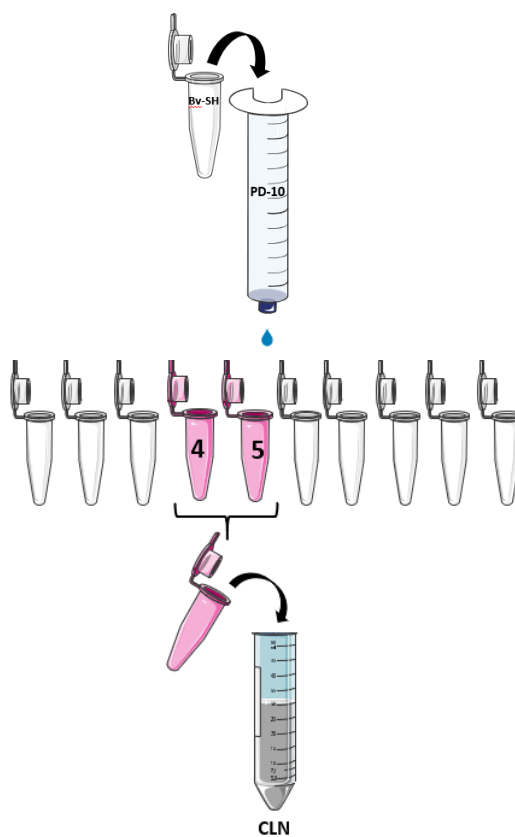


Figura 8. Aspecto macroscópico
Fonte: autor.

nalizados com BVZ.

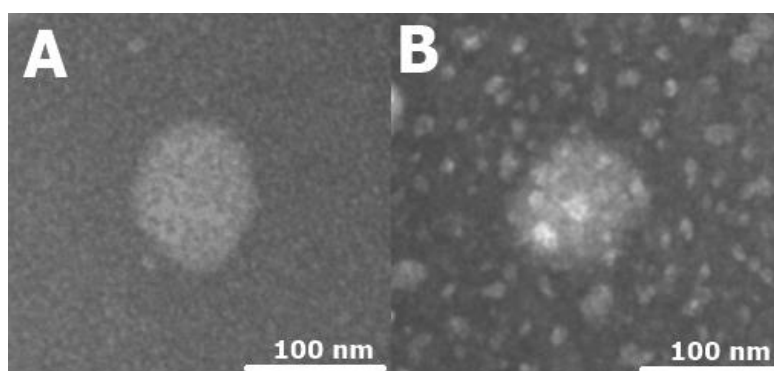


6.3. Caracterização físico-química dos sistemas

6.3.1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As fotomicrografias obtidas por MET são amplamente utilizadas para analisar a morfologia, e determinar o tamanho de sistemas lipídicos nanoestruturados (ELOY et al. 2016). Na Figura 9, estão evidenciados os CLN, com estruturas esféricas, com diâmetro na faixa de 100-150 nm. Na figura 9.A encontram-se os CLN vazios. Na figura 9.B encontram-se os CLN carregados com DTX, onde denotam-se pequenos pontos brancos em alto contraste: sugere-se que essa diferença de contraste seja atribuída à presença de cristais de DTX contidos em nanocompartimentos formados pelo óleo disperso na matriz lipídica, forma como possivelmente se estrutura o interior dos CLN (GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018). Os resultados encontrados corroboram os dados obtidos pela técnica de dispersão de luz dinâmica e com observações descritas na literatura para outras formulações de CLN – funcionalizadas ou não – contendo DTX (MATHUR et al. 2019; VARSHOSAZ; DAVOUDI; AND RASOUL-AMINI, 2018).

Figura 9. Fotomicrografias obtidas por MET, sendo: A – CLN vazios; B – CLN contendo DTX; Aumento de 100 mil vezes; Fonte: autor.



6.3.2. Diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade e potencial zeta

Foram desenvolvidas as seguintes formulações, que tiveram seu tamanho (diâmetro hidrodinâmico médio), índice de polidispersividade (IPD) e potencial zeta (PZ) médios determinados: CLN vazios (CLN), CLN vazios funcionalizados (CLN-BVZ), CLN contendo docetaxel (CLN-DTX) e CLN funcionalizados contendo

docetaxel (CLN-DTX-BVZ). Os parâmetros supracitados foram monitorados durante 90 dias, a partir do dia da obtenção das formulações, e as leituras realizadas em triplicata. Os resultados de tamanho, IPD e PZ, foram registrados. Os dados encontram-se descritos na Tabela 3, na forma de média $\pm$ desvio padrão.

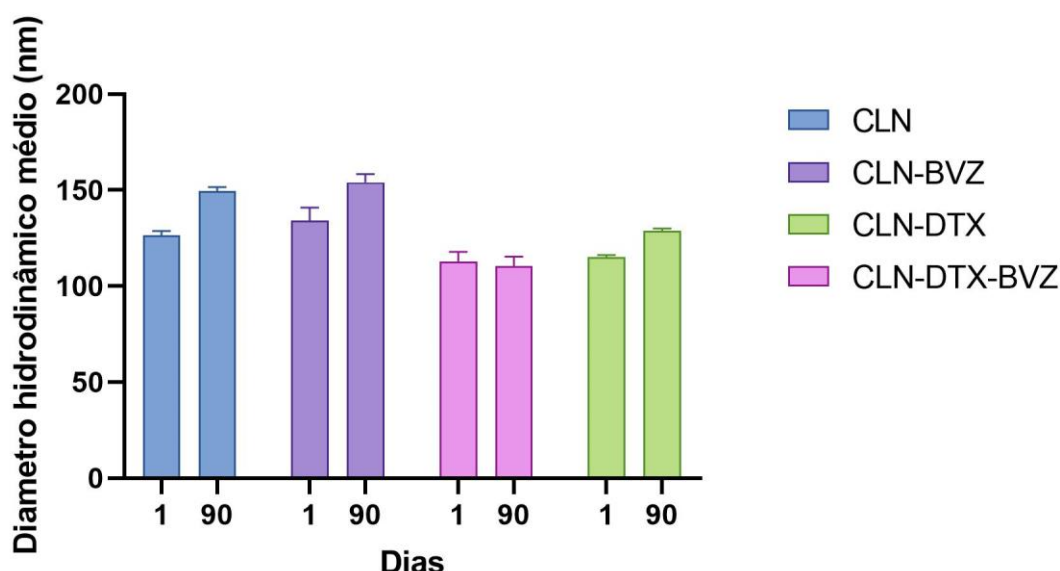
Tabela 1. Resultados médios $\pm$ desvio padrão encontrados após 90 dias para as formulações.

Amostra	Tamanho (nm)	IPD	PZ (mV)
CLN	149,40 $\pm$ 11,0	0,148 $\pm$ 0,080	-21,52 $\pm$ 1,93
CLN-BVZ	154,03 $\pm$ 2,14	0,345 $\pm$ 0,013	-17,40 $\pm$ 5,10
CLN-DTX	110,45 $\pm$ 1,15	0,302 $\pm$ 0,005	-24,83 $\pm$ 2,72
CLN-DTX-BVZ	128,95 $\pm$ 6,84	0,388 $\pm$ 0,011	-20,85 $\pm$ 3,97

Ao final do período de 90 dias, os valores de diâmetro hidrodinâmico médio obtidos variaram, considerando o desvio padrão, para os CLN, de 138,4 nm a 160,4 nm, ao passo que para os CLN-DTX, os tamanhos variaram de 109,3 nm a 111,6 nm. O IPD para os CLN variou de 0,068 a 0,228 e; para os CLN-DTX variou de 0,297 a 0,307. Considerando estas observações, é possível inferir que a formulação de CLN vazios apresentou maior variação de tamanho e menor homogeneidade. A formulação contendo DTX (CLN-DTX) apresentou uma faixa de tamanho menor e também menor variação no IPD, indicando maior homogeneidade no tamanho das partículas obtidas. Assim como a formulação contendo DTX, os CLN vazios funcionalizados (CLN-DTX-BVZ) tiveram seu tamanho modificado após a reação de funcionalização, possivelmente pelo acoplamento do BVZ em sua superfície. A partir destes achados, é possível constatar que a presença de DTX influenciou positivamente o sistema nanoparticulado obtido, modificando a organização interna da matriz lipídica destas formulações, de modo que se obteve NLC menores e com distribuição de tamanho mais homogênea quando se utiliza DTX.

Os resultados indicam que ambos os sistemas (CLN-DTX e CLN-DTX-BVZ) obtidos apresentam tamanho adequado conforme proposto inicialmente, em escala nanométrica, e boa distribuição de tamanho de partícula, conforme valores de IPD baixos – principalmente para a formulação contendo DTX –, um indicativo de que a suspensão de CLN obtida é estável e não está ocorrendo agregação das partículas (VARSHOSAZ; DAVOUDI; AND RASOUL-AMINI, 2018). A Figura 10 demonstra a variação no diâmetro hidrodinâmico médio das partículas após 90 dias de obtenção.

Figura 10. Variação no diâmetro hidrodinâmico médio das partículas após 90 dias de obtenção.



Em relação ao potencial zeta (PZ), é possível constatar que após o processo de funcionalização, os CLN-DTX-BVZ apresentaram PZ ligeiramente mais negativo, possivelmente pela presença do BVZ em sua superfície. Estes valores são condizentes com o objetivo inicialmente proposto, uma vez que o PZ é um fator chave na estabilidade de suspensões coloidais, sendo responsáveis por promover repulsão eletrônica e impedimento estérico, que previne ou retarda a agregação das partículas, aumentando a estabilidade da formulação (MEHNERT & MÄDER, 2001).

Portanto, o aumento no tamanho das partículas após o processo de funcionalização, bem como modificações no PZ, são indícios de que houveram efetivamente modificações na superfície dos CLN, corroborando o processo de funcionalização. As formulações funcionalizadas contendo ou não DTX, apresentam o maior valor de IPD em relação às outras formulações, mais um indício de que a superfície dos CLN foi modificada conjugando BVZ de forma eficiente, uma vez que a presença de proteínas recobrando a superfície das partículas favorece a agregação das partículas, consequentemente aumentando o valor de IPD e a variação no tamanho dessas partículas. (VARSHOSAZ; DAVOUDI; AND RASOUL-AMINI, 2018).

6.3.3. Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

Viegas e colaboradores caracterizaram CLN em relação ao seu tamanho utilizando duas técnicas distintas: análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) e espalhamento dinâmico de luz (DLS). Na caracterização físico-química de CLN, é

imprescindível determinar a concentração de partículas em cada amostra, a fim de compreender seu desempenho em sistemas biológicos, como ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade (VIEGAS et al., 2020). Para análise de NTA, as mesmas amostras utilizadas para caracterização no DLS foram avaliadas (Tabela 4).

Tabela 2. Resultados médios $\pm$ desvio padrão encontrados após 90 dias para as formulações funcionalizadas ou não, contendo ou não DTX.

Amostra	Tamanho (nm)	Concentração (partículas/mL)
CLN	128 $\pm$ 2.1	7,0 $\times$ 10 ¹⁰
CLN-BVZ	134 $\pm$ 1.9	7,3 $\times$ 10 ⁸
CLN-DTX	109 $\pm$ 3.4	8,2 $\times$ 10 ⁸
CLN-DTX-BVZ	129 $\pm$ 3.4	7,6 $\times$ 10 ⁸

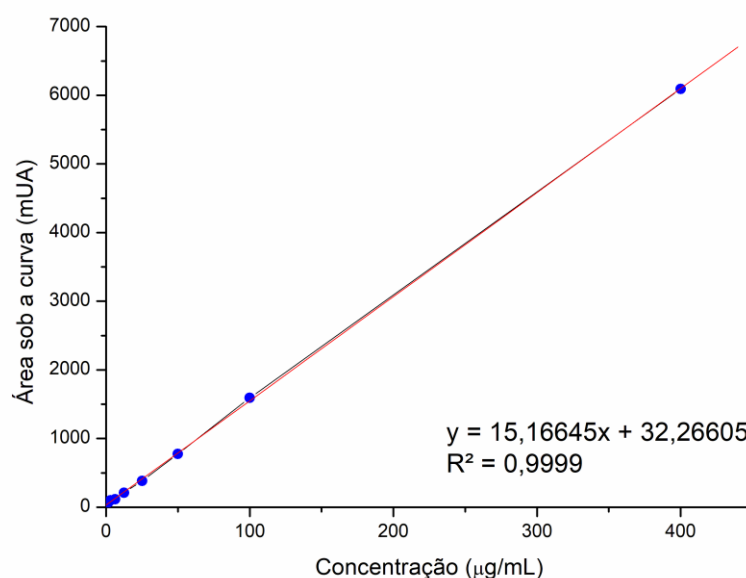
É possível observar que os resultados obtidos pelas técnicas de DLS e NTA são similares, e que essas técnicas são complementares e muitas vezes recomendadas em associação para obter uma caracterização mais robusta de sistemas nanoparticulados, pois fornecem informações diferentes, como o IPD e PZ para o DLS e a concentração de partículas por mL, no NTA. Os dados encontrados na análise de NTA evidenciam tamanhos de partícula ligeiramente diferentes em relação aos obtidos por DLS, uma vez que estas técnicas utilizam medidas diferentes para estimar o tamanho das partículas, sendo que o DLS se baseia na intensidade de sinal para estimar o diâmetro hidrodinâmico médio (que leva em conta a camada de solvatação e íons associados a cada partícula) da população, e o NTA se baseia na contagem diferencial e individual de cada nanopartícula para demonstrar a distribuição de tamanho dessas partículas. Ainda, é válido ressaltar que o DLS é a única técnica com sensibilidade suficiente para detectar populações com tamanho muito reduzido, ao passo que o NTA possui melhor resolução e pode ser utilizado de forma complementar para observar de forma mais precisa o tamanho da população de nanopartículas que se pretende estudar (FAN et al., 2015; JAMES; DRISKELL, 2013). Ainda, ao ser usada em associação ao NTA e DLS, a técnica de MET fornece mais uma estimativa de tamanho que corrobora os resultados obtidos nas duas técnicas anteriormente supracitadas, além de fornecer detalhes sobre a morfologia dos CLN. Variações no tamanho antes (CLN-DTX) e depois do processo de funcionalização (CLN-DTX-BVZ) são mais um indício de que ocorreram modificações superficiais nas formulações desenvolvidas no presente

trabalho. Portanto, utilizando essas três técnicas em combinação, é possível obter informações detalhadas sobre o tamanho e sua homogeneidade de distribuição, carga superficial, concentração de partículas por mL e morfologia. Apesar de os resultados encontrados para as diferentes técnicas variarem ligeiramente entre si, é importante ressaltar que os CLN continuam apresentando tamanho adequado para os fins propostos. Barras de erro altas podem ser atribuídas principalmente por contagens de partículas diferentes entre cada medição para a mesma amostra (RIBEIRO et al., 2018).

6.3.4. Avaliação da eficiência da encapsulação (EE%) do docetaxel

A fim de determinar a EE% do DTX nos CLN, foram analisadas três formulações: CLN contendo DTX imediatamente após o processo de obtenção; CLN contendo DTX após filtração em coluna CL-4B – a fim de remover o DTX livre e adsorvido na superfície das partículas – e; CLN contendo DTX após processo de funcionalização. As amostras foram preparadas em triplicata, conforme descrito anteriormente e para quantificação do DTX, foi utilizada a equação da reta representada na Figura 11. As respectivas amostras tiveram seu teor de DTX determinado utilizando a **Equação 01**, por CLAE segundo metodologia descrita por TAYMOURI et al. (2018) com modificações.

Figura 11. Curva analítica obtida através de solução de DTX em ACN.



Sabendo-se que a quantidade inicialmente empregada de DTX para obtenção dos CLN foi de 2100 µg/mL, foi possível calcular a quantidade de DTX presente em cada uma das formulações supracitadas após o processo de obtenção. As respectivas massas de DTX e as EE% para cada formulação estudada neste ensaio encontram-se na Tabela 5:

Tabela 3. Quantidades de DTX em µg/mL e respectivas EE% encontradas para as formulações de CLN total (analisadas imediatamente após processo de obtenção); CLN purificado (em cromatografia CL-4B) e CLN funcionalizados.

Formulação	Massa (µg/mL)	EE%
CLN-DTX total	2120,72	100,95
CLN-DTX purificado	1957,65	93,22
CLN- DTX-BVZ	1896,23	90,30

A partir dos dados expostos na Tabela 5, é possível constatar que na fração total de CLN-DTX (imediatamente após o processo de obtenção), a quantidade total inicialmente empregada de DTX foi encontrada nas análises de CLAE, indicando uma eficiência de EE% de 100%. Para assegurar que a quantificação do DTX representa de fato somente o que foi encapsulado no sistema nanoparticulado proposto, foi realizada separação do fármaco livre e adsorvido na superfície dos CLN através de cromatografia em CL-4B. Para a fração de CLN-DTX purificado – após cromatografia – encontrou-se uma massa de 1957,65 µg por mL de formulação, que representa uma EE% de 93,22%. É possível inferir, portanto, que cerca de 7% da massa inicialmente empregada de DTX não é encapsulada pelo sistema. Para a fração de CLN-DTX-BVZ, encontrou-se uma massa de 1896,23 µg por mL de formulação, indicando uma EE% de 90,30%. Considerando os dados expostos acima, é possível constatar que, de modo geral, o DTX apresentou excelente EE%, fato que pode ser explicado pela natureza lipídica da formulação e lipofílica do DTX, como demonstrado na literatura para outras formulações de CLN – funcionalizados ou não – carregados com DTX (MATHUR et al. 2019; VARSHOSA; DAVOUDI; RASOUL-AMINI, 2018).

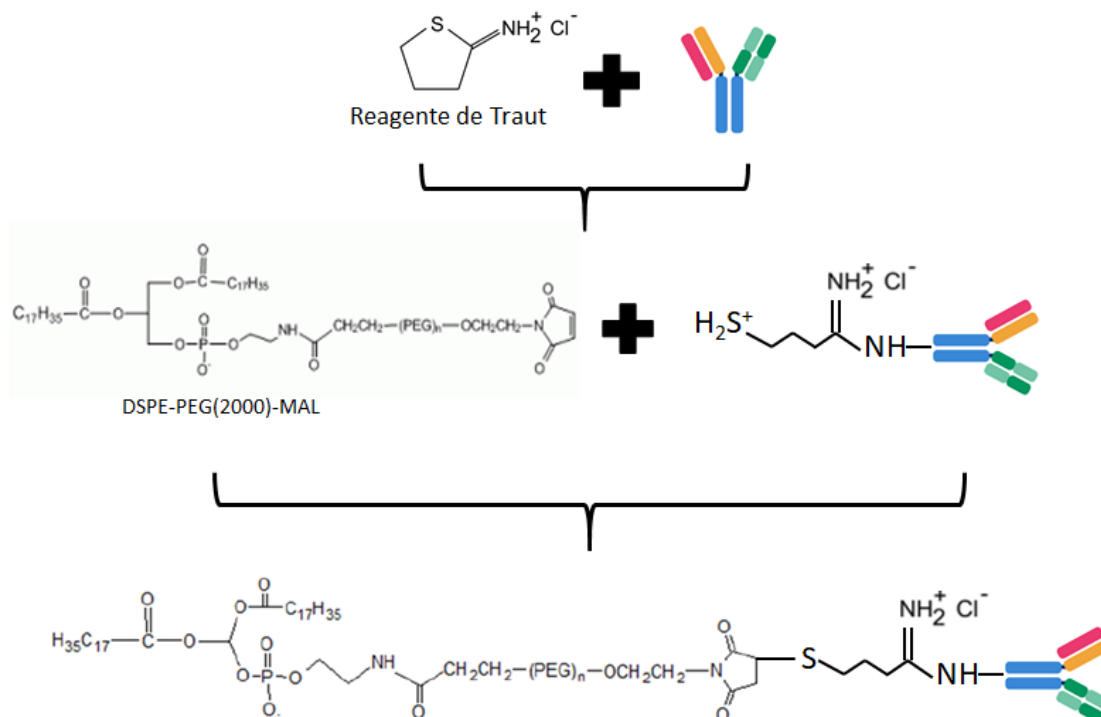
Ainda, é possível observar que o protocolo de funcionalização utilizado não interferiu de forma drástica no conteúdo de DTX presente nos CLN, uma vez que não houve diminuição pronunciada na EE% ao comparar-se a formulação de CLN purificados com a formulação de CLN funcionalizados. Essa característica é

desejável do ponto de vista técnico e corrobora a obtenção eficiente dos CLN contendo DTX funcionalizados com BVZ, conforme proposto inicialmente.

6.3.5. Avaliação da eficiência de funcionalização (EF%)

O processo de funcionalização dos CLN utilizando BVZ é possível através do emprego de uma âncora lipídica: neste caso, o DSPE-PEG(2000)-MAL, responsável pela formação da ligação tio éter entre a proteína tiolada e o grupamento maleímida, conforme ilustrado na Figura 12 (ELOY et al. 2017). O valor de EF% para BVZ avaliado pelo ensaio de BCA ($n = 3$) foi de $62,3 \% \pm 0,84$. Sabendo-se que inicialmente foram recuperados em média 425 μg de BVZ após o processo de purificação, é possível determinar que cada mL de formulação carrega cerca de 264 μg de BVZ, após o processo de funcionalização. Como o intuito da funcionalização dos CLN é promover uma entrega mais seletiva além de melhorar as propriedades terapêuticas através da associação do DTX com BVZ, esse resultado de EF% é satisfatório, uma vez que, para impedir a proliferação de células cancerígenas desencadeada por VEGF, é necessária uma concentração de 3.7 $\mu\text{g/mL}$ de BVZ (WENTINK et al. 2016).

Figura 12. Esquema reacional ilustrando a formação da ligação tioéter a partir do anticorpo (BVZ) tratado com reagente de Traut. Fonte: autor.



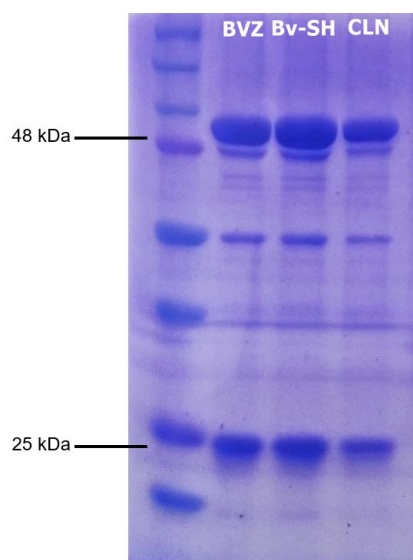
6.3.6. Avaliação da integridade da proteína por SDS-PAGE

Uma vez que o protocolo de funcionalização emprega vários reagentes como EDTA, NaOH, tampão PBS pH 7.4, além do próprio reagente de Traut, ressalta-se a importância de avaliar a integridade da estrutura primária do BVZ antes e depois da funcionalização, de modo a garantir sua atividade biológica. Como o BVZ é uma imunoglobulina humanizada recombinante, é possível avaliar a integridade de sua estrutura primária através da visualização das cadeias leve e pesada numa eletroforese em condições redutoras (SDS-PAGE).

Conforme demonstrado na Figura 13, o padrão comercial de BVZ (Avastin[®]) exibe duas bandas distintas em 48 kDa e 25 kDa, correspondendo respectivamente às cadeias pesada e leve da imunoglobulina. Ao observar o BVZ após reação de tiolação (Bv-SH), é possível constatar que não houve alteração a ponto de danificar sua estrutura primária, uma vez que os fragmentos obtidos são os mesmos achados para o padrão comercial, em 48 kDa e 25 kDa. Além disso, observa-se que não houveram modificações no perfil eletroforético dos CLN contendo DTX funcionalizados com BVZ (CLN), indicando que não houve comprometimento e

quebra da estrutura primária da proteína, confirmando a presença de BVZ nos CLN, conforme proposto inicialmente. Entretanto, é possível notar uma pequena redução na banda corresponde aos CLN, que se deve ao fato da menor concentração de anticorpo nos CLN que no padrão comercial e na solução de anticorpo tiolado.

Figura 13. Perfil eletroforético do CLN contendo DTX funcionalizados com BVZ (CLN), do anticorpo tiolado (Bv-SH) e também do padrão comercial (BVZ), Avastin®.



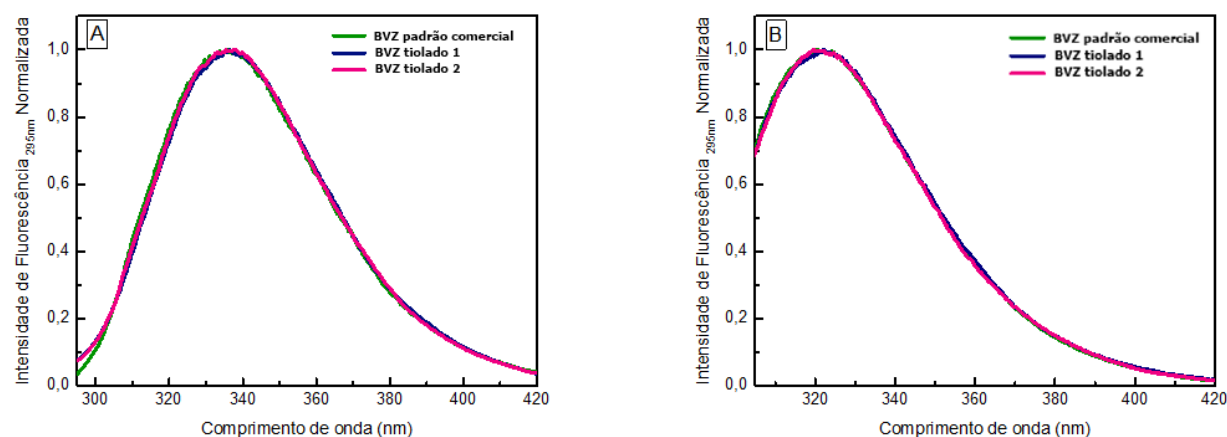
6.3.7. Espectroscopia de Fluorescência (EF)

Após determinar a concentração de BVZ tiolado (0,264 mg/mL) purificado em coluna PD-10, foi realizada EF comparando o BVZ tiolado com a solução de BVZ comercial, Avastin® (na mesma concentração) utilizada no protocolo de funcionalização anteriormente mencionado. As proteínas apresentam três tipos de fluoróforos intrínsecos: os aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina. O espectro de fluorescência de cada é único devido aos comprimentos de onda de excitação e emissão para cada aminoácido. Esse fato se atribui à propriedade física chamada rendimento quântico (Q), que é a razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos, para cada um dos três aminoácidos. O triptofano é o fluoróforo intrínseco dominante (possui maior Q), e por isso é mais utilizado em técnicas que visam investigar a estrutura terciária de proteínas. A fenilalanina possui valor de Q muito baixo, ao passo que a fluorescência da tirosina é baixa devido ao fenômeno de supressão. A detecção da tirosina e a fenilalanina pode ser afetada pelo triptofano, enquanto que a fluorescência do triptofano pode ser suprimida na presença de ácidos protonados, como por exemplo, grupamentos sulfidríla (-SH) da

cisteína, indicando que este grupamento lateral está muito próximo (LAKOWICZ, 2006). Portanto, a principal razão para avaliar a fluorescência de proteínas é obter informações sobre sua conformação, relacionando os resultados de emissão com o ambiente onde essas proteínas se encontram (MARANGONI, 2012).

Quando ocorre a excitação a 295nm, o sinal de fluorescência detectado é atribuído ao triptofano e quando ocorre excitação em 280nm, o sinal de fluorescência é composto por emissões do triptofano e tirosina. Na Figura 13, encontram-se os espectros de fluorescência do padrão comercial de bevacizumabe (Avastin®), BVZ tiolado (analisado em duplicata, bevacizumabe tiolado 1 e 2). Ao analisar a Figura 14, é possível notar que a emissão máxima dos espectros se sobrepõe, inferindo que após o processo de tiolação do BVZ, os aminoácidos aromáticos, principalmente os triptofanos, não sofreram alteração no ambiente em que estão localizados, indicando que o protocolo de funcionalização não alterou a estrutura terciária do BVZ.

Figura 14. Espectro de fluorescência normalizado do bevacizumabee em solução e bevacizumabee tiolado com excitação a 280nm (A) e 295nm (B).

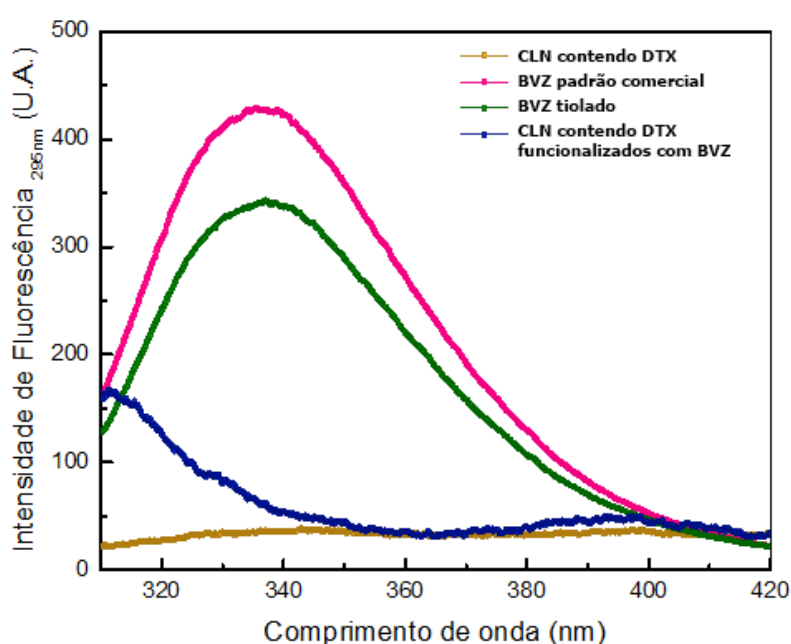


Análises comparativas entre os espectros de emissão do BVZ em solução, BVZ tiolado e BVZ conjugado aos CLN contendo DTX foram realizadas (Figura 14), com o objetivo de identificar interações e modificações conformacionais relevantes no BVZ após a formação da ligação tioéter durante o protocolo de funcionalização. As excitações foram realizadas no comprimento de onda de 295 nm. Ao analisar a Figura 15, é possível notar uma diminuição significativa na intensidade do BVZ conjugado aos CLN quando comparada com o BVZ em solução (comercial e

tiolado). Apesar disso, a intensidade da fluorescência nos CLN funcionalizados é superior à intensidade nos CLN sem funcionalização, um indício que sugere que houve de fato a interação bevacizumabe-CLN.

Ainda na Figura 15, nota-se que a correspondente aos CLN contendo DTX funcionalizados com BVZ possui um espectro não característico de excitação de triptofano em 295 nm: isso pode se dever à turbidez da amostra, de forma que a luz fluorescente não passa pela solução e, por conseguinte, os fluoróforos não são excitados.

Figura 15. Espectro de fluorescência dos CLN contendo DTX, do BVZ em solução, do BVZ tiolado e dos CLN contendo DTX funcionalizados com BVZ, com excitação a 295nm.



6.3.8. Determinação do perfil de liberação *in vitro* do DTX

De maneira geral, sistemas lipídicos coloidais são reconhecidos por apresentarem uma cinética de liberação mais gradual e sustentada ao longo do tempo, em comparação com formas farmacêuticas convencionais atualmente disponíveis no mercado, como soluções e suspensões. Uma série de fatores pode influenciar o perfil de liberação de fármacos veiculados a partir desses nanosistemas, como temperatura, natureza do meio receptor, quantidade de fármaco encapsulado, estrutura interna da partícula – com diferentes graus de cristalinidade – além do tamanho, carga e morfologia das partículas em questão. Em

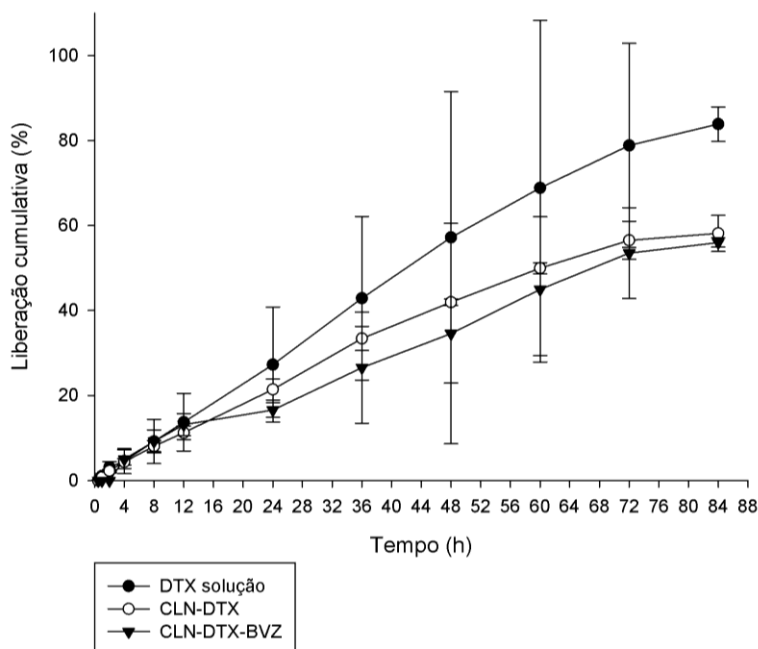
se tratando de CLN, o fator eleito, num importante estudo de revisão crítica na área, como mais impactante no perfil de liberação obtido, é a composição dos CLN (GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018) no que tange a quantidade e o tipo de lipídeo utilizado.

Assim sendo, a determinação do perfil de liberação *in vitro* do DTX encapsulado nos CLN – funcionalizados ou não - possibilitou uma estimativa da quantidade de fármaco liberada em função do tempo e o mecanismo envolvido nesse processo. Para assegurar a reprodutibilidade e eficácia destes ensaios, utilizou-se como amostra controle uma solução de DTX, de forma a assegurar que a o saco de diálise utilizado realmente permita livremente a passagem de moléculas de DTX para o meio externo, quando em tampão PBS pH 7.4 + 1% de polissorbato 80.

A Figura 16 apresenta os perfis de liberação do DTX em solução, DTX contido em CLN convencionais e DTX contido em CLN funcionalizados com BVZ. Durante as primeiras 12 horas de experimento, as três formulações testadas apresentaram perfil de liberação semelhante, sem diferenças expressivas. A partir de 12h de experimento, é possível observar para o DTX em solução, uma taxa de liberação mais rápida, de modo que há uma redução considerável das taxas de liberação ao comparar-se com os CLN-DTX e CLN-DTX-BVZ. O perfil de liberação encontrado para os CLN-DTX é mais sustentado, ocorrendo inicialmente uma lenta liberação, em torno de 11,24% em 12h de experimento (contra 13,70% para DTX solução), de modo que a quantidade máxima liberada é atingida apenas no final do experimento (84h), com 58,16% do DTX liberado a partir dos CLN convencionais, contra 83,86% liberados para o DTX em solução, ao final do experimento. Para os CLN-DTX-BVZ, inicialmente ocorre uma liberação inicial mais rápida (13,16% em 12h, contra 11,24% para CLN-DTX), seguida por uma liberação mais sustentada, de modo que são liberados ao final do experimento em torno de 56% contra 58% para CLN-DTX. Isso pode ser possivelmente atribuído, de acordo com relatos prévios encontrados na literatura, a uma natureza hidrofílica mais pronunciada promovida pela presença do BVZ quimicamente ligado à superfície dos CLN, o que facilita a liberação inicial do DTX contido próximo à superfície das partículas, de modo que a taxa de liberação mais lenta observada a seguir pode ser atribuída ao tempo necessário para o meio receptor conseguir atravessar a camada proteica superficial, para penetrar e molhar os CLN, de modo que o fármaco contido no interior dessa matriz

lipídica possa se difundir, sendo liberado para o meio receptor (VARSHOSAZ; DAVOUDI; RASOUL-AMINI, 2018).

Figura 16. Perfis de liberação para DTX em solução, CLN-DTX e CLN-DTX-BVZ, em meio receptor, a 37 graus celsius, a 150 RPM. Os resultados encontram-se expressos na forma de média (n = 6), acompanhados de barras de desvio padrão.



Os mecanismos envolvidos na cinética de liberação para CLN-DTX e CLN-DTX-BVZ foram determinados indiretamente através de 5 modelos matemáticos diferentes. Os dados encontram-se descritos na Tabela 6 e o modelo que mais se ajusta foi eleito com base no valor de R^2 que mais se aproxima da linearidade ($R^2 = 1$). Conforme demonstrado pela Tabela 6, para CLN-DTX, o mecanismo mais provável envolvido na liberação do fármaco contido nas partículas lipídicas é de primeira ordem, no qual a liberação do fármaco é dependente de sua concentração. Ainda, é possível observar que a modificação superficial dos CLN utilizando BVZ modificou o perfil de liberação, de modo que o modelo que mais se ajustou nesse caso foi Korsmeyer-Peppas, no qual o coeficiente de difusão (n) indica uma cinética não-Fickiana, de modo que a liberação é dependente tanto da capacidade do meio receptor de erodir a matriz contendo lipídeos e polímeros, bem como da capacidade do fármaco se difundir neste meio (BAISHYA, 2017).

Tabela 4. Perfis de liberação de CLN-DTX e CLN-DTX-BVZ ajustado aos modelos matemáticos mais comumente utilizados para descrever o mecanismo de liberação.

Modelo	CLN-DTX			CLN-DTX-BVZ		
	k	R ²	N	K	R ²	n
Ordem zero	0,7502	0,9816		0,6952	0,9883	
Primeira ordem	0,0111	0,9971		0,0096	0,9881	
Higuchi	18,850	0,5013		5,3420	0,9070	
Hixson-Crowel	0,1607	0,1591		0,0029	0,9905	
Korsmeyer-Peppas	1,76260	0,9915	0,8049	1,2003	0,9913	0,8758

Estes resultados corroboram os resultados previamente encontrados na literatura, no que tange CLN contendo DTX ou ainda sistemas lipídicos nanoestruturados – funcionalizados ou não - e com os achados nos ensaios de liberação, uma vez que a funcionalização dos CLN utilizando BVZ permitiu a formação de um sistema mais rígido e capaz de impor maior resistência à difusão do meio receptor para o seu interior e, conseqüentemente, a liberação do fármaco (ELOY et al., 2017; LIU et al., 2011; MATHUR et al., 2019; VARSHOSAZ; DAVOUDI; RASOUL-AMINI, 2018).

6.3.9. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Os termogramas obtidos através das análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) fornecem informações quantitativas e qualitativas, por meio da distinção e análise de processos endotérmicos e exotérmicos, em relação ao comportamento térmico das amostras. Desta forma, obtém-se variações de entalpia que, por meio destas, pode-se avaliar a organização estrutural de CLN (DE SOUZA et al., 2012). Os resultados obtidos nas análises de DSC no que tange a temperatura do evento endotérmico e a variação de entalpia (ΔH) das amostras encontram-se na tabela 7:

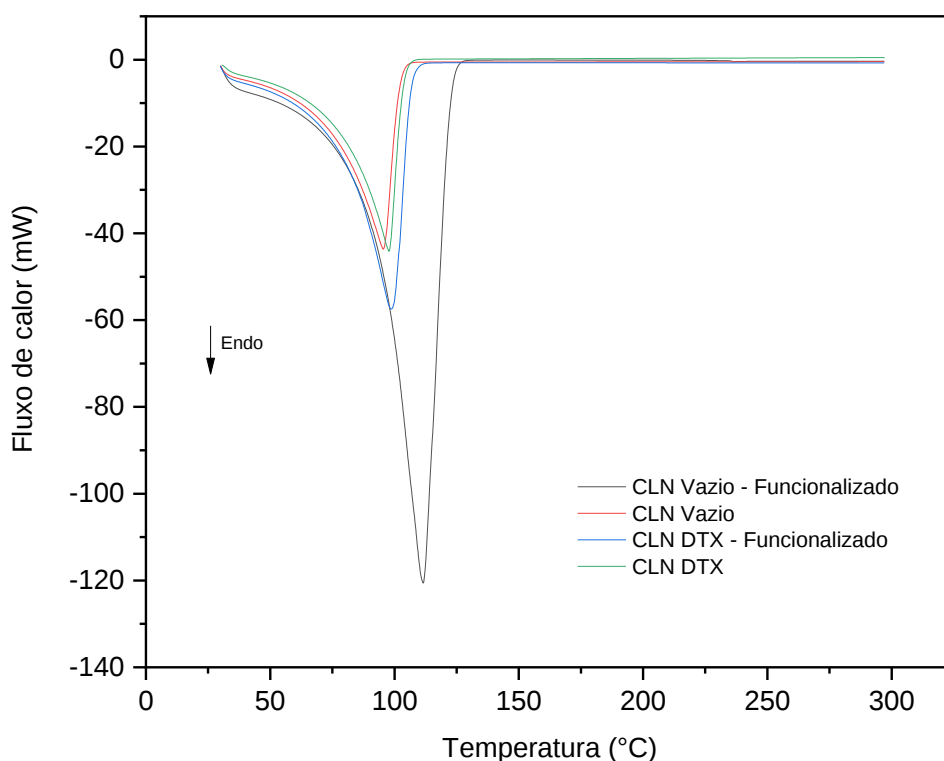
Tabela 5. Relação de amostra e seus respectivos pontos de fusão e variações de entalpia (ΔH)

Amostra	PF (°C)	ΔH (J/g)
MF	52.43	63.71
MF com DTX	53.76	73.71
CLN	95.52	1521
CLN-BVZ	111.54	2108
CLN-DTX	97.82	1602
CLN-DTX-BVZ	98.65	1924

MF = mistura física

Como pode ser observado pela Figura 17 e Tabela 07, todas as amostras analisadas apresentaram apenas um evento endotérmico com ausência do evento-assinatura respectivo ao ponto de fusão de DTX (232°C) nas amostras MF DTX, CLN-DTX e CLN-DTX-BVZ. A ausência deste evento térmico e a presença de um pico único indicam que o fármaco está molecularmente disperso e em estado amorfo na matriz lipídica, sugerindo também a sua solubilidade neste meio (CHEN et al., 2006). Adicionalmente, a presença de um único evento térmico denota a ausência de eventos polimórficos sugerindo grau amorfo dos CLN, o que é desejado para este sistema, uma vez que um dos objetivos é justamente evitar estes eventos que levam à sua instabilidade, como anteriormente mencionado (BOTTOM, 1999; CHEN; REMONDETTO; SUBIRADE, 2006).

Figura 17. Termogramas obtidos nas análises de DSC, referentes as amostras de CLN contendo ou não DTX, funcionalizados ou não.



A comparação das amostras com e sem DTX demonstra que o fármaco promoveu aumento do ponto de fusão bem como da variação de entalpia, indicando a formação de uma estrutura diferenciada e mais termo-resistente em comparação com o sistema sem DTX. A presença de um fármaco pode alterar o perfil de eventos cristalinos promovendo até mesmo a mudança do subtipo de CLN formado. No estudo de Araújo e colaboradores, os autores observaram evento similar, onde a

presença de curcumina promoveu alteração dos eventos cristalinos dos CLN, o que foi variável de acordo com o tipo de matriz lipídica (ARAUJO et al., 2020).

A formação de estruturas mais termo resistentes também foi observada com a funcionalização do sistema, de modo que a variação térmica decorre das ligações covalentes formadas entre os CLN e o BVZ, mais um indício de que a funcionalização de fato ocorreu (KHOR et al., 2013). Adicionalmente, os resultados obtidos pelas técnicas de DSC corroboram aqueles observados no ensaio de liberação, uma vez que os CLN funcionalizados – isto é, o sistema com maior cristalinidade - apresentaram menores taxas de liberação.

6.4. Avaliação da citotoxicidade em células de glioblastoma multiforme e células saudáveis.

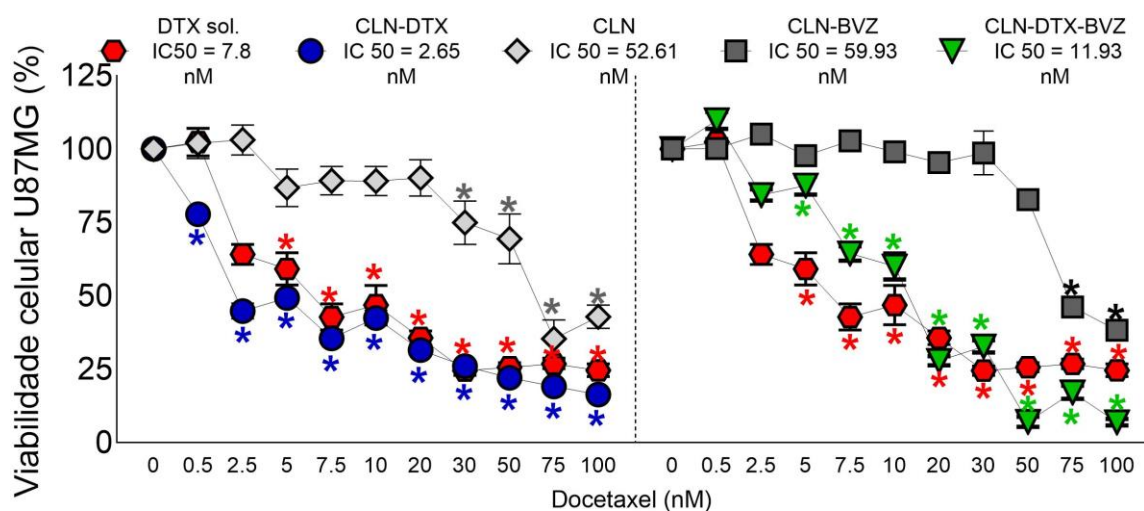
Estudos demonstram que algumas linhagens específicas de GBM superexpressam determinados receptores do tipo enzimáticos, relacionados com uma progressão tumoral acelerada e agressiva, bem como metástase tumoral, responsáveis por prognósticos ruins da doença. As linhagens celulares U87MG e A172 são exemplos de células que superexpressam diversos tipos de receptores envolvidos no desenvolvimento agressivo do GBM, como os receptores de fator de crescimento endotelial vascular (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) (ATZORI et al., 2017; CANTARELLA et al., 2006; VALTER; WIESTLER; PIETSCH, 1999). Diversas evidências em estudos recentes demonstram as vantagens de funcionalizar sistemas nanoestruturados com objetivo de entregar fármacos de modo mais eficiente – burlando barreiras fisiológicas como a barreira hemato-encefálica – ou ainda de forma seletiva, como no caso de sistemas nanoestruturados cujo alvo são elementos superexpressos em células cancerígenas, como o GBM (CHU et al., 2018; FERREIRA et al., 2020; JU et al., 2018; PATEL; WAIRKAR; YERGERI, 2020; RAZPOTNIK et al., 2017).

O principal objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da funcionalização de CLN utilizando BVZ na atividade anti-tumoral do DTX, um dos fármacos que compõe as opções terapêuticas do GBM atualmente, resultando possivelmente numa citotoxicidade aumentada e mais seletiva às células de GBM que superexpressam o fator de crescimento endotelial vascular (U87 e A172). Para

fins de comparação, foram utilizadas células mononucleares do sangue periférico (PBMcs, do inglês *peripheral blood mononuclear cell*), células saudáveis com expressão basal de fator de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*, *VEGF*).

As figuras 18, 19 e 20 apresentam os dados de viabilidade celular das linhagens U87MG, A172 e as PBMcs, respectivamente, após 72 horas de tratamento com a formulação comercial de DTX (DTX em solução etanólica acrescido de polissorbato 80) (HART; ACOTT, 2010), CLN vazios, CLN-BVZ, CLN-DTX e CLN-DTX-BVZ.

Figura 18. Viabilidade celular (%) da linhagem U87MG após 72 horas de tratamento com as formulações: DTX solução (DTX. sol), CLN, CLN-BVZ, CLN-DTX e CLN-DTX-BVZ.

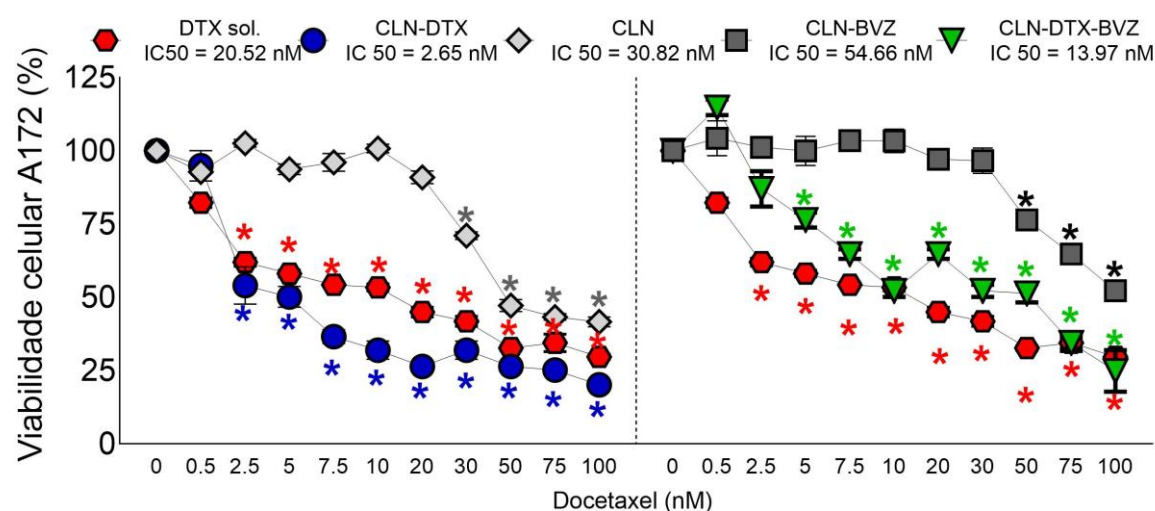


Para concentrações menores, como 0.5, 2.5 e 5 nM, os CLN-DTX foram capazes de promover diferenças estatisticamente significantes na viabilidade das células, promovendo uma redução na viabilidade celular em comparação ao DTX em solução. Entretanto, em concentrações mais altas, apesar de promover maior redução na viabilidade celular, não houveram diferenças estatísticas entre a viabilidade celular observado para o DTX livre em solução ou CLN-DTX. Apesar de ter havido um ligeiro aumento no IC_{50} para a formulação CLN-DTX-BVZ ($IC_{50} = 11.93$), é possível constatar que as maiores concentrações desta formulação (50, 75 e 100 nM) foram capazes de promover variações estatisticamente significativas na viabilidade celular, demonstrando maior atividade anti-tumoral comparado com DTX em solução nas mesmas concentrações, um indício de que a funcionalização de sistemas nanoestruturados com um anticorpo anti-VEGF, como o BVZ, é capaz de

potencializar a atividade anti-tumoral de fármacos disponíveis atualmente para o tratamento do GBM. As formulações CLN e CLN-BVZ não foram capazes de diminuir a viabilidade celular em extensão apreciável, mesmo nas maiores concentrações utilizadas neste estudo, conforme esperado.

Conforme evidenciado pela Figura 19, assim como para a linhagem U87MG, a encapsulação do DTX em NLC foi capaz de promover uma diminuição no IC_{50} do DTX, potencializando sua atividade citotóxica na linhagem A172. Em concentrações menores (7.5, 10, 20, e 30 nM), bem como para as concentrações maiores (75 e 100 nM), a encapsulação do DTX em CLN foi capaz de potencializar sua atividade antitumoral, como demonstrado pela diminuição estatisticamente significativa na viabilidade celular promovida pela formulação CLN-DTX. Um fato importante que deve ser destacado é que a linhagem A172 se demonstrou menos sensível ao DTX, como demonstrado por um aumento geral nos valores de IC_{50} em relação a linhagem U87MG. A formulação funcionalizada contendo DTX (CLN-DTX-BVZ) não foi capaz de promover diminuição significativa na viabilidade celular comparada com DTX em solução. Conforme esperado, as formulações CLN e CLN-BVZ não foram capazes de promover redução significativa na viabilidade celular também para a linhagem A172.

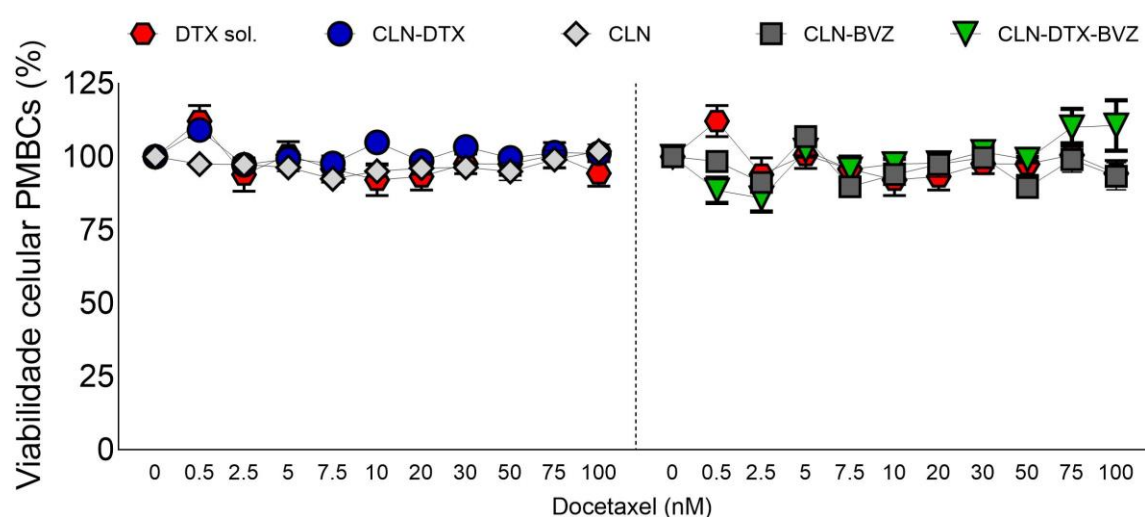
Figura 19. Viabilidade celular (%) da linhagem A172 após 72 horas de tratamento com as formulações: DTX solução (DTX. sol), CLN, CLN-BVZ, CLN-DTX e CLN-DTX-BVZ.



Para entender como a funcionalização dos CLN utilizando BVZ pode influenciar na atividade antitumoral do DTX, foram utilizadas células saudáveis, não-

cancerígenas, que expressam VEGF em níveis basais, como as PMBCs. Conforme demonstrado pela Figura 20, o docetaxel é capaz de promover um pequeno decaimento da viabilidade celular das PMBCs, principalmente nas maiores concentrações, ao passo que tanto CLN-DTX e CLN-DTX-BVZ não são capazes de promover uma redução na viabilidade celular mesmo nas concentrações mais altas (75 e 100 nM). As formulações CLN e CLN-BVZ também demonstraram boa tolerabilidade e não promoveram diminuição significativa da viabilidade celular.

Figura 20. Viabilidade celular (%) dos PMBCs após 72 horas de tratamento com as formulações: DTX solução (DTX. sol), CLN, CLN-BVZ, CLN-DTX e CLN-DTX-BVZ.



Uma vez que a formulação desenvolvida neste trabalho é pretendida para administração intravenosa, esse dado de citotoxicidade em células saudáveis é um indício de que a formulação possui atividade citotóxica seletiva às células tumorais de GBM e não às células sanguíneas saudáveis. Um possível mecanismo responsável pelo aumento da atividade antitumoral da formulação contendo DTX funcionalizada com BVZ (CLN-DTX-BVZ) é a maior expressão de VEGF pela linhagem U87MG (ATZORI et al., 2017; CANTARELLA et al., 2006; VALTER; WIESTLER; PIETSCH, 1999), promovendo um maior acúmulo de DTX no microambiente tumoral, em comparação com células que expressam menos VEGF ou em níveis basais, como a linhagem A172 e as PMBCs. Devido a sua maior expressão de VEGF, a linhagem U87MG se demonstrou mais sensível à formulação funcionalizada, que apresentou maior efeito citotóxico para esta linhagem, conforme evidenciado pela Figura 18. Desta forma, esse dado de citotoxicidade em células

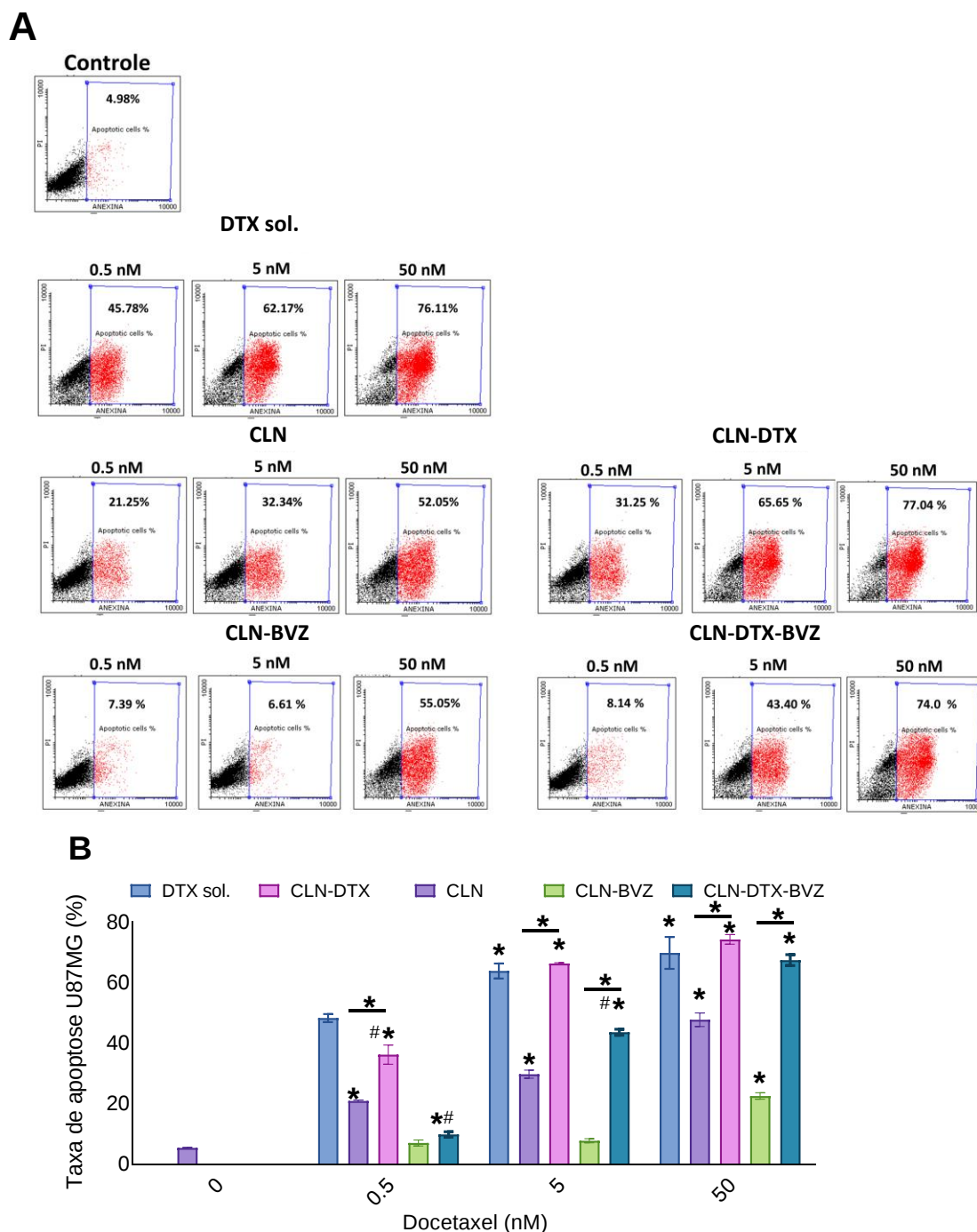
saudáveis é um indício de que a formulação possui atividade citotóxica seletiva às células tumorais de GBM e não às células sanguíneas saudáveis.

6.5. Avaliação do mecanismo de morte celular por citometria de fluxo

Durante o processo apoptótico, a célula sofre uma série de modificações em suas propriedades morfológicas, bioquímicas e moleculares. A anexina é uma proteína celular muito empregada em técnicas de citometria de fluxo, por ser capaz de identificar células em estágios iniciais de apoptose de células necróticas (ZHAO et al., 2018), devido à sua capacidade de se ligar à fosfatidilserina, um fosfolípido intracelular que é exportado para a camada externa da membrana celular durante o processo apoptótico. Por isso, o uso de anexina conjugada a corantes como a alofococianina (*allophycocyanin*, APC) em ensaios de citometria de fluxo é considerado um método molecular sensível, preciso e rápido para a detecção de apoptose (WLODKOWIC; SKOMMER; DARZYNKIEWICZ, 2009).

Conforme demonstrado pela Figura 21, células de GBM U87MG tratadas com as formulações contendo DTX na concentração mais alta (50 nM) apresentaram índices de apoptose acima de 70%, como confirmado pelas análises de citometria de fluxo (Figura 21A). Após o processo de encapsulação, o DTX contido nos CLN foi capaz de manter sua atividade antitumoral, uma vez que o docetaxel livre não apresentou variações significativas em relação à formulação CLN-DTX. É possível destacar ainda que o processo de funcionalização não interferiu negativamente na atividade biológica do DTX. Para a mesma concentração, as formulações CLN e CLN-BVZ promoveram em torno de 50% de apoptose, demonstrando que o DTX tem um papel importante na indução da apoptose, já que seu mecanismo de ação está relacionado com a inibição da divisão celular. As células tratadas com DMEM (controle) não apresentaram taxa de apoptose apreciável.

Figura 21. (A) Efeito dos CLN contendo ou não DTX, funcionalizados ou não, em células U87MG tratadas por 72 horas, nas concentrações de 0.5, 5 e 50 nM, que foram posteriormente analisadas por citometria de fluxo; (B) Taxa de apoptose das células U87MG após o experimento. As células controles foram tratadas com DMEM.



Na última década, o DTX vem se destacando como um fármaco muito eficiente no combate de uma variedade de cânceres, sendo aprovado para uso por agências regulatórias como ANVISA e FDA. Apesar de o DTX apresentar notável atividade antitumoral *in vitro*, suas propriedades biofarmacêuticas *in vivo* limitam sua aplicação clínica no tratamento de pacientes com GBM, devido à baixa

biodisponibilidade, biodistribuição não-seletiva e toxicidade sistêmica. Ainda, como outros taxanos, o DTX apresenta incapacidade de atravessar a barreira hematoencefálica em extensão apreciável para atingir concentrações terapêuticas no cérebro, tornando-o ineficaz no tratamento do GBM (JAMES; TANG; WEI, 2019). Conforme apontado por estudos de fase clínica utilizando DTX em pacientes com GBM primário ou recorrente, o DTX não foi capaz de promover remissão parcial ou total do GBM, independente da dose testada, com sobrevida média de 7 semanas, além de pacientes que apresentaram efeitos adversos relevantes como neutropenia. Uma porcentagem dos pacientes ainda apresentou reações de hipersensibilidade de média intensidade. Esses estudos sugerem que o docetaxel intravenoso não possui eficácia clínica no tratamento do GBM (FORSYTH et al., 1996; SANSON et al., 2000).

Tendo em vista este cenário, várias abordagens vêm sendo propostas para melhorar o potencial biológico e ressignificar o uso dos quimioterápicos atualmente disponíveis (ENGELS et al., 2005). Vários esforços da comunidade científica vêm sendo recentemente voltados para o desenvolvimento de plataformas alternativas capazes de contornar os efeitos adversos e potencializar a atividade antitumoral do DTX no tratamento do GBM. Nesse contexto, os sistemas nanoestruturados se destacam por apresentarem vantagens relacionadas a melhor solubilidade do DTX, melhorando sua biodisponibilidade e proporcionando formulações com maior estabilidade, perfil de liberação prolongado, maior bioacumulação em tumores sólidos devido ao efeito de permeabilidade e retenção aumentados, além da possibilidade da modificação de sua superfície para obter novas propriedades tecnológicas, como a possibilidade de uma entrega mais seletiva do DTX às células cancerígenas e não às células saudáveis, no caso de nanosistemas funcionalizados (ZHANG; ZHANG, 2013). Portanto, o sucesso em manter a atividade antitumoral do DTX após o processo de encapsulação em CLN funcionalizados com BVZ representa um avanço na fronteira do conhecimento no que tange a obtenção de medicamentos mais eficazes e seguros para o tratamento do GBM, possibilitando aproveitar o potencial biológico do DTX aliado aos benefícios de veicular este fármaco a partir de uma nanopartícula.

7. CONCLUSÕES

- Foi possível obter de forma eficiente, a partir das matérias primas propostas, CLN contendo DTX;
- Através do protocolo de funcionalização sugerido, foi possível criar uma ligação tioéter entre o BVZ e os CLN, funcionalizando o sistema nanoparticulado como proposto inicialmente;
- De acordo com as técnicas de caracterização físico-químicas, os CLN-DTX-BVZ apresentaram tamanho, PZ e IPD condizentes com o esperado, indicando que o sistema obtido é estável, apresentando tamanhos de partícula uniforme, confirmado por análises de DLS e NTA, bem como estabilidade térmica, confirmada por análises de DSC.
- O sistema nanoparticulado funcionalizado apresentou EE% excelente, de modo que a maior parte do DTX empregado inicialmente na obtenção do sistema foi de fato encapsulado; ainda, o protocolo de funcionalização não interferiu negativamente na EE% do DTX.
- Os CLN contendo DTX apresentaram boa EF%, sugerindo que o protocolo de funcionalização utilizado é adequado para o sistema de liberação em questão;
- As técnicas de eletroforese em condições redutoras (SDS-PAGE) e EF demonstraram que o processo de funcionalização não altera as estruturas primária e terciária, respectivamente, do BVZ, um indício de que sua atividade biológica foi preservada.
- Ambos CLN-DTX e CLN-DTX-BVZ apresentaram perfil de liberação sustentada e menores taxas de liberação quando comparados ao DTX em solução, conforme esperado. A funcionalização dos CLN utilizando BVZ modificou o perfil de liberação do DTX, que foi liberado em menores taxas ao longo do tempo;
- Estudos *in vitro* utilizando células de GBM que superexpressam VEGF em maior ou menor grau (U87MG e A172 respectivamente) demonstraram potencial antitumoral para as formulações funcionalizadas ou não. A formulação CLN-DTX-BVZ demonstrou maior atividade antitumoral em células que superexpressam VEGF (U87MG). As formulações desenvolvidas não foram capazes de reduzir a viabilidade de células saudáveis em extensão apreciável, mostrando seletividade para células tumorais.

- Análises de citometria de fluxo demonstram que após o processo de encapsulação e funcionalização, o DTX teve sua atividade antitumoral preservada, sendo capaz de promover apoptose em células U87MG.

Assim sendo, foi possível obter um sistema lipídico nanoparticulado do tipo CLN contendo DTX, com características físico-químicas desejáveis e estabilidade térmica. Foi possível encapsular o DTX de forma eficiente e também funcionalizar o sistema nanoparticulado utilizando BVZ em extensão apreciável. O protocolo de funcionalização utilizado não comprometeu a estrutura primária nem terciária do BVZ, conforme confirmado por ensaios de SDS-PAGE e EF. Ainda, os CLN funcionalizados apresentaram perfil de liberação gradual e sustentada ao longo do tempo, em comparação com DTX em solução. Ensaios *in vitro* confirmam que as formulações desenvolvidas apresentam atividade antitumoral promissora em células de GBM, além de maior citotoxicidade da formulação CLN-DTX-BVZ em células que superexpressam VEGF, promovendo morte celular por apoptose. As formulações desenvolvidas não foram capazes de reduzir a viabilidade de células saudáveis. Estes resultados são promissores e representam um avanço na obtenção de medicamentos baseados em nanocarreadores funcionalizados, a fim de melhorar o potencial biológico do DTX, aumentando sua citotoxicidade em células cancerígenas que superexpressam VEGF, preservando células saudáveis.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNIHOTRI, S. et al. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 61, n. 1, p. 25-41, 7 fev. 2013.

ARAUJO, V. H. S. et al. The influence of NLC composition on curcumin loading under a physicochemical perspective and in vitro evaluation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 602, p. 125070, 5 out. 2020.

ATZORI, M. G. et al. The anti-vascular endothelial growth factor receptor-1 monoclonal antibody D16F7 inhibits invasiveness of human glioblastoma and glioblastoma stem cells. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 36, n. 1, p. 106, 8 out. 2017.

AZAMBUJA, J. H. et al. Molecular profiles and immunomodulatory activities of glioblastoma-derived exosomes. **Neuro-Oncology Advances**, v. 2, n. 1, p. 1–11, 2020.

BAISHYA, H. Application of Mathematical Models in Drug Release Kinetics of Carbidopa and Levodopa ER Tablets. **Journal of Developing Drugs**, v. 6, n. 2, 1000171, 2017. doi:<http://dx.doi.org/10.4172/2329-6631.1000171>.

BAKER, J. et al. Docetaxel-related side effects and their management. **European Journal of Oncology Nursing**, v. 12, n. 3, p. 253–268, jul. 2008.

BATASH, R. et al. Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 27, p. 3002-3009, 19 maio 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/0929867324666170516123206>.

BELOQUI, A. et al. Dextran-protamine coated nanostructured lipid carriers as mucus-penetrating nanoparticles for lipophilic drugs. **International journal of pharmaceutics**, v. 468, n. 1–2, p. 105–11, 1 jul. 2014.

BOTTOM, R. The role of modulated temperature differential scanning calorimetry in the characterisation of a drug molecule exhibiting polymorphic and glass forming tendencies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 192, n. 1, p. 47-53, 1999. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173\(99\)00271-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173(99)00271-9).1999.

Brain Tumor Types & Symptoms - National Brain Tumor Society. Disponível em: <<https://braintumor.org/brain-tumor-information/understanding-brain-tumors/tumor-types/>>. Acesso em: 26 fev. 2020.

BUCKNER, J. C. et al. Central nervous system tumors. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 82, n. 10, p. 1271-1286, 2007. <https://doi.org/10.4065/82.10.1271>.

CANTARELLA, G. et al. TRAIL inhibits angiogenesis stimulated by VEGF expression in human glioblastoma cells. **British Journal of Cancer**, v. 94, n. 10, p. 1428–1435, 22 maio 2006.

CHEN, H. et al. Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting. **Control. Release**, v. 110, n. 2, p. 296–306, 2006.

CHEN, L.; REMONDETTO, G. E.; SUBIRADE, M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 5, p. 272–283, 2006.

CHU, L. et al. Nose-to-brain delivery of temozolomide-loaded plga nanoparticles functionalized with anti-epha3 for glioblastoma targeting. **Drug Delivery**, v. 25, n. 1,

p. 1634–1641, 1 jan. 2018.

DE SOUZA, A. L. R. et al. Loading of praziquantel in the crystal lattice of solid lipid nanoparticles: Studies by DSC and SAXS. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 108, n. 1, p. 353–360, 2012.

DO PRADO, A. H. et al. Synthesis and Characterization of Nanostructured Lipid Nanocarriers for Enhanced Sun Protection Factor of Octyl p-methoxycinnamate. **AAPS PharmSciTech**, v. 21, n. 4, p. 125, 29 abr. 2020.

ELOY, J. O. et al. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 345–363, 1 nov. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25280609>>. Acesso em: 29 fev. 2020.

ELOY, J. O. et al. Immunoliposomes: A review on functionalization strategies and targets for drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 159, p. 454–467, 1 nov. 2017. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.07.085.

ENGELS, F. K. et al. Potential for improvement of docetaxel-based chemotherapy: A pharmacological review. **British Journal of Cancer**, v. 93, n. 2, p. 173–177, 25 jul. 2005. Disponível em: <www.taxotere.com>. Acesso em: 15 fev. 2021.

FAN, Y. et al. Cationic liposome-hyaluronic acid hybrid nanoparticles for intranasal vaccination with subunit antigens. **Journal of Controlled Release**, v. 208, p. 121–129, 28 jun. 2015.

FERREIRA, N. N. et al. Modulating chitosan-PLGA nanoparticle properties to design a co-delivery platform for glioblastoma therapy intended for nose-to-brain route. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 10, n. 6, p. 1729–1747, 1 dez. 2020.

FORSYTH, P. et al. Phase II trial of docetaxel in patients with recurrent malignant glioma: A study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. **Investigational New Drugs**, v. 14, n. 2, p. 203–206, 1996.

GORDILLO-GALEANO, A.; MORA-HUERTAS, C. E. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 133, p. 285–308, 1 dez. 2018.

HANIF, F. et al. Glioblastoma multiforme: A review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 18, n. 1, p. 3–9, 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.1.3>.

HART, M.; ACOTT, S. Physical and chemical stability of Taxotere® (docetaxel) one-vial (20 mg/ml) infusion solution following refrigerated storage. **Ecancermedicalscience**, v. 4, n. 1, 202, 15 dez. 2010.

JAMES, A. E.; DRISKELL, J. D. Monitoring gold nanoparticle conjugation and analysis of biomolecular binding with nanoparticle tracking analysis (NTA) and dynamic light scattering (DLS). **Analyst**, v. 138, n. 4, p. 1212–1218, 21 fev. 2013.

JAMES, J.; TANG, K.; WEI, T. Abstract 3078: Tesetaxel, a novel, oral taxane, crosses intact blood-brain barrier (BBB) at therapeutically relevant concentrations. In: **Cancer Research. Proceedings: AACR Annual Meeting 2019**; March 29–April 3, 2019; Atlanta, GA. American Association for Cancer Research (AACR), 1 jul. 2019. Disponível em:

<https://cancerres.aacrjournals.org/content/79/13_Supplement/3078>. Acesso em: 15 fev. 2021.

JU, R.-J. et al. Development of functional docetaxel nanomicelles for treatment of brain glioma. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 46, n. sup1, p. 1180–1190, 31 out. 2018.

KHOR, S. P. et al. Thermo-reversible healing in a crosslinked polymer network containing covalent and thermo-reversible bonds. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 128, n. 6, p. 3743–3750, 2013. <https://doi.org/10.1002/app.38578>.

KIM, D.-D. et al. Surface-modified solid lipid nanoparticles for oral delivery of docetaxel: enhanced intestinal absorption and lymphatic uptake. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 495, 13 jan. 2014.

LI, A. J. et al. Efficient delivery of docetaxel for the treatment of brain tumors by cyclic RGD-tagged polymeric micelles. **Molecular Medicine Reports**, v. 11, n. 4, p. 3078–3086, 1 abr. 2015.

LIU, D. et al. Nanostructured lipid carriers as novel carrier for parenteral delivery of docetaxel. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p. 262–269, 1 jul. 2011.

MATHUR, P. et al. Fabrication, optimization, and in vitro evaluation of docetaxel-loaded nanostructured lipid carriers for improved anticancer activity. **Journal of Liposome Research**, v. 30, n. 2, p. 182–196, 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/08982104.2019.1614055>.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 2–3, p. 165–196, 25 abr. 2001.

NASERI, N.; VALIZADEH, H.; ZAKERI-MILANI, P. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Structure preparation and application. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v.5, n. 3, p. 305–313, 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.15171/apb.2015.043>.

NATIONAL CANCER INSTITUTE; PDQ ADULT TREATMENT EDITORIAL BOARD. Adult Central Nervous System Tumors Treatment (PDQ®): Health Professional Version. **PDQ Cancer Information Summaries**, p. 1–51, 2020.

OHGAKI, H. Epidemiology of brain tumors. **Methods in Molecular Biology**, v. 472, p. 323–342. 2009. doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-492-0_14.

PATCHELL, R. A. The management of brain metastases. **Cancer Treatment Reviews**, v. 29, n. 6, p. 533–540, 2003.

PATEL, D.; WAIRKAR, S.; YERGERI, M. C. Current Developments in Targeted Drug Delivery Systems for Glioma. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 32, p. 3973–3984, 24 abr. 2020.

PHILIPS, A. et al. Brain tumours: Rise in glioblastoma multiforme incidence in England 1995–2015 Suggests an Adverse Environmental or Lifestyle Factor. **Journal of Environmental and Public Health**, v. 2018, Article ID 7910754, 2018.

RAZPOTNIK, R. et al. Targeting malignant brain tumors with antibodies. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 1181. 25 set. 2017. Disponível em: <pmc/articles/PMC5622144/?report=abstract>. Acesso em: 18 nov. 2020.

RIBEIRO, L. N. D. M. et al. Use of nanoparticle concentration as a tool to understand the structural properties of colloids. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 1 dez. 2018.

ROCK, K. et al. A clinical review of treatment outcomes in glioblastoma multiforme—the validation in a non-trial population of the results of a randomised Phase III clinical trial: has a more radical approach improved survival? **The British Journal of Radiology**, v. 85, n. 1017, e729–e733, 2012. Disponível em: <<https://www.birpublications.org/doi/full/10.1259/bjr/83796755>>. Acesso em: 28 fev. 2020.

SANSON, M. et al. Second line chemotherapy with docetaxel in patients with recurrent malignant glioma: A phase II study. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 50, n. 3, p. 245–249, 2000.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Signs and Symptoms of Adult Brain and Spinal Cord Tumors**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/brain-spinal-cord-tumors-adults/detection-diagnosis-staging/signs-and-symptoms.html>>. Acesso em: 26 fev. 2020.

SMIRNIOTOPOULOS, J. G. et al. From the archives of the AFIP: Patterns of contrast enhancement in the brain and meninges. **Radiographics**, v. 27, n. 2, p. 525–551, 1 mar. 2007. <https://dx.doi.org/10.1148/rg.272065155>.

VALTER, M. M.; WIESTLER, O. D.; PIETSCH, T. Differential control of VEGF synthesis and secretion in human glioma cells by IL-1 and EGF. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 17, n. 5–6, p. 565–577, 1 ago. 1999.

VARSHOSAZ, J.; DAVOUDI, M. A.; RASOUL-AMINI, S. Docetaxel-loaded nanostructured lipid carriers functionalized with trastuzumab (Herceptin) for HER2-positive breast cancer cells. **Journal of Liposome Research**, v. 28, n. 4, p. 285–295, 2 out. 2018.

VIEGAS, J. S. R. et al. Nanostructured lipid carrier co-delivering tacrolimus and TNF- α siRNA as an innovative approach to psoriasis. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 10, n. 3, p. 646–660, 1 jun. 2020.

VON HOFF, D. D. The taxoids: Same roots, different drugs. **Seminars in Oncology**, v. 24, n. 4, Suppl 13, S13-3-S13-10, 1997.

WENTINK, M. Q. et al. A functional bioassay to determine the activity of anti-VEGF antibody therapy in blood of patients with cancer. **British Journal of Cancer**, v. 115, n. 8, p. 940–948, 11 out. 2016.

WLODKOWIC, D.; SKOMMER, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. Flow cytometry-based apoptosis detection. **Methods in molecular biology**, (Clifton, N.J.), v. 559, p. 19–32, 2009. doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-017-5_2.

ZHANG, L.; ZHANG, N. How nanotechnology can enhance docetaxel therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 2927–2941, 2013. Disponível em: <[/pubmed/articles/PMC3742154/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/242154/)>. Acesso em: 15 fev. 2021.

ZHAO, M. X. et al. The Apoptosis Effect on Liver Cancer Cells of Gold Nanoparticles Modified with Lithocholic Acid. **Nanoscale Research Letters**, v. 13, n. 1, p. 304, 29 dez. 2018.