



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS ENCAPSULADOS COM
CITOTÓXICOS DE ELEVADA POTÊNCIA PARA IMUNOTERAPIA

INÊS CASAIS E COSTA RICO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António José de Freitas Duarte
Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São Braz
Doutor Frederico Nuno Castanheira Aires da Silva

ORIENTADOR

Doutor Frederico Nuno
Castanheira Aires da Silva

CO-ORIENTADORA

Doutora Solange Judite Roque
Coelho Alves Gil

2019

LISBOA



Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) (BBB_BIO_0508_2014; IF_010100, SFRH/BD/90514/2012, SFRH/BD/131468/2017 e por UID/CVT/00276/2013).



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS ENCAPSULADOS COM
CITOTÓXICOS DE ELEVADA POTÊNCIA PARA IMUNOTERAPIA

INÊS CASAIS E COSTA RICO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António José de Freitas Duarte
Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São Braz
Doutor Frederico Nuno Castanheira Aires da Silva

ORIENTADOR

Doutor Frederico Nuno
Castanheira Aires da Silva

CO-ORIENTADORA

Doutora Solange Judite Roque
Coelho Alves Gil

2019

LISBOA

AGRADECIMENTOS

Ao Doutor Frederico, meu orientador, por me ter dado oportunidade de experienciar durante 3 meses a vida de investigador. Obrigada por todo o apoio, pela sua paciência, ensinamentos transmitidos e disponibilidade prestada ao longo da elaboração do trabalho laboratorial e da dissertação de mestrado.

À Professora Doutora Solange Gil, que tive oportunidade de conhecer melhor ao me ter aceitado como sua co-orientanda, pela sua disponibilidade, dedicação, simpatia e por todos os ensinamentos por si transmitidos ao longo do estágio curricular que me influenciaram de forma positiva.

À Dra. Joana Dias, minha tutora e instrutora imparável, e à Doutora Sandra Aguiar pela companhia durante o estágio laboratorial, por todos os ensinamentos transmitidos, pela confiança depositada em mim e ainda por toda a disponibilidade prestada para a elaboração desta dissertação de mestrado.

Aos restantes membros da equipa de investigação envolvida nestes projetos: Ana e Diana pela amabilidade, carinho e boa disposição com que me receberam e por todo o vosso apoio ao longo do estágio laboratorial.

Ao professor Telmo Nunes e à minha amiga Inês Mendes, pela preciosa ajuda na elaboração da análise estatística.

Aos meus amigos, que me acompanharam neste percurso académico: Alegria, Inês, Joana, Maria, Mariana, Pedro Anastácio e Sara, por todos os momentos partilhados convosco. Juntos crescemos e superámos todas as dificuldades ao longo destes 6 anos. Muito obrigada pela vossa amizade!

Ao HEV e toda a equipa, por tudo o que aprendi convosco, pela amizade e bom ambiente.

À FCT que financiou este projeto no qual tive a oportunidade de participar.

À minha família: mãe, pai, irmã e também aos meus avós. Por toda a paciência, apoio e carinho ao longo destes anos, por tudo o que aprendi convosco e que fez de mim o que sou hoje e por acreditarem em mim.

Por último, mas não menos importante: ao Pedro, por me ter acompanhado durante este percurso académico e pela ajuda na elaboração dos pormenores estéticos desta dissertação de mestrado. Muito obrigada por todo o apoio, amor e carinho nos bons e nos maus momentos porque ao teu lado tudo se torna mais fácil.

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS ENCAPSULADOS COM CITOTÓXICOS DE ELEVADA POTÊNCIA PARA IMUNOTERAPIA

RESUMO

O cancro é uma doença comum à Medicina Veterinária e Humana e é uma das principais causas de morte. Apesar das várias abordagens terapêuticas oncológicas existentes, a sua cura permanece como um desafio. No caso da quimioterapia, alguns dos motivos de insucesso prendem-se com: a toxicidade, a baixa eficácia e o desenvolvimento de resistências aos fármacos, apelando à investigação de novas abordagens terapêuticas que os superem. Os lipossomas, no âmbito da nanomedicina, têm sido investigados como transportadores de fármacos permitindo uma modulação da sua farmacocinética, do direcionamento para tecidos neoplásicos e redução dos efeitos secundários, apresentando, neste contexto, enorme potencial para a terapia oncológica. Deste modo, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento e otimização de lipossomas para encapsulação de um fármaco citotóxico de elevada potência para imunoterapia. Para tal, foram avaliados os efeitos citotóxicos de sete iHDAC – CI-994, panobinostat, SAHA, SBHA, scriptaid, *trichostatin A* e tubacina – tendo sido selecionado o panobinostat, com maior efeito citotóxico, para posterior encapsulação em lipossomas. Os efeitos citotóxicos do panobinostat lipossomal foram avaliados em linhas celulares de linfoma canino – CLBL-1 e 17-71 – e de glioblastoma humano – U87 – e comparados com os efeitos da doxorubicina lipossomal. Foram ainda avaliados lipossomas associados a folatos como forma de direcionamento específico.

Foram realizados três ensaios independentes para cada fármaco e em replicado para cada concentração. A viabilidade das células tratadas foi avaliada através do reagente *AlamarBlue®* e os valores de IC_{50} calculados através de uma equação logarítmica no programa *GraphPad Prism 6*. Para análise estatística foi realizada uma ANOVA e teste de *Tukey*, através do programa R. Os resultados demonstraram atividade citotóxica dos iHDAC em CLBL-1 e 17-71, sendo capazes de induzir a acetilação de H3. Observou-se um maior efeito de citotoxicidade do panobinostat ($IC_{50}=20nM$) que o da doxorubicina ($IC_{50}=1050nM$) com um valor de $p<0,001$. Os efeitos do panobinostat encapsulado ($IC_{50}=15nM$) revelaram-se ser semelhantes ao do fármaco livre com um valor de $p>0,05$. Em U87, o panobinostat revelou ter também maior efeito citotóxico que a doxorubicina.

Os resultados obtidos sugerem que o panobinostat tem um grande efeito citotóxico em glioblastoma humano e linfoma canino. *In vitro*, o seu efeito citotóxico quando encapsulado em lipossomas sugeriu ser semelhante à formulação livre. Serão necessários estudos clínicos e translacionais para determinar a utilidade clínica e segurança do panobinostat lipossomal. No futuro, poderão ser acoplados anticorpos aos lipossomas para desenvolver um sistema de transporte de fármacos com grande potencial para Oncologia.

Palavras-chave: lipossoma, iHDAC, panobinostat, nanomedicina, oncologia

DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF LIPOSOMES ENCAPSULATED WITH HIGH POWER CYTOTOXICS FOR IMMUNOTHERAPY

ABSTRACT

Cancer is a disease that occurs in both Veterinary and Human Medicine, and is one of the leading causes of death. Despite all the existing oncological therapeutic approaches, treatment remains challenging. Some reasons for chemotherapy failure rely on: drug toxicity, low therapeutic efficacy and chemotherapeutic resistance, appealing to the search of new therapeutic approaches to overcome them. In the field of nanomedicine, liposomes have been investigated as nanocarriers of cytotoxic drugs allowing modulation of their pharmacokinetics, target to neoplastic tissues and reduction of side effects. In this context, this drug delivery system has great potential to be applied in oncological therapy.

Therefore, the aim of this study is the development and optimization of liposomes encapsulated with high power cytotoxics for immunotherapy. For this purpose, the cytotoxic effects of seven HDACi were evaluated – CI-994, panobinostat, SAHA, SBHA, scriptaid, *trichostatin A* and tubacin. Panobinostat, having shown the greatest cytotoxic effect, was selected to be further encapsulated in liposomes. Its cytotoxic effects were assessed in two canine lymphoma cell-lines – CLBL-1 and 17-71 – and a human glioblastoma cell-line – U87 – and compared to liposomal doxorubicin effect. The cytotoxic activity of liposomal panobinostat targeted to folate receptors was also assessed.

Three independent experiments were carried out in different days to each drug and two replicate wells were used for each drug concentration. Viability of treated cells was measured using the alamarBlue® reagent. Best-fit IC_{50} values were calculated using the log (inhibitor) vs response (variable slope) function on GraphPad Prism 6. The data was statically analyzed using ANOVA and Tukey test in R version 3.5.0. (2018). Results demonstrated the cytotoxic effects of HDACi in CLBL-1 and 17-71, inducing H3 acetylation. Panobinostat ($IC_{50}=20nM$) demonstrated greater cytotoxic effect comparing to doxorubicin ($IC_{50}=1050nM$) with $p<0,001$. Liposomal panobinostat ($IC_{50}=15nM$) has demonstrated similar cytotoxic effects to the free drug's effects $p>0,05$. In U87 cell-line, panobinostat also showed greater cytotoxic effect than doxorubicin.

The obtained results suggest panobinostat as a potent cytotoxic drug in human glioblastoma and canine lymphoma. *In vitro*, liposomal panobinostat cytotoxic effect revealed to be similar to the free drug's effect. Translational and clinical studies will determine the clinical utility and safety of liposomal panobinostat. In the future, we hope to couple these novel nanoparticles to antibodies for the development of a potent drug delivery system to oncology.

Keywords: liposome, HDACi, panobinostat, nanomedicine, oncology

ÍNDICE

CAPÍTULO I – DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DE ESTÁGIO	1
CAPÍTULO II – INTRODUÇÃO TEÓRICA	4
1. Introdução – O cancro em Medicina Veterinária	4
2. Abordagens terapêuticas convencionais	4
2.1. Cirurgia	4
2.1.1. Desvantagens	5
2.2. Radioterapia	5
2.2.1. Desvantagens	7
2.3. Quimioterapia	7
2.3.1. Desvantagens da quimioterapia	9
2.3.1.1. Efeitos adversos	9
2.3.1.2. Mecanismos de resistência	10
3. Outras abordagens terapêuticas.....	11
3.1. Nanomedicina.....	12
3.1.1. Nanopartículas - Lipossomas	12
3.1.2. Direcionamento ativo	14
3.1.2.1. Exemplos de direcionamento ativo	14
3.2. Aplicações dos lipossomas – Oncologia Humana e Veterinária.....	15
3.3. Moléculas com atividade citotóxica em tumores – iHDAC	17
3.3.1. Panobinostat	18
3.3.2. CI-994	19
3.3.3. Ácido hidroxâmico suberoilnilida (SAHA)/vorinostat.....	19
3.3.4. Ácido bis-hidroxâmico suberoil (SBHA)	20
3.3.5. Scriptaid	20
3.3.6. <i>Trichostatin A</i>	20
3.3.7. Tubacina	21
4. Oncologia comparada	21
4.1. O Cão como modelo animal.....	22
4.1.1. Linfoma Canino	23
4.1.1.1. Tratamento	24
4.1.2. Gliomas	25
4.1.2.1. Tratamento	25
CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS ENCAPSULADOS COM CITOTÓXICOS DE ELEVADA POTÊNCIA PARA IMUNOTERAPIA	27
OBJETIVOS	27
DESENHO EXPERIMENTAL	28
MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
1. Linhas celulares.....	29
2. Fármacos.....	29
2.1. Fármacos citotóxicos	29
2.2. Encapsulação dos fármacos citotóxicos em lipossomas	29
3. Ensaio de citotoxicidade	30
3.1. Avaliação da citotoxicidade em células em suspensão	30
3.1.1. Painel de iHDAC.....	30
3.1.2. Avaliação da citotoxicidade do iHDAC selecionado e da doxorubicina – forma livre e encapsulados em lipossomas	32
3.2. Ensaio de citotoxicidade em células aderentes – otimização do protocolo experimental.....	33

4. Avaliação da indução de acetilação da Histona 3 pelos iHDAC.....	33
4.1. Preparação das amostras	33
4.2. Extração de proteína	33
4.3. Quantificação de proteína	34
4.4. SDS-PAGE	34
4.5. <i>Western blot</i>	34
5. Análise estatística	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
1. Avaliação do efeito citotóxico dos iHDAC na linha celular 17-71	36
1.1. Avaliação da indução de acetilação da Histona 3 pelos iHDAC	38
2. Desenvolvimento de lipossomas – encapsulação de fármacos	39
3. Avaliação da atividade citotóxica dos fármacos encapsulados em lipossomas.....	40
3.1. Linfoma Canino – linha celular CLBL-1	40
3.1.1. Avaliação da citotoxicidade do panobinostat encapsulado em lipossomas com folatos	44
3.1.2. Avaliação da citotoxicidade em função do tempo de exposição – diferentes formulações de panobinostat.....	47
3.2. Glioblastoma humano – linha celular U87	50
3.2.1. Otimização do protocolo experimental – número de células semeadas por poço	51
3.2.2. Otimização do protocolo experimental – tempos de exposição	52
CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS	55
BIBLIOGRAFIA.....	57
ANEXO I – <i>Abstract</i> do painel exposto no Congresso CIISA 2018 - “ <i>Exploring the boundaries of animal, veterinary and biomedical sciences</i> ”, em Lisboa	76
ANEXO II – Gráficos e tabelas relativos à análise estatística para o ensaio citotoxicidade de panobinostat e doxorrubicina em forma livre e encapsulados em lipossomas - em CLBL-1 .	77
ANEXO III – Gráficos e tabelas relativos à análise estatística para o ensaio citotoxicidade de panobinostat e respetivas formulações de lipossomas com e sem folatos em CLBL-1.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos de resistência das células neoplásicas aos quimioterápicos.....	10
Figura 2 – Lipossoma como transportador de fármacos citotóxicos.	13
Figura 3 – O Cão como modelo de estudo em oncologia.....	23
Figura 4 – Esquema representativo do desenho experimental	27
Figura 5 – Representação esquemática dos procedimentos dos ensaios citotóxicos realizados em células de suspensão.	30
Figura 6 – Representação gráfica: efeito citotóxico de CI-994, SAHA e SBHA.....	36
Figura 7 – Representação gráfica: efeito citotóxico de scriptaid, <i>trichostatin A</i> e panobinostat.	36
Figura 8 – Acetilação da histona H3 induzida pelos iHDAC, <i>western blot</i>	38
Figura 9 – Representação gráfica do efeito citotóxico de panobinostat e doxorrubicina, na linha CLBL-1	40
Figura 10 – Diagrama caixa-de-bigodes para representação da distribuição dos valores IC ₅₀ relativos aos diferentes fármacos	41
Figura 11 – Representação gráfica do efeito citotóxico de panobinostat para estudo do direcionamento aos recetores de folatos.	44
Figura 12 – Imagem representativa do ensaio de citotoxicidade na linha celular de linfoma canino CLBL-1.	45
Figura 13 – Diagrama caixa-de-bigodes para representação da distribuição dos valores de IC ₅₀ relativos aos ensaios de citotoxicidade na linha CLBL-1.....	45
Figura 14 – Ensaio de citotoxicidade de panobinostat encapsulado em lipossomas para um tempo de exposição de 3h, na linha CLBL-1.	48
Figura 15 – Ensaio de citotoxicidade de panobinostat encapsulado em lipossomas para um tempo de exposição de 6 horas, na linha CLBL-1.	49
Figura 16 – Ensaio de citotoxicidade com panobinostat e doxorrubicina na forma livre, na linha U87	50
Figura 17 – Otimização do número de células semeadas por poço, para o ensaio de citotoxicidade com panobinostat na forma livre.	51
Figura 18 – Ensaio de otimização para 5x10 ³ células/poço a um tempo de exposição de 24h, na linha celular U87	52
Figura 19 – Ensaio de otimização com 5x10 ³ células por poço a um tempo de exposição de 72 horas, na linha celular U87	53
Figura 20 – Ensaio de otimização com 6x10 ⁴ células por poço a um tempo de exposição de 72 horas, na linha celular U87	53
Figura 21 – Aplicação de um sistema de <i>drug delivery</i> transversal a Medicina Humana e Medicina Veterinária.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Neoplasias mais comumente indicadas para Radioterapia.....	6
Tabela 2 – Fármacos quimioterápicos aplicados em Oncologia Veterinária e Humana.....	8
Tabela 3 – Formulações lipossomais aprovadas pela FDA.....	16
Tabela 4 – Formulações lipossomais aprovadas pela EMA	17
Tabela 5 – Composição lipídica dos lipossomas.	30
Tabela 6 – Valores dos IC ₅₀ (em nM) obtidos nas duas linhas celulares de linfoma canino (17-71 e CLBL-1).	37
Tabela 7 – Características físico-químicas dos lipossomas desenvolvidos.....	39
Tabela 8 – Valores dos IC ₅₀ (em nM) obtidos para cada formulação testada na linha CLBL-1.	41
Tabela 9 – Análise da variância do IC ₅₀ dos fármacos avaliados no ensaio de citotoxicidade – doxorrubicina livre, doxorrubicina encapsulada em lipossomas, panobinostat livre e panobinostat encapsulado em lipossomas.....	42
Tabela 10 – Teste de <i>Tukey</i> para identificação das médias que diferem entre si	42
Tabela 11 – Valores dos IC ₅₀ (em nM) obtidos para cada formulação testada em CLBL-1...	44
Tabela 12 – Análise da variância do efeito citotóxico do panobinostat e dos lipossomas de panobinostat, com e sem folatos, avaliados na linha CLBL-1.....	46
Tabela 13 – Teste de <i>Tukey</i> para identificação das médias que diferem entre si	46
Tabela 14 – Valores de IC ₅₀ (média e desvio padrão, em nM) obtidos para cada formulação testada na linha CLBL-1 a diferentes tempos de exposição: 3h, 6h e 24h.....	49
Tabela 15 – Valores de IC ₅₀ obtidos para o panobinostat avaliado nos diferentes números de células semeadas por poço.....	51
Tabela 16 – IC ₅₀ obtidos para um período de exposição de 72h, em 5x10 ³ e em 6x10 ⁴ células semeadas por poço	53

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Fórmula para o cálculo da % de viabilidade celular.. 31

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

17-71	Linha celular de Linfoma Canino
ABC	<i>Adenosine triphosphate-binding cassette</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
BHE	Barreira hematoencefálica
BNML	<i>Brown Norway myelocytic leukemia</i>
Chol	Colesterol
CHOP	Ciclofosfamida, Hidroxildaunorrubicina, Oncovin, e Prednisona
CLBL-1	Linha celular de Linfoma Canino
CO ₂	Dióxido de carbono
COX-2	Ciclooxigenase-2
DLBCL	<i>Diffuse large B-cell lymphomas</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT	Dose máxima tolerada
DPPC	Dipalmitoil fosfatidil colina
DSPE	Diestearoil fosfatidil etanolamina
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EPR	<i>Enhanced permeability and retention</i>
Fab	<i>Fragment antigen-binding</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGFR	<i>Fibroblasts growth factor receptor</i>
FMV-UL	Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa
g	Força gravitacional – unidade de medida do processo de centrifugação
H3	Histona 3
HDAC	Deacetilase das Histonas
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HEV	Hospital Escolar Veterinário
IC ₅₀	Concentração inibitória 50
iHDAC	Fármacos inibidores das enzimas deacetilases das histonas
KB	Células de carcinoma cervical humano
LNCaP	<i>Lymph node carcinoma of the prostate</i>
LNHh	Linfoma não- <i>Hodgkin</i> humano
mA	Miliampere

MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MCF-7	Linha celular de cancro da mama humano
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial de hidrogénio
PLFo	Panobinostat em lipossomas com folatos associados ao PEG
REAL	<i>Revised European American Lymphoma</i>
RF	Recetores de folatos
RIPA	<i>Radio immunoprecipitation assay</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RTf	Recetores de transferrina
SAHA	<i>Suberoylanilide hydroxamic acid</i>
SBHA	<i>Suberoil bishydroxamic acid</i>
scFv	<i>Single-chain variable fragment</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SMAD4	Gene de supressão tumoral humano
SMF	Sistema mononuclear fagocitário
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
U87	Linha celular de glioblastoma humano
UIDI	Unidade de Isolamento de Doenças Infetocontagiosas
WF	<i>Working Formulation</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

CAPÍTULO I – DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DE ESTÁGIO

O estágio curricular para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária foi realizado no Hospital Escolar Veterinário (HEV) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL), entre 11 de setembro de 2017 a 9 de março de 2018, na área da clínica de animais de companhia, com uma carga horária total de 1108 horas. O período de estágio foi dividido segundo um horário de rotatividade semanal ou mensal entre os vários serviços existentes como: medicina interna de animais de companhia e exóticos, internamento, internamento da Unidade de Isolamento de Doenças Infetocontagiosas (UIDI) da FMV, Cirurgia, Imagiologia, consultas de primeira opinião, referência e acompanhamento nas especialidades de Dermatologia, Neurologia, Ortopedia, Oncologia e Oftalmologia.

No período de tempo compreendido entre 11 de setembro de 2017 a 10 de novembro de 2017 (de carga horária total de 384 horas) o estágio decorreu na UIDI onde a aluna desenvolveu competências em cuidados intensivos e intermédios ao abrigo de protocolos de isolamento, a animais com suspeita ou diagnóstico confirmado de doença infetocontagiosa. Neste serviço foram prestados cuidados de internamento como monitorizações, colheitas de amostras biológicas para exames complementares, higienização, preparação e administração de medicamentos prescritos pelo Médico Veterinário responsável, alimentação, limpeza e desinfecção das jaulas/camas sob aplicação de medidas básicas de precaução (como higienização e desinfecção, utilização de material de proteção como: luvas, batas, máscaras descartáveis, proteções para os pés, desinfecção das solas dos sapatos hospitalares em tapete desinfetante e viseira de proteção) em ambiente de ventilação e pressão negativa, de acordo com cada tipo de doença infecciosa, respetivo tipo de transmissão (contacto, via aérea, gotículas) e risco. Sob orientação da Professora Doutora Solange Gil, teve oportunidade de assistir a consultas de acompanhamento na UIDI. No âmbito da área de Doenças Infetocontagiosas elaborou, em grupo, duas apresentações de casos clínicos sobre as doenças Parvovirose e Esgana onde abordou diagnósticos diferenciais, plano de diagnóstico, análise e interpretação de exames complementares e tratamento.

No HEV, durante o período de estágio compreendido de 13 de novembro a 9 de março, a aluna assistiu e participou em diversas consultas de primeira e segunda opinião, tendo a possibilidade de executar ou auxiliar, sob supervisão do médico veterinário responsável ou enfermeiro veterinário, procedimentos como: colheita de sangue, interpretação das análises clínicas no contexto clínico de cada paciente (hemograma completo, bioquímicas e ionograma, urina tipo II, urocultura), realização de microhematócrito, utilização do refratómetro para determinação das proteínas totais séricas e de densidade urinária, venopunção para colocação de catéter, medição da glicémia, medição de lactato no sangue, realização de testes rápidos no Chem8, *eco-fast*, drenagem de líquido de derrames cavitários, algáliação, colheita de urina por cistocentese, realização de enemas, realização de punções aspirativas por agulha fina e colheita de medula óssea, limpeza de feridas, administração de

medicamentos (via oral, endovenosa, intramuscular e subcutânea), vacinação, medição da pressão arterial, teste de fluoresceína, teste de Schirmer, medição de tensão ocular, biomicroscopia e exame de fundo do olho, preparação e administração de quimioterápicos, preparação e coloração de lâminas de citologia, esfregaços sanguíneos e observação das mesmas ao microscópio óptico, realização de testes rápidos para diagnóstico de doenças infecciosas e hemoparasitas, remoção de pontos simples, realização de pensos simples e pensos gordos, entre outros. Teve também oportunidade de acompanhar e auxiliar exames de diagnóstico complementares como endoscopias, colonoscopias, broncoscopias e rinoscopias. Participou também na apresentação e discussão semanal de casos clínicos sob a organização da Dra. Carla Monteiro, na qual elaborou uma apresentação “Intoxicação pela Lagarta do Pinheiro”.

No serviço de Imagiologia a aluna teve a oportunidade de, sob supervisão do médico veterinário responsável, participar no diagnóstico imagiológico recorrendo a ecografia abdominal, ecocardiografia, raio-X e tomografia computadorizada. Desenvolveu competências quanto à contenção e posicionamento dos animais, monitorização de anestesia quando necessária e à realização, bem como a interpretação, dos exames.

Durante o período de estágio no serviço de cirurgia a aluna teve oportunidade de visualizar e/ou auxiliar em cirurgias de tecidos moles, extirpação de nódulos e biópsias de pele, cirurgia oftalmológica, ortopédica, neurológica, dentística (com recurso a raio-X intraoral, quando necessário). No bloco cirúrgico acompanhou os animais antes, durante e após as cirurgias, realizando a avaliação de análises pré-cirúrgicas, admissão e preparação do doente (colocação de catéter, entubação endotraqueal, tricotomia, limpeza e assépsia da zona sujeita à intervenção), administrando a pré-medicação e a indução anestésica, preparando o material cirúrgico e os aparelhos de monitorização anestésica, monitorizando a anestesia, auxiliando durante a cirurgia e, no recobro desta, efetuando as avaliações e os cuidados pós-cirúrgicos. Durante as cirurgias, teve a oportunidade de desempenhar as funções de anestesista, ajudante de cirurgião e circulante.

No internamento, os turnos realizados foram de 12 horas, sendo no horário de dia ou noite. Aqui teve oportunidade de assistir à passagem de casos no início de cada turno e, consoante as necessidades individuais de cada paciente, realizou monitorização clínica, administração de medicamentos prescritos pelo Médico Veterinário responsável, cuidados de higiene e alimentação para cada paciente, limpeza e desinfeção do ambiente.

No segundo semestre, no período de 12 de março a 8 de junho de 2018, desenvolveu atividade no grupo de investigação do Doutor Frederico Aires da Silva, sob sua orientação, no âmbito do Projeto Linfoma Canino, o qual reporta aos doutoramentos de Dra. Joana Dias e Dra. Ana André. Foi durante este período que a aluna executou os trabalhos práticos em Laboratório para a elaboração desta dissertação de mestrado. Durante este período, adquiriu conhecimentos práticos em manipulação e cultura de células de mamíferos, mais

especificamente em linhas de células em suspensão de Linfoma Canino (17-71 e CLBL-1) e de células aderentes de glioblastoma humano (U87). Teve oportunidade de executar ensaios de citotoxicidade *in vitro* e outras técnicas de laboratório como SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) e *Western Blot*. Elaborou também uma comunicação em painel, em conjunto com os restantes elementos da equipa de investigação deste projeto, para apresentação no Congresso CIISA 2018 - "*Exploring the boundaries of animal, veterinary and biomedical sciences*" realizado em novembro de 2018 (*abstract* disponível para consulta no ANEXO I).

CAPÍTULO II – INTRODUÇÃO TEÓRICA

1. Introdução – O cancro em Medicina Veterinária

Tal como no Homem, o cancro é uma das principais causas de morte em cães (Biller et al., 2016; Miranda et al., 2016). Apesar de não haver evidências suficientes que comprovem que a prevalência de cancro em cães tem vindo a aumentar, a evolução da Medicina Veterinária e maior acesso a cuidados médicos tem proporcionado um aumento na esperança média de vida dos animais e conseqüentemente, um aumento do risco do aparecimento de neoplasias (Bonnett, Egenvall, Hedhammar, & Olson, 2005; Pang & Argyle, 2016).

A incidência real de neoplasias em cães domésticos, uma vez que não existem estudos demográficos completos a partir dos quais se possam obter resultados confiáveis, como ocorre em Medicina Humana, ainda não é conhecida (Pang & Argyle, 2016). Os estudos existentes não são recentes e baseiam-se em registos de hospitais escolares ou de companhias de seguro (Brønden, Flagstad, & Kristensen, 2007).

Porém, um estudo realizado na população de cães domésticos da Dinamarca entre 2005 a 2008, observou que os tipos mais comuns de neoplasias malignas foram adenocarcinoma (21%), mastocitoma (18,4%) e linfoma (15,8%) (Brønden, Nielsen, Toft, & Kristensen, 2010). Em adição, a partir de dados recolhidos de uma companhia de seguros no Reino Unido, entre 1997-1998, foi realizado um estudo que demonstrou que os três tipos de tumores mais frequentes em cães domésticos foram: sarcoma de tecidos moles, seguido de mastocitoma e linfoma (Dobson, Samuel, Milstein, Rogers, & Wood, 2002). Estes resultados estão em concordância com um outro estudo realizado anteriormente na Escola de Medicina Veterinária de Pennsylvania (Cohen, Reif, Brodey, & Keiser, 1974).

2. Abordagens terapêuticas convencionais

As três principais abordagens terapêuticas para o tratamento de neoplasias atualmente aplicados em Medicina Veterinária são: a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia (Farese & Withrow, 2013; Morris & Dobson, 2001b). As opções terapêuticas devem ser adaptadas para cada caso em particular com vista a uma cura completa, no entanto esta dificilmente é conseguida (Morris & Dobson, 2001b).

2.1. Cirurgia

O objetivo principal do tratamento cirúrgico de neoplasias sólidas, benignas ou malignas, é a remoção física de todas as células neoplásicas. A cirurgia como abordagem curativa para tumores primários poderá ter resultados bastante satisfatórios, sobretudo em tumores de baixo grau com limites bem demarcados em relação aos tecidos adjacentes, nos quais a extirpação do tumor e obtenção de margens limpas são mais facilmente conseguidas (Morris & Dobson, 2001). Em comparação com outras modalidades de tratamento, a cirurgia de

tumores localizados não tem efeitos carcinogénicos nem imunossupressores, não tem efeitos tóxicos locais e poderá ser curativa (Jermyn & Lascelles, 2010).

Para determinação de um plano terapêutico no qual a cirurgia poderá ser, ou não, uma opção viável é necessária uma avaliação bem fundamentada consoante o tipo e grau histológico da neoplasia, estadio, localização e relação com os tecidos envolventes e efeitos sistémicos da doença (Farese & Withrow, 2013).

Pode ser aplicada com várias intenções como: excisão definitiva de neoplasias sólidas, citorredução da massa tumoral, profilaxia, diagnóstico e estadiamento da doença oncológica, terapia paliativa, cirurgia de suporte e tratamento de doença metastática (Jermyn & Lascelles, 2010).

2.1.1. Desvantagens

A cirurgia poderá não ser tão eficaz em tumores de alto grau, tumores com margens mal definidas, tumores recorrentes ou em casos cujo historial sugere ter ocorrido um rápido crescimento da neoplasia e conseqüentemente uma rápida evolução da doença (Bacon, Dernell, Ehrhart, Powers, & Withrow, 2007). A localização do tumor e o seu tamanho poderão também ser fatores limitantes de um ponto de vista funcional, o que torna a cirurgia uma opção menos relevante em relação a outras abordagens terapêuticas (Farese & Withrow, 2013).

O insucesso do tratamento cirúrgico poderá ter como causas: a resseção incompleta da massa tumoral – que poderá levar ao reaparecimento do tumor no mesmo local intervencionado ou num local adjacente; contaminação de tecidos sãos com células neoplásicas no momento da cirurgia devido a hemorragia, instrumentos cirúrgicos ou por drenos cirúrgicos; e existência de metástases previamente à cirurgia (Bacon et al., 2007; Farese, 2008; Morris & Dobson, 2001).

Existem alguns casos de dor crónica pós-cirúrgica, como é o caso das mastectomias em mulheres, que embora não esteja ainda esclarecido, se pensa ser devida a um complexo conjunto de fatores incluindo a lesão de nervos periféricos em cirurgia (Carpenter et al., 1999; Tasmuth, von Smitten, & Kalso, 1996). Algumas cirurgias oncológicas estão associadas a altos graus de dor no período pós-operatório, como por exemplo, a mandibulectomia e a maxilectomia aplicados para o tratamento de neoplasias orais, em cães (Martins et al., 2010).

2.2. Radioterapia

A radioterapia é uma das modalidades aplicadas no tratamento de neoplasias que consiste na emissão de radiação ionizante com capacidade de provocar danos celulares aos tecidos por ela incididos (Green, 2008; LaRue & Gordon, 2013). A radiação provoca uma ionização dos átomos que conseqüentemente poderá causar danos no ácido desoxirribonucleico (ADN) tanto por forma direta como por forma indireta através da formação de radicais livres (LaRue & Gordon, 2013; Ward, 1988). As células que se encontram na fase mitótica (fase M) do ciclo

celular são mais radiosensíveis do que as células que se encontram na fase de replicação (fase S) do ciclo celular e em G0, que são relativamente mais radorresistentes (Morris & Dobson, 2001b).

Antes de ser realizada a radioterapia é necessário determinar um protocolo adequado consoante o tipo de tumor, grau, estágio e localização (Green, 2008; LaRue & Gordon, 2013). Esta modalidade surge como terapia definitiva quando - por razões estéticas, funcionais e de qualidade de vida - a cirurgia se revela uma abordagem menos eficaz, ou como complemento a outras modalidades terapêuticas (LaRue & Gordon, 2013). A radioterapia poderá ser indicada como terapia definitiva, com a instituição de um protocolo de controlo tumoral mais prolongado com a aplicação de frações diárias de radiação durante 4-6 semanas.

Pode também ser realizada como terapia paliativa tendo como objetivo principal o maneio da dor e redução de sinais clínicos sendo, em alguns casos, responsável por prolongar o tempo de sobrevivência (Tollett, Duda, Brown, & Krick, 2015). O protocolo de radioterapia paliativa consiste na aplicação de uma maior dose de radiação em sessões semanais durante aproximadamente 3 a 4 semanas (Green, 2008; Tollett et al., 2015). Na tabela 1 encontram-se alguns exemplos neoplasias para as quais está indicada a radioterapia.

Tabela 1 – Neoplasias mais comumente indicadas para Radioterapia.

	Tipo de tratamento	Indicações	Fonte
Neoplasias cerebrais	Terapia única	Neoplasias inoperáveis	(Bley, Sumova, Roos, & Kaser-Hotz, 2005; Evans et al., 1993)
Neoplasias nasais	Terapia única Terapia adjuvante Terapia paliativa	Carcinomas de células escamosas	(Mellanby, Stevenson, Herrtage, White, & Dobson, 2002; Adams et al., 2005)
Neoplasias Orais	Terapia adjuvante Terapia paliativa	Fibrossarcoma, melanoma maligno, carcinoma oral de células escamosas	(Freeman, Hahn, Harris, & King, 2003; Green, 2008)
	Terapia definitiva	Neoplasias inoperáveis Aumento do tempo de sobrevivência em epúlides acantomatosas	(Green, 2008; Margaret C. McEntee, Page, Théon, Erb, & Thrall, 2004)
Mastocitomas	Terapia adjuvante	Útil como terapia adjuvante; Torna-se impraticável em casos de nódulos múltiplos	(Chaffin & Thrall, 2002; Green, 2008)
Outros¹	Terapia adjuvante	Poderá ser aplicada neste tipo de neoplasias, embora menos frequentemente	(LaRue & Gordon, 2013)

¹ – Osteossarcoma, linfoma, adenocarcinoma dos sacos anais, adenocarcinoma perianal, neoplasias na cavidade torácica e abdominal.

2.2.1. Desvantagens

A radioterapia é das abordagens de menor acessibilidade económica e como tal, são escassos os estabelecimentos veterinários que possuem os equipamentos necessários (Green, 2008).

A radiação ionizante poderá também ter efeito carcinogénico nas células incididas resultando no aparecimento de neoplasias histologicamente diferentes do tumor original, no local onde foi realizada a radioterapia (Hall & Wuu, 2003). O risco de aparecimento destas neoplasias secundárias é influenciado pela idade do animal, pelo tipo de tecido submetido à radiação e também pelo tipo de radioterapia realizada (Hall & Wuu, 2003; LaRue & Gordon, 2013).

Este tipo de tratamento não discrimina as células neoplásicas das células normais causando o aparecimento de efeitos secundários a curto prazo e a longo prazo (Green, 2008).

Os efeitos a curto prazo ocorrem durante, ou logo após, a radioterapia e atingem tecidos de rápida proliferação celular como a mucosa oral e epitélio intestinal, da pele e olhos. O efeito da radiação nestes tecidos poderá traduzir-se em efeitos secundários – como mucosite com espessamento da saliva, perda do paladar e apetite, epistáxis, espirros, rinorreia, eritema e descamação da pele, conjuntivite, blefarite, blefarospasmo – que poderão ser reversíveis, retornando ao normal em 2-3 semanas, ou tornar-se crónicos por indução de lesões permanentes (LaRue & Gordon, 2013; Stewart & Dörr, 2009).

Os efeitos a longo prazo resultam da interação da radiação ionizante com tecidos de proliferação celular mais lenta – tecido ósseo, pulmonar, cardíaco, renal e nervoso – e limitam a escolha da dose de radiação a aplicar. Os efeitos secundários a longo prazo poderão incluir fibrose nos tecidos, estenose do intestino, cataratas, mielopatia desmielinizante, ostiorradionecrose, queratoconjuntivite seca (Green, 2008; Stewart & Dörr, 2009).

2.3. Quimioterapia

A quimioterapia é uma modalidade terapêutica que permite uma atuação a nível sistémico e como tal, é a principal escolha para o tratamento de neoplasias sistémicas e metástases. O seu princípio é o de interferir com processos intervenientes na progressão do ciclo celular, tendo como alvo as células em divisão (Moore & Frimberger, 2008). Antes de ser iniciado o protocolo de quimioterapia deve ser estabelecido um diagnóstico definitivo, o estadiamento clínico e deve ser avaliada a presença de outras doenças. A escolha do protocolo quimioterápico deve ter em conta não só a evolução da doença oncológica, como também a presença de outras doenças (como por exemplo: doenças cardíacas, hepáticas ou renais) que possam comprometer o objetivo do tratamento citotóxico e a sua eficácia (Moore & Frimberger, 2008).

A quimioterapia pode ser realizada como terapia adjuvante, sendo realizada após outros tratamentos, como a cirurgia e radioterapia, com o objetivo de atuar em micrometástases ocultas. Pode ser realizada como terapia primária, tendo como objetivo a sensibilização dos

tecidos neoplásicos para posterior radioterapia ou para redução do tamanho da massa neoplásica previamente à cirurgia e prevenção do aparecimento de metástases (Gustafson & Page, 2013). No tratamento de neoplasias hematológicas, a quimioterapia é frequentemente utilizada como abordagem única (Moore & Frimberger, 2008). Pode também ser aplicada como tratamento paliativo, com o objetivo de diminuir os sinais clínicos e assim contribuir para o manejo da dor em casos incuráveis (Moore & Frimberger, 2008).

A maioria dos fármacos citotóxicos atua na fase de replicação do ciclo celular (Fase S) – como por exemplo os compostos alquilantes, os inibidores da topoisomerase e os anti-metabolitos (Gatto & Liu, 1998; Gustafson & Page, 2013; Lawley & Brookes, 1965; Longley, Harkin, & Johnston, 2003). Outros fármacos, inibidores da transdução de sinal, impedem a entrada da célula no ciclo celular em G1 impedindo a progressão da proliferação celular. Existe ainda outro grupo de fármacos com capacidade de interferir na fase de divisão celular (fase M) e despoletar mecanismos de apoptose levando à morte celular (Gustafson & Page, 2013). Na tabela 2 apresentam-se alguns fármacos quimioterápicos utilizados em Oncologia Veterinária e Humana.

Tabela 2 – Fármacos quimioterápicos aplicados em Oncologia Veterinária e Humana.

Fármacos	Mecanismo de ação e Indicações	Fonte
<p>Compostos alquilantes</p> <p>Mecloretamina Melfalan Ciclofosfamida Ifosfamida Clorambucil Lomustina Streptozocina Dacarbazina Procarbazina</p>	<p>Ligação covalente de grupos alquilo às macromoléculas de ADN. Ligações cruzadas na mesma cadeia ou entre cadeias de ADN</p>	<p>(Gustafson & Page, 2013)</p>
<p>Antibióticos tumorais</p> <p>Doxorrubicina Daunorrubicina Mitoxantrona Actinomicina-D</p>	<p>Atuam por intercalação do ADN. Utilizados frequentemente no tratamento de neoplasias hematológicas – fármaco único ou em protocolos de combinação de fármacos</p>	<p>(Gustafson & Page, 2013; Moore & Frimberger, 2008; Berman et al., 1991)</p>

<p>Anti-metabolitos</p> <p>Citosina arabinósido Metotrexato Gemcitabina 5-Fluorouracil</p>	<p>Análogos aos metabolitos existentes no organismo – impedem o uso de metabolitos celulares imprescindíveis para o crescimento e divisão celular; Poderão fazer parte de protocolos combinados de quimioterapia para neoplasias hematológicas em animais de companhia; Gemcitabina – agente com propriedades radiosensibilizadoras</p>	<p>(Gustafson & Page, 2013; Lawrence, Chang, Hahn, Hertel, & Shewach, 1996)</p>
<p>Compostos de Platina</p> <p>Carboplatina Cisplatina</p>	<p>Ligações cruzadas com o ADN. Aplicação no tratamento de osteossarcoma canino. Carboplatina apresenta menos efeitos secundários (menor efeito de nefrotoxicidade, vômitos e náuseas)</p>	<p>(Gustafson & Page, 2013; Roberts & Thomson, 1979)</p>
<p>Anti-microtúbulos</p> <p>Paclitaxel Docetaxel</p> <p>Vincristina Vinblastina</p>	<p>Interferem com a polimerização ou despolimerização dos microtúbulos sendo responsáveis pela indução de apoptose</p> <p>Ação inibitória sobre o fuso mitótico</p>	<p>(Gustafson & Page, 2013)</p> <p>(Moore & Frimberger, 2008)</p>
<p>Hidroxiureia</p>	<p>Inibição da redutase ribonucleica resultando numa inibição da síntese de ADN e apoptose da célula</p>	<p>(Bianchi, Pontis, & Reichard, 1986)</p>
<p>L-asparaginase</p>	<p>Depleção de L-asparagina, indispensável à síntese proteica nas células tumorais</p>	<p>(Story, Voehringer, Stephens, & Meyn, 1993).</p>
<p>Prednisona/ prednisolona</p>	<p>Os mecanismos de ação exatos não estão ainda definidos. Pensa-se que a sua ação anti-tumoral resulta da ocupação dos recetores de glucocorticoides. Há evidências de que induz apoptose em neoplasias hematológicas.</p>	<p>(Gustafson & Page, 2013; Frankfurt & Rosen, 2004; Greenstein, Ghias, Krett, & Rosen, 2002)</p>

2.3.1. Desvantagens da quimioterapia

2.3.1.1. Efeitos adversos

Os fármacos quimioterápicos não são seletivos para células cancerígenas e, portanto, a sua ação sobre tecidos normais conduz, por norma, à ocorrência de efeitos adversos (Morris & Dobson, 2001b).

Para a maioria dos compostos citotóxicos a dose escolhida para administração é baseada no valor da dose máxima tolerada (DMT) e ajustada de acordo com os efeitos secundários

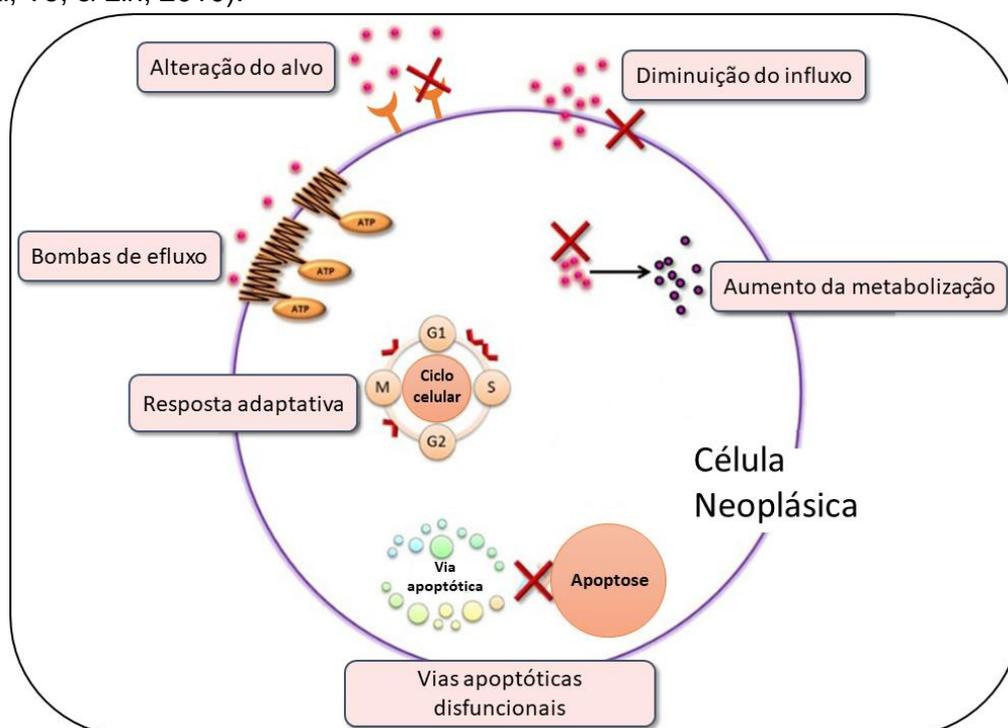
verificados em cada caso (Gustafson & Page, 2013; Morris & Dobson, 2001). A DMT é um valor obtido empiricamente e que representa a dose máxima administrada para a qual os efeitos observados são aceitáveis e reversíveis (Gustafson & Page, 2013).

Os tecidos com maior taxa de proliferação celular são os mais suscetíveis à ação destes fármacos citotóxicos, e por este motivo, os efeitos adversos mais comuns são depressão da medula óssea e os problemas gastrointestinais, que poderão ser atenuados ou reversíveis com a redução da dose ou suspensão do tratamento (Cunha, 2014; Gustafson & Page, 2013). Alguns fármacos específicos poderão também ser responsáveis por cardiotoxicidade (doxorubicina) (Mauldin et al., 1992), nefrotoxicidade (cisplatina) (Lebwohl & Canetta, 1998), cistite hemorrágica (ciclofosfamida) (Charney, Bergman, Hohenhaus, & McKnight, 2003), reações de hipersensibilidade e anafilaxia (Weiss, 1981), flebite e necrose dos tecidos perivasculares quando extravasão do fármaco do vaso sanguíneo (Gustafson & Page, 2013; Morris & Dobson, 2001b).

2.3.1.2. Mecanismos de resistência

A resistência das células tumorais a um fármaco citotóxico pode ocorrer em diversos eventos críticos como por exemplo: ao nível da entrada do fármaco na célula, da metabolização ou ativação do fármaco, do alvo do fármaco, da via de reparação dos danos causados no ADN, bem como do reconhecimento dos danos existentes e a resposta a estes (figura 1) (Gustafson & Page, 2013).

Figura 1 – Mecanismos de resistência das células neoplásicas aos quimioterápicos (adaptado de Chai, To, & Lin, 2010).



A diminuição dos níveis de fármaco presente dentro das células pode ser devida tanto a uma modificação nos transportadores celulares, impedindo a entrada do fármaco, como a um aumento do efluxo do fármaco para o meio extracelular (Eckford & Sharom, 2009);

Está descrito o aumento do nível de algumas enzimas responsáveis pela metabolização do fármaco citotóxico (Wang & Tew, 1985) ou até diminuição de enzimas responsáveis pela ativação metabólica do fármaco, como é o caso da gemcitabina (Ohhashi et al., 2008).

Uma mutação numa proteína pode ser suficiente para haver modificação do alvo, resultando numa alteração da afinidade do fármaco citotóxico para a célula neoplásica (Gustafson & Page, 2013). Estas modificações poderão consistir em: diminuição dos níveis de expressão de um alvo (Long et al., 1991), aumento dos níveis do alvo (por forma a superar a capacidade inibidora do fármaco) (Alt, Kellems, Bertino, & Schimke, 1977) ou mesmo por mutação do alvo com conseqüente perda de afinidade do fármaco (Andoh et al., 1987; Giannakakou et al., 1997).

Há também evidências de haver uma alteração nas vias de reparação, vigilância e pós-replicação do ADN que tornam a célula resistente a lesões induzidas pelo fármaco citotóxico (Parker, Eastman, Bostick-Bruton, & Reed, 1991).

Em alguns casos, as células neoplásicas manifestam uma resistência a múltiplos fármacos (*multidrug resistance* - MDR) (Gustafson & Page, 2013). Este tipo de resistência resulta da expressão de bombas de efluxo dependentes de ATP - os transportadores *adenosine triphosphate-binding cassette* (transportadores ABC) - responsáveis pelo efluxo de diferentes fármacos, como a vincristina, vimblastina, doxorubicina, daunorrubicina, actinomicina-D e paclitaxel reduzindo a sua concentração intracelular (Eckford & Sharom, 2009). No caso dos cães está descrita a expressão de ABCB1 no linfoma canino (Lee, Hughes, Fine, & Page, 1996), tumores mamários (Honscha et al., 2009) e em carcinomas pulmonares (Hifumi, Miyoshi, Kawaguchi, Nomura, & Yasuda, 2010).

Como exemplo, existem casos de resistência à terapia ao protocolo quimioterápico CHOP (Ciclofosfamida, Hidroxildaunorrubicina, Vincristina/Oncovin®, e Prednisona) aplicado tanto no tratamento de linfoma não-*Hodgkin* humano como em linfoma canino (Jiang et al., 2016; Suenaga et al., 2017).

3. Outras abordagens terapêuticas

Como referido anteriormente, existem algumas desvantagens e dificuldades nas abordagens terapêuticas convencionais, tanto em Oncologia Veterinária como em Oncologia Humana, que contribuem para o seu insucesso. Surge então a necessidade da investigação de novas abordagens – como exemplo, a nanomedicina – que explorem terapias mais específicas e dirigidas para os tecidos neoplásicos que consigam superar estes aspetos (De Jong & Borm, 2008; Kawasaki & Player, 2005).

3.1. Nanomedicina

A nanomedicina é um ramo da medicina que traz novas vantagens quanto à detecção, prevenção e tratamento, na área da oncologia. Numa perspectiva biotecnológica, a nanomedicina proporciona diferentes ferramentas moleculares à escala dos nanómetros que poderão trazer vantagens à terapia oncológica (Wagner, Dullaart, Bock, & Zweck, 2006). Estas ferramentas – nanopartículas – possibilitam a incorporação de moléculas ou substâncias como múltiplos fármacos, agentes de detecção para diagnóstico imagiológico e moléculas de direcionamento (*targeting*) para aplicação no diagnóstico e tratamento de doenças oncológicas. Poderá trazer vantagens sobre a medicina convencional pois (a) permite direcionar a entrega de um ou mais fármacos num local pretendido ou mesmo nas células tumorais, (b) permite o aumento do tempo de circulação das substâncias e a sua libertação controlada (Jain & Stylianopoulos, 2010) e (c) poderá ter potencial para superar mecanismos de resistência das células neoplásicas ao tratamento convencional (Hu & Zhang, 2009).

No âmbito do tratamento de neoplasias, tem como objetivo um tratamento mais específico, com maior eficácia e redução dos efeitos secundários que os mesmos fármacos teriam se fossem administrados na sua forma livre, através de um sistema de *drug delivery* (Kim et al., 2004; O'Brien, 2004; Tran, DeGiovanni, Piel, & Rai, 2017). As nanopartículas, utilizadas como transportadoras de fármacos citotóxicos convencionais, podem permitir o controlo da sua biodistribuição e farmacocinética (Liu, Mori, & Huang, 1992; Papahadjopoulos et al., 1991).

3.1.1. Nanopartículas - Lipossomas

Vários tipos de nanopartículas têm sido desenvolvidas e otimizadas – lipídicas, poliméricas, inorgânicas, virais – com tamanhos variáveis na ordem dos nanómetros (nm) e que poderão ser úteis tanto no tratamento (Kim et al., 2004; Kim & Thorne, 2009; O'Brien, 2004; Tran et al., 2017) como no diagnóstico de neoplasias (Jain, Lee, El-Sayed, & El-Sayed, 2006).

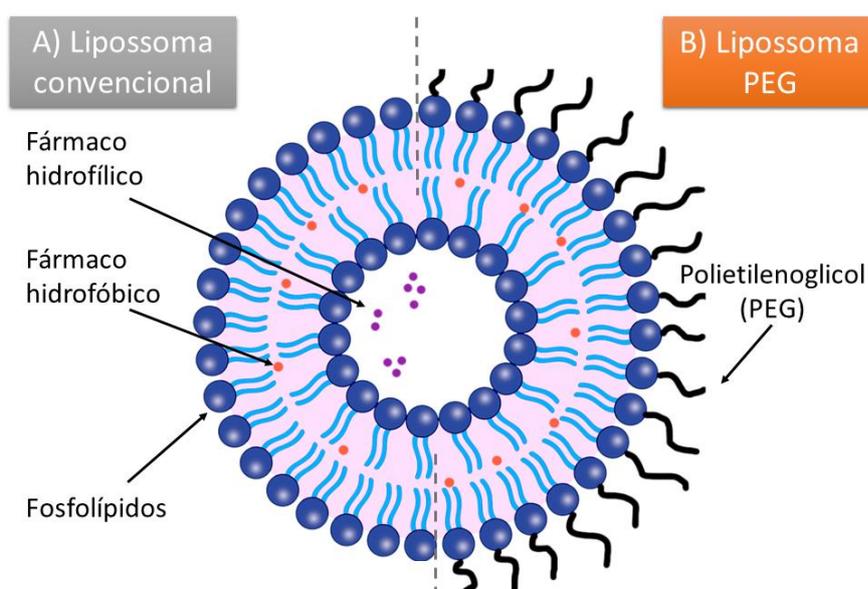
Os lipossomas são estruturas vesiculares esféricas biocompatíveis e biodegradáveis, constituídas por uma ou mais bicamadas de lípidos anfifílicos naturais ou sintéticos (Papahadjopoulos et al., 1991; Tran et al., 2017). Permitem encapsular tanto substâncias hidrofílicas como hidrofóbicas, proporcionando-lhes proteção e estabilidade face às condições exteriores e têm capacidade para transportar mais do que um fármaco (Hu & Zhang, 2012).

As nanopartículas podem ter diferentes propriedades físico-químicas e biológicas que permitem a modulação da solubilidade, degradação, e da eliminação das moléculas que desejamos encapsular (Papahadjopoulos et al., 1991; Wicki, Witzigmann, Balasubramanian, & Huwyler, 2015). A sua eficácia poderá estar dependente do seu tamanho (Mayer et al., 1989), carga elétrica (Campbell et al., 2002), potencial de hidrogénio (pH) do meio envolvente (Simões, Moreira, Fonseca, Düzgüneş, & Pedroso de Lima, 2004), composição lipídica

(Maruyama, Kennel, & Huang, 1990) ou percentagem de colesterol na sua composição (Patel, Tužel, & Ryman, 1983).

Estas estruturas são facilmente sintetizadas e manipuláveis e, por isso, é também possível adicionar outras moléculas à sua composição (Zhang & Granick, 2006). Assim, pode ser-lhe associado um polímero inerte e biocompatível, por exemplo, o polietilenoglicol (PEG) (figura 2) que o torna mais solúvel e estável (Papahadjopoulos et al., 1991; Zhang & Granick, 2006), que previne a opsonização, o reconhecimento e a fagocitose do lipossoma pelo sistema mononuclear fagocitário (SMF) e conseqüente remoção da circulação sanguínea (Scherphof, Dijkstra, Spanjer, Derksen, & Roerdink, 1985). Deste modo é possível obter um aumento do tempo de circulação do lipossoma no sangue por alteração da sua biodisponibilidade (Gref et al., 1994).

Figura 2 – Lipossoma como transportador de fármacos citotóxicos (original da autora).



Legenda:

- A) Lipossoma Convencional constituído por fosfolípidos;
- B) Lipossoma coberto com polímeros de polietilenoglicol.

Através de estratégias passivas e ativas, os lipossomas podem promover o aumento da concentração intracelular do fármaco citotóxico nas células neoplásicas e evitar toxicidade nas células normais (Rahman, Fumagalli, Barbieri, Schein, & Casazza, 1986; Scomparin et al., 2015). A neovascularização e permeabilidade vascular características dos tecidos tumorais favorecem acumulação das nanopartículas nestes tecidos pelo chamado efeito de “aumento de permeabilidade e retenção” (EPR – “*enhanced permeability and retention*”). Deste modo, as nanopartículas com moléculas de fármaco no seu interior acumulam-se de forma passiva nos tecidos tumorais, diminuindo a sua toxicidade sobre os tecidos sãos (Gustafson & Page, 2013; Matsumura & Maeda, 1986; Muggia, 1999; Senger et al., 1983). Como estratégias ativas poderão também ser conjugados anticorpos ou ligandos aos

lipossomas, que permitam um reconhecimento e direcionamento do fármaco quimioterápico para as células tumorais.

O sucesso da nanomedicina está documentado em alguns casos de neoplasias resistentes, nos quais esta tecnologia demonstra ser mais eficaz do que as terapias convencionais (Zhang et al., 2012; Zhao et al., 2013).

3.1.2. Direcionamento ativo

Para uma maior eficácia das nanopartículas é possível modular a sua especificidade face ao tipo de células que pretendemos tratar – *targeting* – através da conjugação de um ligando à sua superfície, para que seja reconhecido pelo tecido-alvo e para melhorar a internalização celular do fármaco (Byrne, Betancourt, & Brannon-Peppas, 2008).

Para este efeito poderão ser preconizados tanto alvos intracelulares, como extracelulares, que se encontram sobreexpressos em células cancerígenas – como exemplos: o *epidermal growth factor receptor* (EGFR), *fibroblasts growth factor receptor* (FGFR), recetores de folatos (RF), recetores de transferrina (RTf), mitocôndrias, lisossomas e cicloxigenase-2 (COX-2) (Maya et al., 2013; Riaz et al., 2018; Shmeeda et al., 2006; Singh, 1999; Szlachcic et al., 2012).

A funcionalização das nanopartículas poderá ser realizada pela conjugação de ligandos como anticorpos ou fragmentos de anticorpos, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos e outras moléculas como os folatos e a transferrina (Park et al., 2002; Saha, Vasanthakumar, Bende, & Snehalatha, 2010; Shmeeda et al., 2006; Singh, 1999).

3.1.2.1. Exemplos de direcionamento ativo

Os folatos são ligandos frequentemente explorados como forma de direcionamento no âmbito da terapia oncológica (Lee & Low, 1995; Pan et al., 2002; Sudimack & Lee, 2000; Zhao & Lee, 2004). Estes poderão encontrar-se sobreexpressados em tecidos neoplásicos e estão relacionados com a progressão da doença (Byrne et al., 2008). A distribuição das nanopartículas pelos tecidos neoplásicos é heterogénea com uma maior acumulação destas na zona perivascular, o que dificulta o tratamento de tumores sólidos (Yuan et al., 1994). A conjugação de folatos a lipossomas demonstrou uma maior eficácia na distribuição das nanopartículas, uma vez que os recetores de folatos se encontram sobreexpressos em alguns tecidos neoplásicos (Pan, Wang, & Lee, 2003). Estes ligandos apresentam outras vantagens como a sua baixa imunogenicidade, facilidade de conjugação com a nanopartícula mantendo grande afinidade de ligação e a sua acessibilidade monetária (Low & Antony, 2004). Os recetores de folatos encontram-se sobreexpressos em tecido pulmonar e renal no Cão, embora num menor nível relativamente ao que se verifica no Homem (Parker et al., 2005). Encontram-se sobreexpressos em vários tipos de neoplasias humanas – ováricas, endometriais, mamárias, renais, pulmonares e mesoteliomas (Bueno, Appasani, Mercer, Lester, & Sugarbaker, 2001; Franklin et al., 1994; Holm, Hanses, Holer-Madsen, Sondergaard, &

Bzorek, 1994; Holm, Hansen, Høier-Madsen, Helkjær, & Nichols, 1997). Estes recetores poderão também estar sobreexpressos no caso de linfoma e de neoplasias cerebrais, embora a um nível inferior relativamente aos anteriormente apresentados (Parker et al., 2005). Recetores de folatos do tipo β estão sobreexpressos no caso da leucemia mieloide aguda e na crónica (Pan et al., 2002). Para além disso, esta abordagem poderá também representar uma mais-valia no tratamento de neoplasias resistentes às terapias convencionais – *multi-drug resistance* (Ratnam et al., 2003; Shmeeda et al., 2006; Wu, Liu, & Lee, 2006).

Os imunolipossomas constituem outro tipo de direcionamento ativo. Estes lipossomas são obtidos pela ligação de anticorpos monoclonais ou fragmentos de anticorpos – *fragment antigen-binding* (Fab) ou *single-chain variable fragment* (scFv) – por forma a promover um *uptake* celular mais seletivo e eficaz, uma vez que são capazes de reconhecer e de se ligarem a antigénios expostos pelas células. O anticorpo, ou o seu fragmento, poderá ser ligado à parte distal de uma cadeia de PEG presente à superfície do lipossoma (Zalipsky, Hansen, Lopes de Menezes, & Allen, 1996). Estes também poderão ser associados a moléculas de folatos para um direcionamento específico ao alvo e uma internalização mais eficaz dos fármacos citotóxicos nas células (Pan & Lee, 2007).

Num estudo em carcinoma mamário humano, foram testados imunolipossomas resultantes da ligação de um anticorpo monoclonal dirigido para o antigénio HER2 – recetor sobreexpresso em carcinomas mamários humanos e no Gato (Soares, Correia, Carvalho, & Ferreira, 2012) e em tumores gástricos, de cólon e ováricos no Homem (Nellis et al., 2005);– a lipossomas PEG com doxorrubicina (Park et al., 2002). A aplicação de anticorpos a lipossomas PEG poderá também ser vantajosa no tratamento de neoplasias do cérebro por forma a permitir a passagem dos fármacos pretendidos através da barreira hematoencefálica (BHE) (Huwylar, Wu, & Pardridge, 1996).

3.2. Aplicações dos lipossomas – Oncologia Humana e Veterinária

Existem algumas formulações de fármacos encapsulados em lipossomas aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pela *European Medicines Agency* (EMA) – algumas das quais apresentadas nas tabelas 3 e 4 – e outras ainda em fase de ensaios clínicos para posterior aprovação.

Doxil®, uma das formulações de doxorrubicina em lipossomas aprovadas pela FDA, foi testada em cães e gatos, tendo sido observada uma diminuição de efeitos secundários como a depressão da medula óssea e a cardiotoxicidade. Esta observação demarca uma vantagem no uso deste fármaco em animais com doença cardíaca pré-existente ou causada pela prévia administração de doses tóxicas do fármaco livre. No entanto, foi atribuído um efeito de toxicidade cutânea a este fármaco, tendo sido observados sinais clínicos variáveis, desde um eritema ligeiro e alopecia a grave descamação e ulceração – *Palmar-plantar erythrodysesthesia syndrome* – (Vail, Kravis, Cooley, Chun, & MacEwen, 1997).

Os lipossomas também poderão ser utilizados como transportadores de múltiplos fármacos permitindo uma libertação simultânea de fármacos que poderão ter ação sinérgica. Como exemplo, os lipossomas com PEG multifuncionais são capazes de transportar o paclitaxel e o tariquidar – um inibidor da glicoproteína-P – tendo como objetivo ultrapassar os mecanismos de MDR (Patel, Rathi, Mongayt, & Torchilin, 2011).

As nanopartículas poderão também ser utilizadas para transportar compostos terapêuticos e compostos de contraste por forma a proporcionar em simultâneo o diagnóstico imagiológico e a terapia – *nanotheranostics* (Mura & Couvreur, 2012). Estes *nanotheranostics* são formulados com o objetivo de facilitar a biodistribuição do fármaco, a sua acumulação no tecido-alvo e a quantificação do fármaco libertado no local através de uma visualização por imagiologia, não invasiva. Deste modo, poderá ser possível prever a eficácia e obter com maior precisão um perfil de segurança no tratamento que se pretende aplicar (Karathanasis et al., 2009).

Outra aplicação possível para os lipossomas é o tratamento de tumores metastáticos intracranianos. Observou-se que em metástases cerebrais num modelo murino, que respondem a quimioterapia para o tratamento do tumor primário sistémico, o uso dos lipossomas poderá ser vantajoso na medida em que permite um aumento do tempo de circulação do fármaco e um consequente aumento da sua eficácia no tecido neoplásico metastático intracraniano (Siegal, Horowitz, & Gabizon, 1995), dado que nestes tecidos existe uma disrupção da barreira hematoencefálica (Vick, Khandekar, & Bigner, 1977).

Tabela 3 – Formulações lipossomais aprovadas pela FDA (adaptado de Wicki et al., 2015).

Nome comercial	Substância ativa	Indicação (Ano ¹)	Referência
DaunoXome® [Galen]	Daunorrubicina (lipossoma)	Sarcoma de Kaposi (1996)	(Gill et al., 1996)
DepoCyt® [Pacira]	Citosina Arabinósido (lipossoma)	Meningite neoplásica (1999)	(Phuphanich, Maria, Braeckman, & Chamberlain, 2007)
Doxil®/Caelyx® [Johnson & Johnson]	Doxorrubicina (lipossoma PEG)	Sarcoma de Kaposi (1995) Cancro ovárico (1999) Cancro de mama (2003) Mieloma múltiplo (2007-Europa)	(O'Brien, 2004)
Lipo-Dox® [Taiwan Liposome]	Doxorrubicina (lipossoma)	Sarcoma de Kaposi Cancro ovárico (1998 - Tailândia)	(Khemapech, Oranratanaphan, Termrungruanglert, Lertkachonsuk, & Vasurattana, 2013)
Marqibo® [Talon]	Vincristina (lipossoma)	Leucemia linfóide aguda (2012 - EUA)	(Rodriguez et al., 2009)
Mepact® [Takeda]	Mifamurtide (lipossoma)	Osteossarcoma (2009 - União Europeia)	(Venkatakrisnan et al., 2014)
Myocet® [Cephalon]	Doxorrubicina (lipossoma)	Cancro de mama (2000 - Europa)	(Batist et al., 2001)

¹ – Ano de aprovação pela FDA

Tabela 4 – Formulações lipossomais aprovadas pela EMA

Nome comercial	Substância ativa	Indicação (Ano ¹)	Referência
DaunoXome® [Galen]	Daunorrubicina (lipossoma)	Sarcoma de Kaposi Aprovação em alguns países da União Europeia ²	(EMA, 2016)
DepoCyt® [Pacira]	Citosina Arabinósido (lipossoma)	Meningite linfomatosa (2001)	(EMA, 2011)
Caelyx® [Johnson & Johnson]	Doxorrubicina (lipossoma PEG)	Sarcoma de Kaposi Mieloma Múltiplo Neoplasias ováricas Neoplasias mamárias (1996)	(EMA, 2010; Tzogani et al., 2018)
Mepact® [Takeda]	Mifamurtide (lipossoma)	Osteossarcoma não metastático de alto grau (2009)	(EMA, 2013; Kager, Pötschger, & Bielack, 2010)
Myocet® [Cephalon]	Doxorrubicina (lipossoma)	Tumores mamários metastáticos (2000)	(EMA, 2012)

¹ – Ano de aprovação pela EMA

² – Finlândia, Noruega, Itália, Áustria, Dinamarca, Portugal, Alemanha, Irlanda, Holanda, Reino Unido e França

3.3. Moléculas com atividade citotóxica em tumores – iHDAC

Este grupo de fármacos atua como inibidor das diacetilases das histonas (HDAC) – enzimas que desempenham um importante papel na regulação genética e tem assim atividade citotóxica em tumores (Buchwald, Krämer, & Heinzel, 2009) sendo, por isso, considerados como uma nova classe de compostos modificantes da cromatina com atividade anti-tumoral adequada para a terapia epigenética do cancro (Lakshmaiah, Jacob, Aparna, Lokanatha, & Saldanha, 2014).

Até à data, existem alguns fármacos deste grupo aprovados pela *United States Food and Drug Administration* (FDA) como o *suberoylanilide hydroxamic acid* (SAHA), Belinostat – para o tratamento de linfoma de células T cutâneo e periférico, respetivamente (Lee et al., 2015; Mann, Johnson, Cohen, Justice, & Pazdur, 2007) – e o Panobinostat – aprovado pela FDA e pela EMA para o tratamento de mieloma múltiplo (Raedler, 2016).

As HDAC promovem a diacetilação reversível das histonas, sendo responsáveis pela condensação da cromatina e conseqüentemente pela repressão da expressão dos genes (Bannister & Kouzarides, 2011) e são também responsáveis pela regulação do estado de acetilação de outras proteínas também envolvidas na regulação genética (Chun, 2015; Khan & Thangue, 2012).

Estas enzimas poderão ter um papel importante na repressão de genes supressores de tumores ou na expressão de oncogenes. Há evidências de que existe uma alteração da expressão de HDAC e um recrutamento aberrante destas em diversas neoplasias humanas

(Marks, 2010; Marquard et al., 2009) e caninas (Vinothini, Balachandran, & Nagini, 2009) e que também se correlacionam com a agressividade, invasão e capacidade de migração da neoplasia (Hayashi et al., 2010; Müller et al., 2013; Park et al., 2011; Song et al., 2005; Wang et al., 2011).

Os inibidores das HDAC (iHDAC), provocam hiperacetilação das histonas com consequente alteração do estado de condensação da cromatina, sendo também responsáveis pela indução de danos no ADN e inibição da sua reparação (Bakkenist & Kastan, 2003; Bolden, Peart, & Johnstone, 2006). Há evidências de que estes fármacos afetam a angiogénese nos tumores e que poderão ser responsáveis por modulação da resposta imunitária (Eckschlager, Pich, Stiborova, & Hrabeta, 2017). Para além disso, parece existir uma maior resistência aos iHDAC por parte das células normais em comparação com as células neoplásicas (Ungerstedt et al., 2005).

De salientar ainda que existe um efeito sinérgico entre alguns iHDAC e outros fármacos convencionais de quimioterapia como a doxorrubicina, dexametasona, docetaxel, paclitaxel e gemcitabina (Catley et al., 2003; Fuino et al., 2003; Kim et al., 2003) e radiação ionizante (Groselj, Sharma, Hamdy, Kerr, & Kiltie, 2013), potenciando assim a ação destes fármacos.

3.3.1. Panobinostat

O panobinostat, de nome comercial Farydak®, é responsável pela inibição de várias deacetilases (Atadja, 2009). Foi aprovado pela FDA e EMA em 2015 para o tratamento de mieloma múltiplo humano em associação com bortezomib e dexametasona (Garnock-Jones, 2015; Tzogani et al., 2018). Esta associação de fármacos proporciona um atraso da progressão do mieloma múltiplo recidivante ou em casos refratários ao tratamento convencional (San-Miguel et al., 2014; Wolf et al., 2012).

Em pacientes humanos, com doença oncológica avançada, o panobinostat foi rapidamente absorvido por via oral, atingindo o pico de concentração por volta das 2 horas e apresentou uma biodisponibilidade de 21%. Apresentou ainda uma ligação às proteínas plasmáticas de cerca de 90%. O composto é metabolizado por redução, hidrólise, oxidação e glucoronidação sendo o metabolismo CYP3A responsável por aproximadamente 40% da sua eliminação a nível hepático. O tempo de semi-vida de eliminação é de aproximadamente 37 horas, sendo cerca de 29-51% da dose administrada excretada na urina e cerca de 44-77% nas fezes (Garnock-Jones, 2015).

A sua administração foi associada à presença de lesões hepáticas - ligeiras a moderadas - sendo recomendada uma monitorização de pacientes com lesões hepáticas e se necessário um ajuste da dose administrada (Slingerland et al., 2014). Por sua vez, a presença de lesões renais em doentes oncológicos não afeta o perfil de segurança do fármaco (Sharma et al., 2015).

Os efeitos adversos associados a este fármaco poderão incluir: diarreia, fadiga, náuseas, edema periférico, inapetência, vômitos, pirécia, arritmias, perda de peso e sinais hematológicos como, trombocitopenia, neutropenia, linfopenia e anemia (San-Miguel et al., 2014).

3.3.2. CI-994

O CI-994, também conhecido por N-acetil-dinalina, é um iHDAC que demonstrou ter grande atividade anti-tumoral *in vitro* em várias linhas celulares tumorais, com maior efeito em tumores sólidos, nomeadamente em modelos tumorais de Murganho como o carcinoma do ducto pancreático quimio-resistente, o carcinoma prostático humano – com células LNCaP (*lymph node carcinoma of the prostate*) (LoRusso et al., 1996) – leucemia mielocítica aguda humana (modelo BNML) (El-Beltagi, Martens, Lelieveld, Haroun, & Hagenbeek, 1993). Observou-se também atividade anti-tumoral significativa num modelo de Murganho de leucemia (*rat Brown Norway Leukemia model*) (Hagenbeek, Weiershausen, & Martens, 1988). O seu exato mecanismo de ação é ainda desconhecido, no entanto parece ser responsável pela modulação na expressão de algumas histonas (Rummel, Kraker, Steinkampf, Hook, & Klohs, 1995).

3.3.3. Ácido hidroxâmico suberoilânilda (SAHA)/vorinostat

O SAHA (ácido hidroxâmico suberoilânilda) ou vorinostat, de nome comercial Zolinza®, é um inibidor de vários tipos de HDAC e tem uma grande atividade citotóxica em diversas linhas celulares e causa a interrupção do ciclo celular em fase G1 e G2 e consequente indução à morte de células tumorais (Marks, 2007; Vrana et al., 1999). Este composto demonstrou atividade anti-tumoral com respostas completas ou parciais em pacientes com neoplasias sólidas e hematológicas refratárias ao tratamento (Kelly et al., 2005).

É um iHDAC aprovado pela FDA em 2006 para o tratamento de linfoma células T cutâneo em pacientes humanos com doença progressiva, persistente ou recorrente (Mann et al., 2007). Foi observada uma resposta positiva ao tratamento de 30% com uma duração média da resposta de 168 dias numa amostra de pacientes com linfoma de células T cutâneo avançado anteriormente submetidos a quimioterapia convencional. Os efeitos secundários dose-limitantes observados foram a toxicidade gastrointestinal – náuseas, vômitos e diarreia – anorexia, desidratação, fadiga e mielosupressão – com trombocitopenia, neutropenia ou leucopenia (Mann et al., 2007). Este composto foi também aprovado pela EMA em 2004, tendo sido posteriormente retirado do mercado na União Europeia em 2009 (EMA, 2009).

O SAHA demonstrou também uma boa atividade anti-tumoral em leucemias agudas e síndromes mielodisplásicas (Garcia-Manero et al., 2007), demonstrou também um efeito de supressão do crescimento de células neoplásicas prostáticas *in vitro* e *in vivo* (Butler et al., 2000).

3.3.4. Ácido bis-hidroxâmico suberoil (SBHA)

O ácido bis-hidroxâmico suberoil, também conhecido por SBHA, demonstrou ter um efeito de indução de apoptose em diversas linhas celulares de melanoma humano, por interferir com HDAC's associadas a fatores transcripcionais envolvidos na regulação da apoptose (Zhang, Gillespie, Borrow, & Hersey, 2004). Este composto demonstrou também atividade anti-tumoral ao induzir apoptose numa linha celular de cancro da mama humano (MCF-7) (Zhuang, Fei, Chen, & Jin, 2008). O seu efeito de supressão na progressão tumoral foi também observado num modelo animal de carcinoma medular da tiroide humano (Ning et al., 2008).

Num estudo realizado em linhas celulares de cancro colo-retal, foi observada uma interação sinérgica entre os fármacos oxaliplatina e SBHA, responsáveis por uma maior inibição do crescimento celular *in vitro* por comparação com os efeitos provocados por cada um dos compostos isoladamente. Este efeito sinérgico poderá estar associado a um aumento do sinal apóptotico, por vias intrínsecas e extrínsecas, por formação de radicais livres de oxigénio (Flis, Gnyszka, & Splawiński, 2009).

3.3.5. Scriptaid

Este composto está descrito como sendo relativamente menos tóxico que os outros iHDAC investigados (Su, Sohn, Ryu, & Kern, 2000). Os efeitos biológicos e terapêuticos do scriptaid foram observados em linhas celulares de cancro ovárico e endometrial humanas, tendo sido registado um aumento da acetilação das histonas 3 e 4 e efeito de inibição do crescimento tumoral *in vitro*. Foi também observada a ativação da via do fator de transdução *transforming growth factor beta* (TGF- β) bem como aumento da transcrição de genes de supressão tumoral humanos como o SMAD4 (Takai, Ueda, Nishida, Nasu, & Narahara, 2006).

Em linhas celulares de cancro da mama humano, que não expressam recetores de estrogénio – característica associada a uma fraca resposta ao tratamento –, foi observada ação sinérgica do Scriptaid com *5-aza 2'-deoxycytidine* que promove a re-expressão de recetores de estrogénios funcionais (Keen et al., 2003).

O Scriptaid demonstrou também atividade anti-tumoral *in vitro* por indução de apoptose em células tumorais de glioma humano (Sharma et al., 2010).

3.3.6. Trichostatin A

O *trichostatin A* foi anteriormente descrito como um antifúngico natural (Tsuji, Kobayashi, Nagashima, Wakisaka, & Koizumi, 1976). Contudo, mais tarde foi observada a associação entre a supressão do crescimento de células tumorais e a inibição das enzimas HDAC provocadas por este composto (Yoshida, Kijima, Akita, & Beppu, 1990).

Este composto é um potente inibidor reversível das HDAC que induz paragem do ciclo celular em G1 e G2/M e que poderá ser responsável pela indução de apoptose (Yoshida et al., 1990).

Demonstrou ser eficaz em células de leucemia linfocítica crónica intervindo na deacetilação das histonas e em outras proteínas não relacionadas com as histonas (Peiffer et al., 2014).

3.3.7. Tubacina

A tubacina é um composto que tem um efeito de inibição da HDAC6 e consequente indução da acetilação da tubulina – um composto principal dos microtúbulos. Num estudo realizado em células de leucemia linfoblástica aguda humana foi observado um maior efeito de inibição da proliferação celular em relação ao observado para células T normais e células precursoras de medula óssea (Aldana-Masangkay et al., 2011).

Há também evidências de que este composto poderá sensibilizar células transformadas (LNCaP e MCF-7) para quimioterápicos convencionais como o etoposido, doxorrubicina e ainda outro fármaco iHDAC – o SAHA (Namdar, Perez, Ngo, & Marks, 2010) e do seu efeito citotóxico sinérgico com bortezomib em linhas celulares de mieloma múltiplo (Hideshima et al., 2005).

4. Oncologia comparada

O uso de modelos animais experimentais tem sido importante para a evolução da oncologia sendo um dos modelos animais mais frequentemente utilizados o Murganho. Três principais tipos de modelos de Murganho poderão ser utilizados para o estudo de neoplasias, a saber: modelos de xenotransplante, modelos transgênicos ou geneticamente modificados e modelos humanizados (Budhu, Wolchok, & Merghoub, 2014).

Os modelos de xenotransplante são obtidos por implantação de células de uma linha celular tumoral humana em murganhos imunodeficientes (O'Brien, Pollett, Gallinger, & Dick, 2007).

Os modelos transgênicos ou geneticamente modificados permitem a expressão de oncogenes e/ou inativação de genes supressores num determinado tipo de tecido (Mallika Singh et al., 2010). Os modelos de Murganho humanizados consistem numa tentativa de reconstituição do sistema imunitário de modelos de xenotransplante de Murganho imunodeficientes com células do sistema imunitário humano (Morton, Bird, Refaeli, & Jimeno, 2016).

Contudo, os modelos anteriormente referidos apresentam algumas limitações, como por exemplo, o facto de não ser possível reproduzir o desenvolvimento espontâneo da neoplasia à semelhança do que ocorre no Homem – cuja etiologia poderá ter na sua origem uma complexa influência poligenética em conjunto com outros fatores ambientais e imunitários (Sundberg & Schofield, 2009; Withrow, Vail, & Page, 2013). Apesar do uso de modelos animais para o estudo de doenças humanas, os conhecimentos de anatomia, fisiologia e farmacologia comparada são imprescindíveis para colmatar as diferenças entre espécies (Sundberg & Schofield, 2009).

O conceito de *One Health*, promove o laço entre Medicina Humana e Medicina Veterinária baseando-se nas relações inerentes à coexistência de pessoas e animais no mesmo ambiente

onde uma abordagem multidisciplinar com vista a um estudo comparado entre espécies animais diferentes poderá ser uma mais-valia, não só para o controlo e prevenção de doenças zoonóticas, mas também para o estudo de doenças de patofisiologia semelhante entre espécies (King et al., 2008).

4.1. O Cão como modelo animal

Os animais de companhia, como o Cão, revelam-se um modelo útil para o estudo de doenças - degenerativas, autoimunes, alérgicas e neoplásicas - que ocorrem de forma espontânea num animal imunocompetente, em contraste com os modelos experimentais animais referidos anteriormente (Withrow et al., 2013).

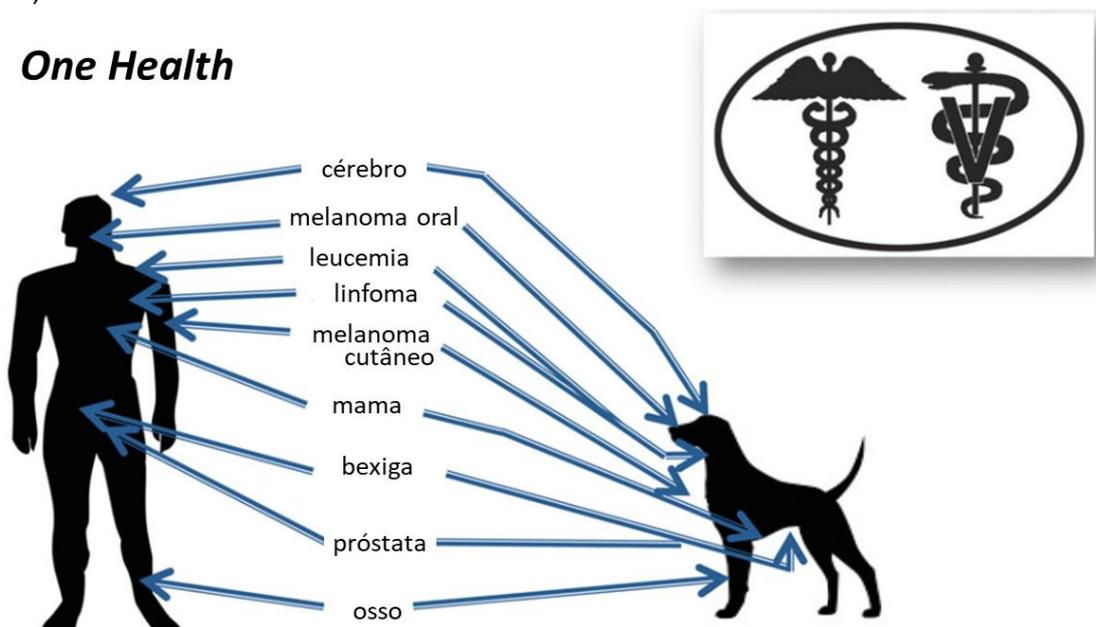
Apresentam ainda outras vantagens como: (a) a semelhança a nível histológico de algumas neoplasias homólogas entre o Cão e o Homem, bem como respostas semelhantes ao tratamento (Vail et al., 2009); (b) serem espécies que coabitam no mesmo ambiente, encontrando-se sujeitos a fatores ambientais comuns (Withrow et al., 2013); (c) a identificação de mutações genómicas que possam estar associadas a doenças de patofisiologia semelhante entre os seres humanos e os cães que facilita a comparação entre duas espécies sobretudo em cães de raça, uma vez que apresentam uma menor heterogeneidade genética resultante da sua seleção artificial e consequente apuramento genético (Aguirre-Hernández et al., 2009; Lindblad-Toh et al., 2005); (d) aceleração na investigação de doenças de evolução lenta ou de aparecimento característico em idades mais avançadas, uma vez que o período de vida e de envelhecimento do Cão é mais curto em relação ao do Homem; (e) ainda assim, o seu período de vida poderá ser longo o suficiente para proporcionar o estudo de fatores que possam ter influência no desenvolvimento de doenças a longo prazo ou de efeitos secundários à terapia com aparecimento tardio (Withrow et al., 2013).

O uso de modelos animais permite a avaliação preliminar da farmacocinética, eficácia e toxicidade em estudos pré-clínicos de fármacos terapêuticos (Arap, Pasqualini, & Ruoslahti, 1998; Attardi & Jacks, 1999; Dykes et al., 1992; Rehemtulla et al., 2000) uma vez que os resultados de estudos *in vitro* poderão ser diferentes dos resultados de estudos *in vivo* (Teicher et al., 1990). A introdução de animais de companhia, com neoplasias espontâneas, em ensaios clínicos poderá permitir resultados diferentes em relação aos obtidos em testes com outros modelos animais e permite-lhes também beneficiar de tratamentos de alta qualidade e proporcionar, de forma ética, um avanço nas conclusões retiradas por translação para os ensaios clínicos posteriores em pessoas (Khanna et al., 2006; Sundberg & Schofield, 2009).

No âmbito da oncologia existem alguns exemplos de neoplasias com semelhanças a nível histológico, genético, da sua evolução e resposta ao tratamento, entre o Homem e o Cão como: as neoplasias hematológicas (Breen & Modiano, 2008), o osteossarcoma (Paoloni et al., 2009), o melanoma (Simpson et al., 2014), o carcinoma prostático (LeRoy & Northrup,

2009), o cancro da cabeça e pescoço (Liu et al., 2015), o adenocarcinoma mamário (Martin, Cotard, Mialot, André, & Raynaud, 1984) o sarcoma de tecidos moles (Aguirre-Hernández et al., 2009) e o glioblastoma (Candolfi et al., 2007) (figura 3).

Figura 3 – O Cão como modelo de estudo em oncologia (adaptado de Schiffman & Breen, 2015).



Legenda: Neoplasias com patogenias semelhantes entre o Homem e o Cão: neoplasias cerebrais, melanoma oral, leucemia, linfoma, melanoma cutâneo, neoplasias da mama, bexiga, próstata e osteossarcoma.

4.1.1. Linfoma Canino

O linfoma maligno é um grupo diverso de neoplasias com origem nas células linforreticulares que surge mais frequentemente em tecidos linfoides como os linfonodos, baço e medula óssea, mas também poderá surgir em qualquer outro tipo de tecido. No Cão é uma das neoplasias mais diagnosticadas (Vail, Pinkerton, & Young, 2013).

A sua classificação pode ser feita de acordo com características histológicas, imunofenotípicas e anatómicas. Do ponto de vista anatómico as formas mais comuns no Cão são: a multicêntrica, a gastrointestinal, a mediastinal e a forma cutânea, sendo que 84% dos cães com linfoma desenvolvem a forma multicêntrica (Vail et al., 2013).

O linfoma canino apresenta muitas semelhanças, na sua patofisiologia, com o linfoma não-*Hodgkin* humano e como tal, têm sido adaptados da Medicina Humana vários sistemas para a classificação do linfoma canino como, por exemplo, o sistema da *World Health Organization* (WHO) baseado no *revised European American Lymphoma* (REAL), a *Working Formulation* (WF) e a classificação *Kiel* atualizada (Vail et al., 2013). O sistema de classificação publicado pela WHO define as características histológicas de tumores hematopoiéticos e linfoides e incorpora critérios anatómicos, histológicos e imunofenotípicos para que seja feito um

diagnóstico preciso e reproduzível em relação a diferentes tipos de linfoma. A sua aplicação aos animais domésticos tem sido alvo de estudo, com sucesso (Vail et al., 2013; Valli et al., 2011). A WF foi desenvolvida com o objetivo de facilitar a comparação entre o linfoma não-*Hodgkin* e o linfoma canino em ensaios clínicos. Este sistema classifica os linfomas de acordo com o padrão – folicular ou difuso – e o tipo de células, no entanto, não inclui o imunofenótipo do tumor (Rosenberg, 1982; Vail et al., 2013).

Tal como no Homem, o grupo de linfomas difusos de células tipo B (DLBCL – *diffuse large B-cell lymphomas*) está documentado como sendo um subtipo de neoplasias linfoides mais comuns no Cão (Ponce et al., 2010). No entanto, existe uma grande variação na prevalência do imunofenótipo entre raças (Ponce et al., 2010). Um estudo realizado em três tipos de neoplasias hematológicas morfológicamente semelhantes às humanas – linfoma *Burkitt* esporádico, leucemia mieloide crónica e leucemia linfocítica crónica – demonstrou haver semelhanças a nível citogenético associado entre o Cão e o Homem (Breen & Modiano, 2008).

4.1.1.1. Tratamento

A quimioterapia é a abordagem mais eficaz para o tratamento do linfoma canino, uma vez que se trata de uma neoplasia sistémica (Vail, 2010).

Os compostos quimioterápicos mais eficazes e disponíveis, em Medicina Veterinária para o tratamento de linfoma canino são a doxorrubicina (Keller, MacEwen, Rosenthal, Helfand, & Fox, 1993), a L-asparaginase (MacEwen, Rosenthal, Fox, Loar, & Kurzman, 1992), a vincristina, a ciclofosfamida e a prednisona (Boyce & Kitchell, 2000) que frequentemente estão presentes em protocolos de primeira-linha de associação de múltiplos fármacos (Vail et al., 2013). Como fármacos de segunda linha surgem exemplos como a lomustina (Moore et al., 1999), a actinomicina-D (Siedlecki et al., 2006), a vimblastina, a mitoxantrona, o clorambucil, o metotrexato e a dacarbazina (Chun, Garrett, & Vail, 2000).

Dos vários protocolos de quimioterapia existentes, muitos resultam de modificações de um protocolo inicialmente desenhado para medicina humana com a combinação dos seguintes fármacos: ciclofosfamida, hidroxildaunorrubicina (ou doxorrubicina), vincristina (Oncovin®), e prednisona – (protocolo CHOP) (Fisher et al., 1993; Vail et al., 2013).

A taxa de remissão do linfoma, em cães, encontra-se entre os 80-90% com grandes melhorias na qualidade de vida durante o tratamento. No entanto, na maioria dos casos a remissão é seguida de recidiva devido a resistências adquiridas aos quimioterápicos (Vail, 2010). A quimioterapia apresenta uma maior taxa de resposta em tumores de células B e de grau intermédio a alto (Vail et al., 2013), e menor taxa de resposta em linfomas de baixo grau, no entanto, o tempo de sobrevivência sem tratamento é maior. No linfoma não-*Hodgkin* humano (LNHh) observou-se que uma parte do insucesso dos protocolos convencionais se deve também a resistências adquiridas aos fármacos (Lwin et al., 2010). O envolvimento da glicoproteína-P como mecanismo de resistência ao tratamento do linfoma está documentado

tanto no LNHH como no linfoma canino (Lee et al., 1996; Rodriguez, Commes, Robert, & Rossi, 1993; Zandvliet, Teske, & Schrickx, 2014).

4.1.2 Gliomas

Os gliomas são um grupo de tumores que incluem os astrocitomas, oligodendromas e glioblastomas multiformes. Estes tumores são considerados malignos devido ao característico crescimento expansivo e infiltrativo, em relação a tecidos vizinhos (Scherer, 1940) e à resistência a todas as formas de tratamento (McEntee & Dewey, 2013).

As neoplasias cerebrais primárias ocorrem sobretudo em cães idosos e as raças mais predispostas são o *Boxer* e *Golden Retriever* (Snyder, Shofer, Winkle, & Massicotte, 2006). Os gliomas são os segundos tipos de tumores cerebrais que ocorrem mais frequentemente em cães, a seguir aos meningiomas (McEntee & Dewey, 2013). Têm maior tendência a desenvolverem-se no diencéfalo e cerebelo sendo que em muitos casos ocupam mais do que uma área anatómica do cérebro (Snyder et al., 2006).

O sistema de classificação da WHO, para os gliomas humanos, agrupa-os em 4 graus histológicos segundo grau de indiferenciação, anaplasia e agressividade. Assim, os gliomas de grau II, como astrocitomas difusos, oligodendrogliomas e oligoastrocitomas, são neoplasias cujas células apresentam maior diferenciação; classificados como grau III surgem os astrócitos anaplásicos, oligodendroglioma e oligoastrocitoma; já o glioblastoma surge classificado como neoplasia de grau IV. Um pior prognóstico está associado a tumores de grau mais elevado (Louis et al., 2007).

No Homem, o glioblastoma é um dos tipos de tumores cerebrais primários mais frequente em adultos. Este tipo de neoplasia cerebral é agressiva sendo o seu período de sobrevivência de 6-12 meses após o diagnóstico (Surawicz, Davis, Freels, Laws, & Menck, 1998). Trata-se de neoplasias altamente proliferativas, invasivas, imunossupressoras e muito vascularizadas (Platten, Wick, & Weller, 2001).

A existência de semelhanças neuropatológicas entre o glioblastoma canino e o humano (Lipsitz et al., 2003) torna-o um bom modelo para a avaliação de novas terapias (Candolfi et al., 2007).

4.1.2.1. Tratamento

O tratamento de gliomas humanos passa pela ressecção cirúrgica sempre que possível, com o objetivo de citorredução, alívio do efeito de massa – para alívio da pressão intracraniana – e para caracterização histológica e molecular da neoplasia, sendo também recomendada em casos de suspeita de glioma de baixo grau (Jakola et al., 2012). Em tumores inoperáveis, é recomendada a biópsia estereotáxica para diagnóstico histológico (Omuro & DeAngelis, 2013). A quimioterapia em associação com a radioterapia está também aconselhada. Um dos fármacos quimioterápicos de primeira linha utilizado é a temozolomida, um composto

alquilante (Hegi et al., 2005). A associação de temozolomida com radioterapia demonstrou um aumento do tempo de sobrevivência e uma toxicidade adicional mínima estatisticamente significativos (Stupp et al., 2005). Para casos de recidiva, os quimioterápicos a incluir no tratamento poderão ser o bevacizumab (anticorpo monoclonal com alvo na angiogénese) (Chamberlain, 2008), a temozolomida, a lomustina e a carboplatina (Batchelor et al., 2013; Omuro & DeAngelis, 2013).

Para o tratamento de gliomas em cães, a cirurgia raramente é uma opção terapêutica devido ao carácter infiltrativo destas neoplasias (McEntee & Dewey, 2013). A radioterapia poderá ser aplicada como terapia primária (McEntee & Dewey, 2013; Spugnini et al., 2000). Como fármacos quimioterápicos têm sido utilizados: a lomustina, a carmustina e a hidroxiureia, no entanto, há ainda pouca evidência da eficácia dos mesmos (M. C. McEntee & Dewey, 2013). Apesar das estratégias terapêuticas acima descritas, o glioblastoma humano apresenta uma mediana de sobrevivência de 14,6 meses, sendo que menos de 5% dos pacientes humanos tratados sobrevive para além dos 5 anos após o diagnóstico (Hou, Veeravagu, Hsu, & Tse, 2006). O insucesso terapêutico deve-se principalmente à reseção incompleta da massa, uma vez que são tumores de natureza infiltrativa e agressiva; à limitação da chegada do fármaco ao local através da BHE e à recorrência da doença devido à resistência a terapia (van Tellingen et al., 2015). Neste caso, a nanomedicina poderá oferecer vantagem relativamente à terapias convencionais uma vez que poderá possibilitar a passagem do fármaco através da BHE, mediada por recetor permitindo a acumulação de uma maior concentração de fármaco no local (Gulyaev et al., 1999; Koukourakis et al., 2000).

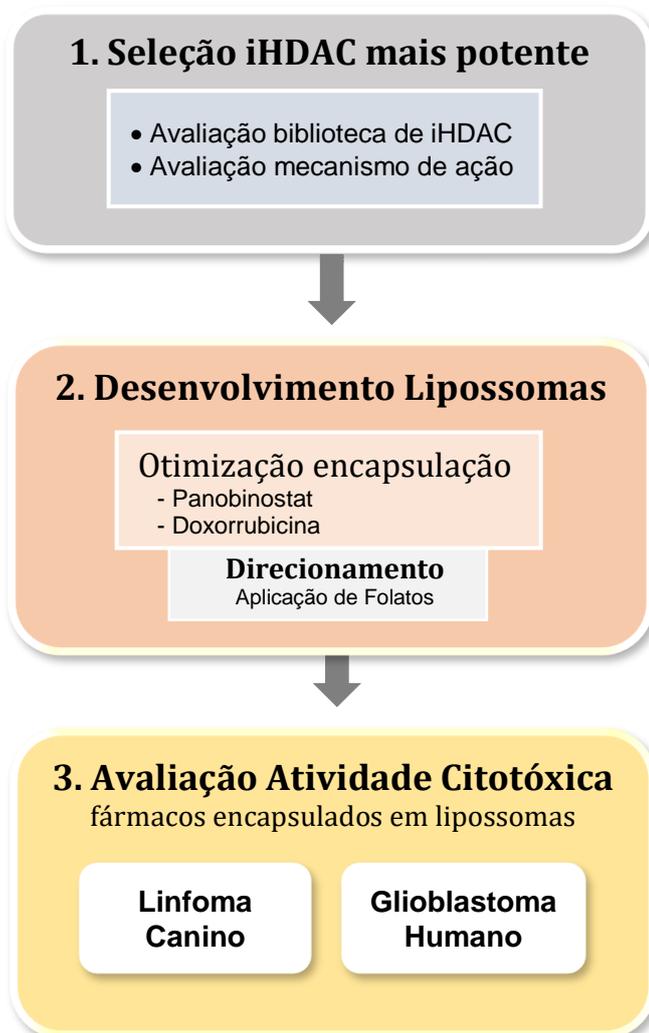
CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS ENCAPSULADOS COM CITOTÓXICOS DE ELEVADA POTÊNCIA PARA IMUNOTERAPIA

OBJETIVOS

Os lipossomas – sendo nanopartículas capazes de transportar moléculas no seu interior – podem ser utilizados para o transporte de fármacos com grande atividade citotóxica em células neoplásicas, permitindo aumentar a sua eficácia e reduzir os efeitos secundários. Assim, esta dissertação de mestrado teve como objetivo principal o desenvolvimento e otimização de lipossomas para encapsulação de fármacos citotóxicos de elevada atividade, como os iHDAC, e avaliação dos seus efeitos citotóxicos *in vitro*.

O desenho experimental dividiu-se em três fases, cada uma das quais com um objetivo específico: (1º) seleção de um fármaco iHDAC de elevada atividade citotóxica; (2º) desenvolvimento de lipossomas com o fármaco selecionado; (3º) avaliação dos efeitos citotóxicos do fármaco encapsulado nas linhas celulares de linfoma canino e de glioblastoma humano (figura 4).

Figura 4 – Esquema representativo do desenho experimental.



DESENHO EXPERIMENTAL

Inicialmente, foram avaliados os efeitos citotóxicos de sete fármacos iHDAC em duas linhas celulares de linfoma canino (CLBL-1 e 17-71) para identificação e seleção do fármaco mais citotóxico do painel testado. O trabalho laboratorial nesta fase consistiu na realização de ensaios de citotoxicidade na linha celular 17-71 e comparação com os resultados anteriormente obtidos em CLBL-1, pelo grupo de investigação (Dias et al., 2018), para validação dos efeitos do painel de iHDAC em linfoma canino. O efeito de acetilação da histona 3 (H3) induzido pelos sete iHDAC foi também avaliado na linha celular 17-71, através de *western blot*.

Numa segunda fase, foram desenvolvidos lipossomas para encapsulação do fármaco iHDAC mais eficaz e de um fármaco quimioterápico convencional – a doxorubicina. Para um direcionamento mais específico destas nanopartículas, foram posteriormente desenvolvidos lipossomas com folatos associados.

Por último, a atividade citotóxica dos lipossomas com o iHDAC selecionado e a doxorubicina foi avaliada em linhas celulares de linfoma canino e de glioblastoma humano. A influência da associação de folatos aos lipossomas, como forma de direcionamento específico para as células neoplásicas, foi também avaliada a diferentes tempos de exposição.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Linhas celulares

As duas linhas celulares de linfoma canino de células B utilizadas foram: CLBL-1 gentilmente cedida pela Doutora Bárbara Rütgen (Rütgen et al., 2010, 2012), e pelo Dr. Steven Suter a 17-71 (Steplewski, Jeglum, Rosales, & Weintraub, 1987) (*College of Veterinary Medicine, NC State, Raleigh, North Carolina, USA*). As células foram mantidas em cultura com meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI – 1640, da Gibco) suplementado com 10% de soro fetal de bovino previamente inativado por calor (*fetal bovine serum* – FBS) (Gibco), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (0,1 mg/mL) (Gibco) em frascos de cultura T75 (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria).

A linha celular aderente de glioblastoma humano (U87) (U-87 MG ATCC® HTB-14™) (Villa & Mischel, 2015) também utilizada, foi mantida em cultura em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Lonza) suplementado com penicilina (100 U/mL), estreptomicina (0,1mg/mL), com 10% de FBS. As linhas celulares de linfoma canino e glioblastoma humano foram mantidas em estufa à temperatura de 37°C em ambiente humedecido com 5% de dióxido de carbono (CO₂).

2. Fármacos

2.1. Fármacos citotóxicos

Os fármacos utilizados nos ensaios de citotoxicidade foram o painel de iHDAC - CI-994, SAHA, SBHA, scriptaid, *trichostatin A*, tubacina e panobinostat - obtidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Cat # EPI009) e a doxorubicina (Sigma-Aldrich). Para uma melhor conservação dos fármacos iHDAC, foram preparadas soluções de armazenamento a uma concentração de 5mg/mL para o panabinostat, SAHA, scriptaid e *trichostatin A*, de 10mg/mL para CI-994, de 50mg/mL para SBHA e de 250µg/mL de tubacina usando como solvente o dimetilsulfóxido (DMSO). Estas soluções foram posteriormente criopreservadas a -20°C.

2.2. Encapsulação dos fármacos citotóxicos em lipossomas

Os fármacos encapsulados em lipossomas – iHDAC selecionado em lipossoma PEG, em lipossoma com folatos associados ao PEG, doxorubicina encapsulada em lipossoma com PEG, doxorubicina em lipossoma com folatos associados ao PEG e respetivos lipossomas vazios foram desenvolvidos pela Doutora Maria Manuela Gaspar – investigadora auxiliar no Departamento de Tecnologia Farmacêutica e Farmácia Galénica, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa – em colaboração com o presente projeto. Foram testados dois lotes sintetizados em dias diferentes. As informações relativas à composição lipídica dos lipossomas encontram-se representadas na tabela 5.

Tabela 5 – Composição lipídica dos lipossomas.

	Composição lipídica	Rácio Molar
Lipossoma PEG¹	DPPC ³ :Chol ⁴ :DSPE-PEG ⁵	1.85:1.0:15
Lipossoma PEG+Folato²	DPPC:Chol:DSPE-PEG:DSPE-PEG-Folato	1.85:1.0:12:0.03

¹ – Lipossoma com polietilenoglicol

² – Lipossoma com polietilenoglicol e folatos

³ – Dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC)

⁴ – Colesterol (Chol)

⁵ – polietilenoglicol ligado covalentemente a diestearoil fosfatidil etanolamina (DSPE-PEG)

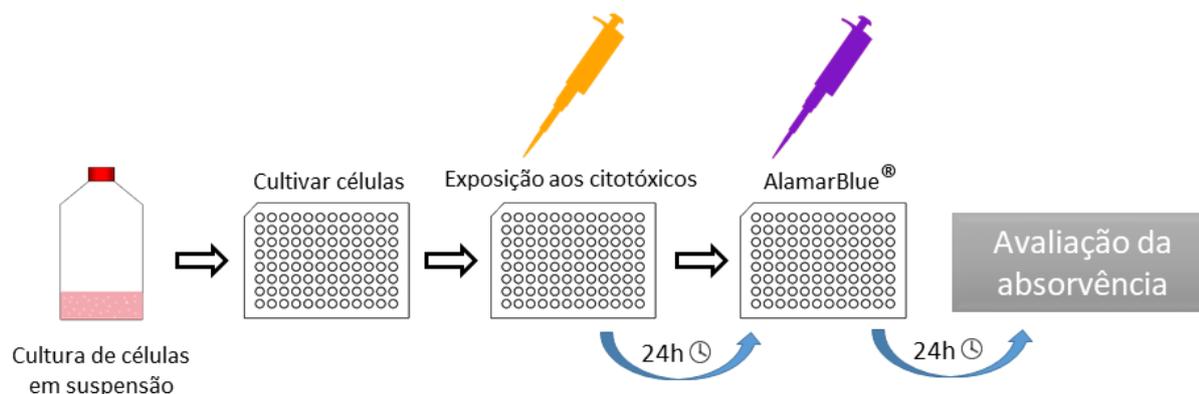
3. Ensaio de citotoxicidade

3.1. Avaliação da citotoxicidade em células em suspensão

3.1.1. Painel de iHDAC

Este ensaio de citotoxicidade, realizado na linha celular 17-71, teve como objetivo a comparação com resultados anteriormente obtidos pelo grupo de investigação noutra linha celular de linfoma canino, CLBL-1 (Dias et al., 2018) para validação dos efeitos do painel de iHDAC em linfoma canino. O protocolo aplicado para este ensaio (figura 5) foi previamente otimizado por Dias et al. (2018).

Figura 5 – Representação esquemática dos procedimentos dos ensaios citotóxicos realizados em células de suspensão, (original da autora).



Legenda:

- Frasco T75 para cultura de células em suspensão

- Tratamento das células com os fármacos citotóxicos

- Período de incubação

- Introdução do reagente *AlamarBlue*®

Numa placa de 96 poços, foram semeadas cerca de 6×10^4 células de 17-71 por poço com 100µL de meio RPMI suplementado com 10% de FBS. A viabilidade celular, foi avaliada usando o corante azul tripano, realizando-se a contagem das células vivas não coradas no hemocítmetro (câmara de *Neubauer*) e das células mortas coradas.

De seguida, as suspensões celulares foram tratadas com os fármacos iHDAC – segundo um gradiente de concentrações crescente entre 195 nanomolar (nM) e 20000nM com uma diluição de 1:2 entre cada – e incubadas por 24 horas a uma temperatura de 37°C e ambiente com 5% de CO₂, humedecido. As células controlo foram tratadas com uma solução de meio RPMI.

Para avaliar os efeitos dos fármacos na proliferação celular na linha 17-71, foram realizados ensaios de viabilidade celular com o reagente *AlamarBlue® Cell Viability Reagent* (Roche) 24h após a exposição ao fármaco. O *AlamarBlue®* é um reagente que deteta as células metabolicamente ativas e permite a quantificação da proliferação celular de acordo com o ambiente mais, ou menos, redutor do citosol das células vivas e mortas respetivamente. Este reagente tem como substrato a resazurina que não é tóxica para as células e tem a capacidade de penetrar na célula. A resazurina tem uma cor azul, não fluorescente, e ao penetrar nas células vivas é reduzida a resorufina que tem a cor vermelha e emite fluorescência. Deste modo, quanto maior o número de células vivas, maior será a quantidade de resazurina reduzida a resorufina provocando uma alteração da cor azul inicial do *AlamarBlue®* para vermelho. Para posterior cálculo da viabilidade celular, foram lidos os valores de absorvência de cada poço no espectrofotómetro de varrimento (SpectraMAX 340pc). As leituras foram realizadas nos comprimentos de onda de 570nm e 600nm, após 24 horas de incubação com o reagente, para maior sensibilidade do mesmo, de acordo com as instruções do fabricante. O cálculo da percentagem de células viáveis foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (equação 1).

Equação 1 – Fórmula para o cálculo da % de viabilidade celular; consiste na percentagem da diferença entre células tratadas e as células de controlo não tratadas para ensaios de citotoxicidade.

$$\frac{(\epsilon_{OX})\lambda_2 A \lambda_1 - (\epsilon_{OX})\lambda_1 A \lambda_2}{(\epsilon_{OX})\lambda_1 A^\circ \lambda_2 - (\epsilon_{OX})\lambda_2 A^\circ \lambda_1} \times 100$$

Legenda:

C_{OX} = Concentração de *AlamarBlue®* na forma oxidada

ε_{OX} = Coeficiente de extinção molar de *AlamarBlue®* na forma oxidada

A = Absorvência dos poços do teste

A° = Absorvência dos poços de controlo positivo de crescimento celular.

λ₁ = 570nm

λ₂ = 600nm

Para cálculo da concentração inibitória 50 (IC₅₀) de cada fármaco, os valores da viabilidade celular calculados em percentagem (%) em cada poço, foram representados graficamente *versus* a concentração de fármacos testados. O valor de IC₅₀ foi calculado utilizando uma equação logarítmica com o auxílio do programa *GraphPad Prism 6*, versão 6.01 (2012).

3.1.2. Avaliação da citotoxicidade do iHDAC selecionado e da doxorrubicina – forma livre e encapsulados em lipossomas

Para estes ensaios, foi selecionada a linha celular de linfoma canino CLBL-1. O protocolo inicial decorreu conforme descrito no ponto anterior.

Foram semeadas cerca de 6×10^4 células, a uma viabilidade de 90%, por poço numa placa de 96 poços, em 100µL de meio RPMI suplementado com 10% de FBS. Os fármacos citotóxicos foram introduzidos em cada poço segundo um gradiente de concentrações crescente entre 1,6nM e 1680nM para o iHDAC selecionado em forma livre e encapsulado em lipossomas, e entre 78nM e 50000nM para a doxorrubicina em forma livre e encapsulada em lipossomas. As diferentes concentrações, foram obtidas por uma diluição de 1:2 entre cada. A avaliação dos efeitos citotóxicos foi realizada de acordo com o mencionado no ponto anterior.

3.1.2.1. Avaliação da citotoxicidade em função do tempo de exposição

Este ensaio foi realizado com o propósito de avaliar os efeitos citotóxicos dos fármacos encapsulados em lipossomas com folatos associados, em diferentes momentos temporais de exposição.

O protocolo para este ensaio é idêntico aos anteriores, no entanto, os fármacos utilizados foram o iHDAC em formulação livre, em lipossoma com PEG e em lipossoma com folatos associados ao PEG (PLFo) e ainda dois controlos negativos com lipossomas com PEG vazios e lipossomas com folatos associados ao PEG igualmente vazios. Foram realizados três tempos de exposição – 3 horas, 6 horas e 24 horas – com os fármacos. Ao final de cada tempo de exposição, cada placa foi centrifugada a 400g durante 10 minutos para posterior remoção da solução com os fármacos. De seguida introduziu-se o mesmo volume, anteriormente removido, de reagente *AlamarBlue*® diluído a 10% em RPMI (20µL de *AlamarBlue* em 190µL de meio). Os restantes passos para determinação da viabilidade celular foram realizados de acordo com o protocolo descrito no ponto 3.1.1.

3.2. Ensaio de citotoxicidade em células aderentes – otimização do protocolo experimental

Uma vez que ainda não tinham sido realizados ensaios de citotoxicidade na linha celular U87 foi necessário otimizar algumas condições do procedimento experimental tais como o número de células a semear por poço e o tempo de incubação dos fármacos citotóxicos.

Para otimização do número de células foram realizados três ensaios com diferentes números de células por poço: 2×10^3 , 5×10^3 e 6×10^4 em placas de 96 poços. As células foram semeadas em 200 μ L de meio DMEM por poço e posteriormente incubadas em estufa de CO₂ durante 24h. De seguida substituiu-se o meio de cultura das células por meio DMEM com as diferentes concentrações dos diferentes fármacos – doxorrubicina, iHDAC em forma livre, encapsulado em lipossomas com PEG e PLFo. Foram aplicadas concentrações crescentes entre 0,1 μ M e 100 μ M para a doxorrubicina e entre 0,1 μ M e 25 μ M para o iHDAC livre e respetivas formulações lipossomais, com uma diluição de 1:2 entre cada. Após 72h de tratamento, removeu-se o meio com as diferentes concentrações dos fármacos e adicionou-se 200 μ L de meio DMEM com 10% de *AlamarBlue*® e procedeu-se à incubação das células durante 24h. Os passos seguintes foram executados conforme anteriormente descrito para os ensaios de citotoxicidade em células de suspensão.

De modo a otimizar a duração do tratamento, os ensaios foram iniciados conforme descrito no parágrafo anterior, com 5×10^3 células semeadas por poço. Os dois períodos de tratamento das células avaliados foram de 24 horas e 72 horas. Os passos seguintes para determinação da viabilidade celular decorreram também conforme descrito anteriormente nos ensaios de citotoxicidade de células em suspensão.

4. Avaliação da indução de acetilação da Histona 3 pelos iHDAC

4.1. Preparação das amostras

Neste ensaio, as células da linha 17-71 foram colocadas numa placa de 96 poços e tratadas, segundo o protocolo anteriormente descrito no ponto 3.1.1. com os fármacos iHDAC – CI-994, panobinostat, SAHA, SBHA, scriptaid, *trichostatin A* e tubacina – a uma concentração de 20 μ M e, para o controlo negativo, com meio RPMI. Após o tratamento, as células foram colhidas para microtubos de centrifugação, centrifugadas a 400g durante 10 minutos e lavadas com PBS (1mL cada microtubo); repetindo duas vezes este processo de lavagem.

4.2. Extração de proteína

Após a lavagem, as células foram lisadas com 50 μ L de *radio immunoprecipitation assay buffer* (RIPA *buffer*) (25mM TrisHCL pH 7.6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodiumdeoxycholate, 0.1% SDS) suplementado com *cocktail* de protease inibidora (Roche), para extração da proteína total, e incubadas, em gelo, a cerca de 4°C por 30 minutos. Após centrifugação a 13000g durante 15 minutos a 4°C, recolheu-se o sobrenadante que foi criopreservado a -20°C.

4.3. Quantificação de proteína

A quantificação da proteína extraída foi realizada através do método de *Bradford* adaptado (Walker & Kruger, 2002). Resumidamente, foram adicionados 2µL de amostra ao reagente *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, USA) previamente diluído a 1:4 (em PBS) e incubou-se por 5 minutos ao abrigo da luz. A leitura da fluorescência foi feita no espectrofotómetro FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH) a uma excitação de 600nm e emissão de 620nm. Foram obtidas as concentrações de cada amostra pelo método de *Bradford*.

4.4. SDS-PAGE

Para a separação do extrato de proteína total foi realizado um SDS-PAGE 15%. As amostras foram preparadas atendendo à concentração obtida pelo método de *Bradford* adaptado, para cada amostra, de modo a obter 15µg de proteína por poço do gel, numa solução de amostra e PBS até perfazer um volume de 15µL. A cada amostra, juntou-se 5µL de *loading buffer* antes de serem aquecidos a 100°C durante 5 minutos. Os 9 poços do gel foram carregados com cerca de 20µL da amostra anteriormente preparada e 6µL de marcador para corrida com a duração de cerca de uma hora, a 180volts.

4.5. Western blot

A transferência para membrana de nitrocelulose, foi feita a 250 miliamperes (mA) a cerca de 4°C, durante 60 minutos. Após transferência, as membranas foram bloqueadas com leite a 5% (em PBS1x/Tween 20 0,20%) durante a noite. No dia seguinte, prosseguiu-se à lavagem das membranas 3 vezes com PBS para posterior incubação das mesmas com os seguintes anticorpos primários: anti-acetil-histona H3 (Lys9, Lys14) (anticorpo policlonal de coelho, a uma diluição de 1:2500 em leite a 1%, ThermoScientific) numa das membranas e anti-histona H3 (anticorpo policlonal de coelho, a diluição de 1:2000 em leite a 1%, ThermoScientific) noutra, durante uma hora à temperatura ambiente. Por último, após a lavagem para remoção dos anticorpos anteriormente referidos, incubaram-se as membranas com o anticorpo secundário IgG anti-coelho Peroxidase-AffiniPure (anticorpo policlonal de cabra, Jackson ImmunoResearch, a uma diluição de 1:10000 em leite a 1%) em ambas as membranas, durante uma hora à temperatura ambiente. Efectuou-se a revelação das proteínas por quimioluminescência com *Luminata Forte Western HRP* (da Merck Milipore), após a lavagem das membranas com PBS1x/Tween 20 (0,20%) e, posteriormente, a sua deteção através do ChemiDoc XRS + sistema de imagem (Bio-rad).

5. Análise estatística

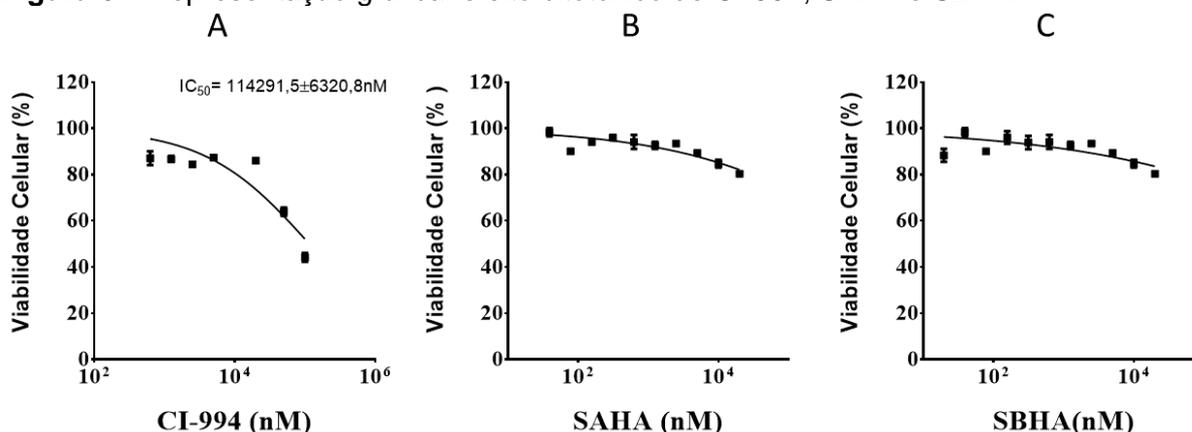
Para cada fármaco realizaram-se pelo menos 3 ensaios independentes em poços duplicados. A análise estatística dos ensaios de citotoxicidade foi efetuada através do software R versão 3.5.0. (2018) e da interface gráfica Rcmdr (Rcommander). A distribuição normal das variáveis foi confirmada pelo teste Shapiro-Wilk. Foram realizados testes de estatística descritiva para as variáveis em estudo que eram quantitativas contínuas. Após transformação dos dados para a escala logarítmica, foi aplicado um teste paramétrico para análise da variância (*ANOVA – analysis of variance*), uma vez que se tratam de variáveis quantitativas independentes e que era pretendido a análise entre mais do que duas variáveis. Por último, como complemento à *ANOVA*, foi realizado o teste de *Tukey* para identificação das médias que diferem significativamente entre si, tomadas duas a duas. O intervalo de confiança para os testes estatísticos foi de 95%, tendo sido considerado significativo um valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Avaliação do efeito citotóxico dos iHDAC na linha celular 17-71

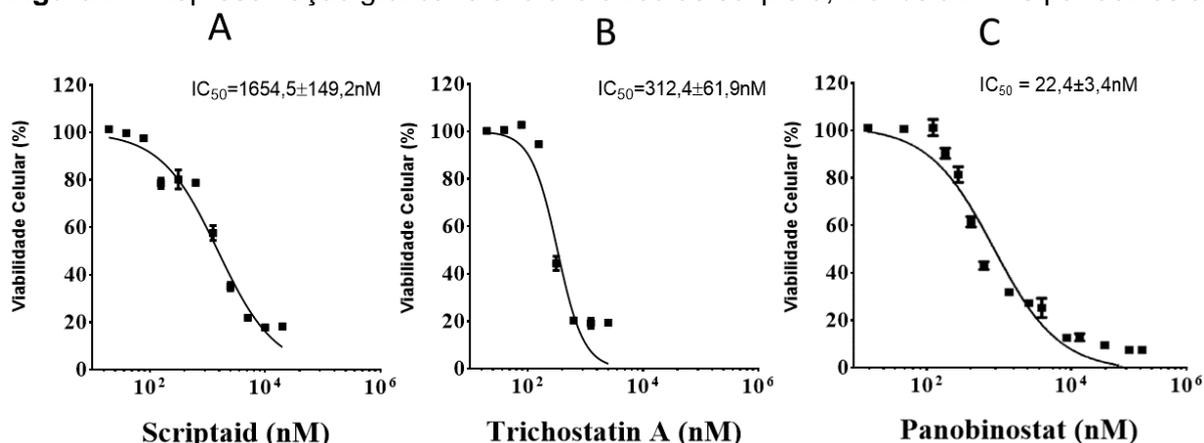
Para avaliação do potencial efeito citotóxico dos iHDAC numa linha celular de Linfoma Canino – 17-71 – foi testada uma biblioteca composta por sete fármacos: CI-994, SAHA, SBHA, scriptaid, panobinostat, *trichostatin A* e tubacina. A linha celular 17-71 de Linfoma Canino foi selecionada para a comparação e validação de resultados anteriormente obtidos e publicados pelo grupo de investigação noutra linha celular de Linfoma Canino bem caracterizada, a CLBL-1 (Dias et al., 2018). Para a tubacina, não foi possível obter uma concentração suficientemente alta para poder ser realizado o ensaio de citotoxicidade na linha 17-71 tendo sido apenas possível realizar a análise *western blot*. Por este motivo, não estão representados os resultados dos ensaios de citotoxicidade relativos a este fármaco nas duas linhas celulares. De acordo com os resultados obtidos (figuras 6 e 7), todos os compostos apresentados demonstraram uma inibição dose-dependente sobre a proliferação celular das 17-71, em contraste com os valores obtidos nas células de controlo negativo – tratadas apenas com meio de cultura – nas quais não foram observados efeitos da inibição da proliferação celular.

Figura 6 – Representação gráfica: efeito citotóxico de CI-994, SAHA e SBHA.



Legenda: (A) CI-991, (B) SAHA e (C): SBHA; Para SAHA e SBHA, não possível obter uma tendência logarítmica o que impossibilitou, por sua vez, o cálculo dos respetivos IC₅₀.

Figura 7 – Representação gráfica: efeito citotóxico de scriptaid, *trichostatin A* e panobinostat.



Legenda: (A) scriptaid, (B) *trichostatin A* e (C) panobinostat.

A resposta das células aos iHDAC foi semelhante nas duas linhas celulares (tabela 6). Os fármacos com maior efeito citotóxico observado foram, em ambas as linhas celulares: o panobinostat, *trichostatin A* e o scriptaid. Pela tabela 6, pode constatar-se que o panobinostat é o fármaco que apresenta um menor IC₅₀ o que corresponde a um maior efeito de citotoxicidade em ambas as linhas celulares comparativamente aos restantes fármacos avaliados.

Tabela 6 – Valores dos IC₅₀ (em nM) obtidos nas duas linhas celulares de linfoma canino (17-71 e CLBL-1).

Linhas Celulares de Linfoma Canino		
IC ₅₀ (nM)		
iHDAC	17-71	CLBL-1
CI-994	114291,5 ± 6320,8	2434,0 ± 36,1
SAHA	N.C. ¹	1780,0 ± 19,1
SBHA	N.C. ¹	1049,0 ± 43,8
Scriptaid	1654,5 ± 149,2	218,0 ± 8,4
Panobinostat	22,4 ± 3,4	5,4 ± 0,5
<i>Trichostatin A</i>	312,4 ± 61,9	67,0 ± 7,5

¹ – N.C.: valor não calculável

Quanto aos três fármacos com maior efeito citotóxico observado, os valores de IC₅₀ obtidos na linha 17-71, revelam-se mais altos que os valores de IC₅₀ obtidos em CLBL-1 – ou seja, 7,6 vezes para o scriptaid, 4 vezes para o panobinostat e de 5 vezes para *trichostatin A* (tabela 6 e figura 7). Estas variações nos resultados poderão dever-se à presença de subpopulações celulares, diferentes das células de linfoma canino, que poderão ter diferentes sensibilidades aos fármacos aplicados nos ensaios realizados. Um estudo anterior detetou uma subpopulação de células estaminais – de cerca de 4,07% – na linha celular de linfoma canino 17-71, que sobressintem um transportador ABC responsável por resistência a múltiplos fármacos. No entanto, devido a aspetos metodológicos não foi confirmada tal suposição (Kim, D'Costa, Suter, & Kim, 2013).

O efeito citotóxico dos iHDAC foi avaliado e observado em diversas linhas celulares tumorais, incluindo linhas celulares de tumores hematopoiéticos (Chun, 2015). Posto isto, rapidamente se seguiram investigações *in vitro* e *in vivo* tendo em vista a aprovação destes compostos como fármacos terapêuticos oncológicos. Alguns iHDAC foram já aprovados pela FDA, como exemplos: SAHA/vorinostat para o tratamento de linfoma cutâneo de células T (Lee et al.,

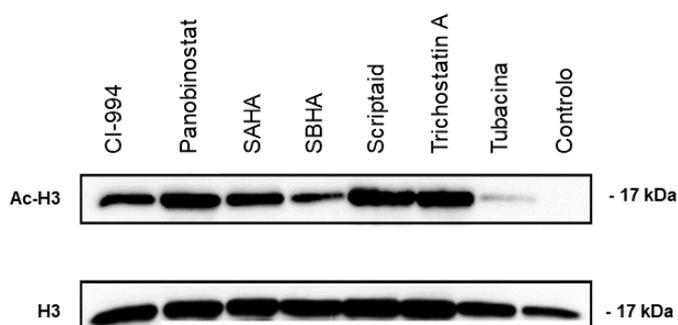
2015) e panobinostat/Farydak® para mieloma múltiplo (Raedler, 2016), também aprovado pela EMA em 2015 (Tzogani et al., 2018).

De acordo com o conhecimento da autora, até data, o presente estudo e os estudos realizados pelo grupo de investigação (Dias et al., 2018) foram os primeiros a avaliar os efeitos dos iHDAC em células de linfoma canino. Os resultados observados nestes ensaios demonstraram efeitos de inibição da proliferação celular dos iHDAC em linfoma canino. Contudo, para a linha celular 17-71 será necessário a realização de ensaios de citotoxicidade com concentrações iniciais mais altas para os fármacos SAHA e SBHA. O panobinostat, com um IC₅₀ na ordem dezenas de nM obtido em 17-71 e na ordem das unidades de nM obtido em CLBL-1, revelou ser o fármaco mais citotóxico do painel de iHDAC avaliado, em ambas as linhas celulares.

1.1. Avaliação da indução de acetilação da Histona 3 pelos iHDAC

Para confirmação de um dos mecanismos de ação primário dos iHDAC foi realizado um *western blot* para pesquisa da presença de histona 3 (H3) acetilada nas células tratadas e comparação com a presença de H3. Os resultados da análise *western blot* (figura 8) indicam que ocorre acetilação das células 17-71 tratadas com CI-994, panobinostat, SAHA, SBHA, scriptaid, *trichostatin A* e tubacina em relação ao controlo negativo de células tratadas apenas com meio RPMI. É observada uma acetilação da H3 mais acentuada para os fármacos panobinostat, scriptaid e *trichostatin A*, tal como observado também nos ensaios de citotoxicidade. A tubacina apresentou um nível inferior de acetilação da H3.

Figura 8 – Acetilação da histona H3 induzida pelos iHDAC, *western blot*.



Legenda: Linha celular 17-71 tratada com fármacos iHDAC – CI-994, panobinostat, SAHA, SBHA, scriptaid, *trichostatin A* e tubacina – para controlo negativo foi utilizado meio RPMI.

As HDAC têm sido investigadas como alvo de terapia oncológica uma vez que há evidências da sua influência em estados de aberração epigenética associadas ao desenvolvimento das neoplasias (Bolden et al., 2006).

Os resultados observados sugerem que é induzido um efeito de acetilação da H3 pelos fármacos inibidores das HDAC. Observou-se um maior estado de acetilação da H3 induzido pelos fármacos: panobinostat, *trichostatin A* e scriptaid, que anteriormente demonstraram maior efeito citotóxico nos ensaios de citotoxicidade. Assim, o estado de acetilação da proteína H3 causado pelos diferentes fármacos é concordante com os seus efeitos observados *in vitro*. As diferenças observadas poderão estar dependentes da especificidade dos compostos para os diferentes tipos de enzimas HDAC e suas funções (Chun, 2015).

2. Desenvolvimento de lipossomas – encapsulação de fármacos

Tendo sido identificado o fármaco mais potente dos iHDAC testados – panobinostat – o passo seguinte consistiu no desenvolvimento de lipossomas para encapsulação deste fármaco. As características físico-químicas, incluindo a eficiência de encapsulação dos fármacos nos lipossomas, encontram-se apresentadas na tabela 7. Os lipossomas de panobinostat apresentam eficiências de encapsulação relativamente menores que os observados para os lipossomas de doxorubicina.

Tabela 7 – Características físico-químicas dos lipossomas desenvolvidos.

	[fármaco/lip] i ¹ (µg/µmol)	[fármaco/lip] f ² (µmol/ml)	E.E. ³ (%)	Tamanho médio (µm) (P.I.)	Zeta Pot ⁴ (mV)
DXR-PEG⁵					
1ºLote	47	28	60	0,11 (<0,100)	-5 ± 1
2ºLote	27	22	81	0,13 (<0,150)	- 2 ± 1
PAN-PEG⁶					
1ºLote	23	14	61	0,11 (<0,100)	- 4 ± 1
2ºLote	27	9	32	0,13 (<0,060)	- 3 ± 1
PAN-PEG-Fol⁷	42	19	43	0,12 (<0,050)	- 2 ± 1
LIP-PEG⁸					
1ºLote	n.a.	n.a.	n.a.	0,11 (<0,100)	- 4 ± 1
2ºLote	n.a.	n.a.	n.a.	0,12 (<0,100)	- 3 ± 1
PEG-Fol⁹	n.a.	n.a.	n.a.	0,13 (<0,100)	- 3 ± 1

¹ – Concentração de fármaco por lipossoma, inicial

² – Concentração de fármaco por lipossoma, final

³ – Eficiência de encapsulação

⁴ – Potencial Zeta

⁵ – Doxorubicina em lipossoma PEG

⁶ – Panobinostat em lipossoma PEG

⁷ – Panobinostat em lipossoma com PEG e folatos

⁸ – Lipossoma vazio PEG

⁹ – Lipossoma vazio com PEG e folatos

3. Avaliação da atividade citotóxica dos fármacos encapsulados em lipossomas

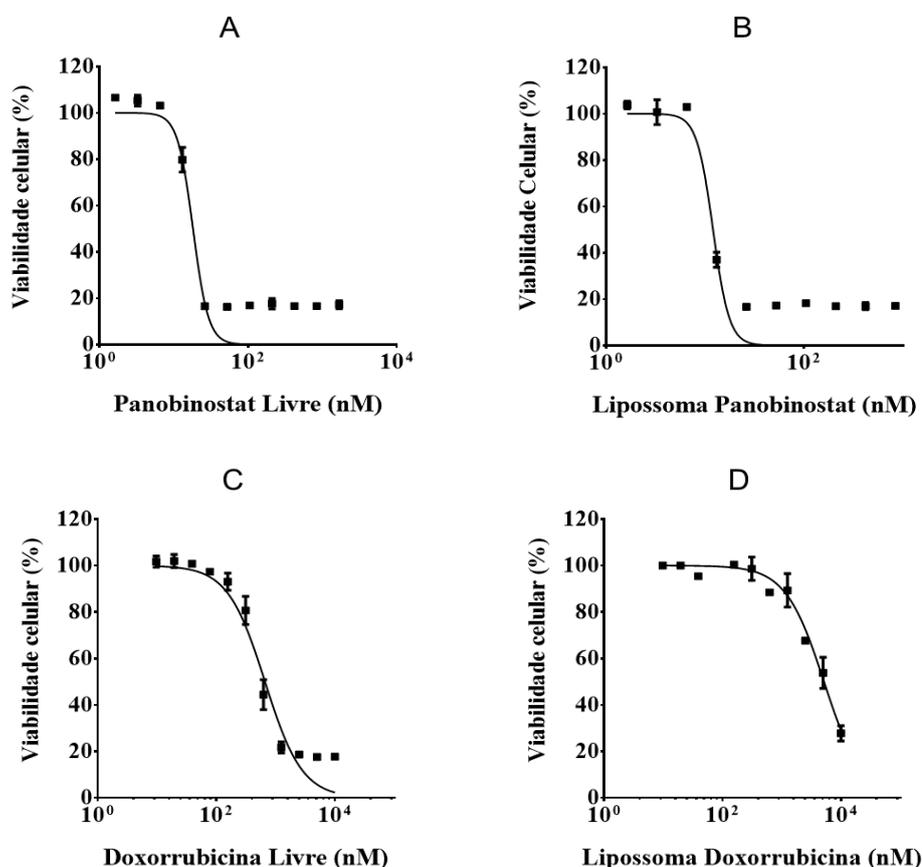
3.1. Linfoma Canino – linha celular CLBL-1

Por terem sido obtidos resultados mais constantes em ensaios citotóxicos na linha celular CLBL-1, foi escolhida esta linha para avaliação da atividade citotóxica dos fármacos encapsulados em lipossomas.

Neste ensaio pretendeu-se avaliar se a atividade citotóxica dos fármacos se mantém ou se é alterada pela sua encapsulação em lipossomas. Para comparação dos resultados para o panobinostat – em forma livre e encapsulada – foram realizados ensaios de citotoxicidade com doxorrubicina, também encapsulada em lipossomas e em forma livre, uma vez que é um fármaco convencionalmente utilizado na quimioterapia oncológica e, para além disso, a sua formulação em lipossomas foi aprovada pela FDA e pela EMA, encontrando-se comercialmente disponível (O'Brien, 2004; Tzogani et al., 2018).

Na figura 9 são apresentados gráficos representativos dos três ensaios realizados com cada um dos fármacos, na tabela 8 os respetivos valores da média e desvio padrão do IC₅₀ e respetiva análise estatística apresentada nas tabelas 9 e 10, figura 10 e no ANEXO II.

Figura 9 – Representação gráfica do efeito citotóxico de panobinostat e doxorrubicina, na linha CLBL-1.

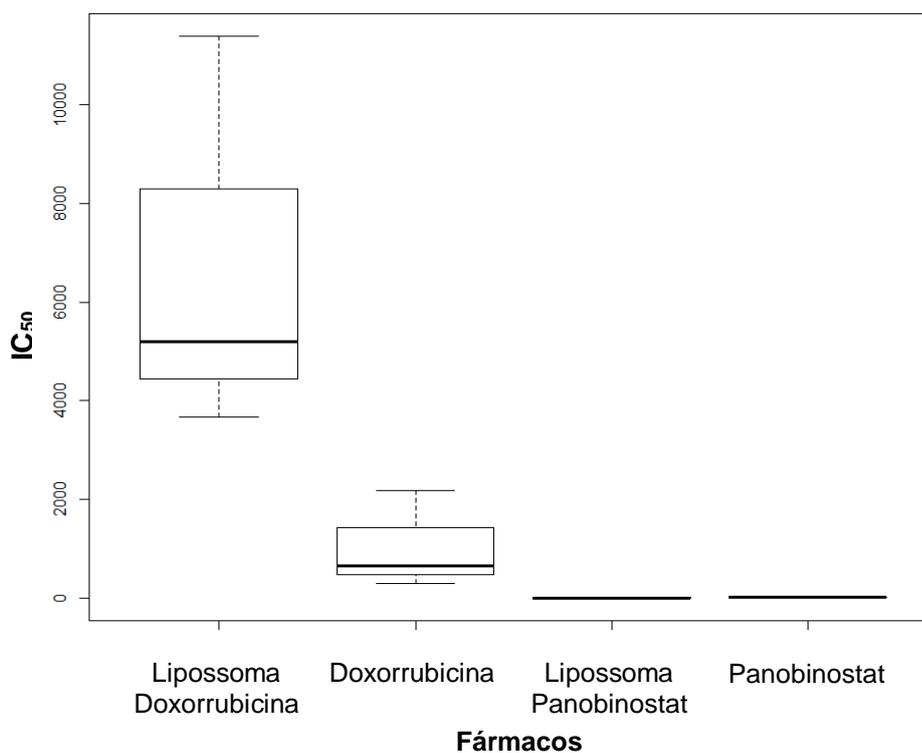


Legenda: efeitos de doxorrubicina e panobinostat na sua forma livre (A e C, respetivamente) ou encapsulados em lipossomas (B e D, respetivamente).

Tabela 8 – Valores dos IC₅₀ (em nM) obtidos para cada formulação testada na linha CLBL-1.

	IC ₅₀ (nM)
Doxorrubicina	1050,0 ± 999,4
Lipossoma doxorrubicina	6752,3 ± 4081,3
Panobinostat	20,1 ± 3,8
Lipossoma panobinostat	15,0 ± 4,9

Figura 10 – Diagrama caixa-de-bigodes para representação da distribuição dos valores IC₅₀ relativos aos diferentes fármacos.



Uma vez que os valores de IC₅₀ obtidos para cada fármaco demonstraram uma distribuição normal – p=0,157 para o panobinostat livre; p=0,055 para lipossoma com panobinostat; p=0,347 para a doxorrubicina livre; p=0,359 para lipossoma com doxorrubicina (ANEXO II) – foi aplicado um teste ANOVA para análise da variância dos resultados. Com este teste estatístico, observou-se que existe pelo menos uma diferença entre os grupos de fármacos analisados, com um valor de p<0,001 (tabela 9). Para identificar as médias que diferem entre si, foi aplicado um teste de *Tukey* como complemento à ANOVA (tabela 10).

Tabela 9 – Análise da variância do IC₅₀ dos fármacos avaliados no ensaio de citotoxicidade – doxorubicina livre, doxorubicina encapsulada em lipossomas, panobinostat livre e panobinostat encapsulado em lipossomas.

	Graus de Liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de F	Nível de significância
Fármacos	3	14,476	4,825	70,42	0,0000043***
Resíduos	8	0,548	0,069	-	-

Códigos de significância:
0 - ***; 0,001 - **; 0,01 - *; 0,05 - .

Tabela 10 – Teste de *Tukey* para identificação das médias que diferem entre si

	Estimativa	Erro Padrão	Valor t	Pr (> t)
Doxorrubicina – Lipossoma Doxo.	-0,8988	0,2137	-4,206	0,0127*
Lipossoma Panob. – Lipossoma Doxo.	-2,6181	0,2137	-12,250	<0,001***
Panobinostat - Lipossoma Doxo	-2,4817	0,2137	-11,612	<0,001***
Lipossoma Panob. – doxorubicina	-1,7192	0,2137	-8,044	<0,001***
Panobinostat – doxorubicina	-1,5829	0,2137	-7,406	<0,001***
Panobinostat – Lipossoma Panob.	0,1363	0,2137	0,638	0,917

Códigos de significância:
0 - ***; 0,001 - **; 0,01 - *; 0,05 - .

O valor de IC₅₀ da doxorubicina encapsulada em lipossomas observa-se ser maior que o valor de IC₅₀ da doxorubicina livre (tabela 8) com uma diferença estatisticamente significativa (p=0,0127) (tabela 10). Esta observação sugere um menor efeito de citotoxicidade da doxorubicina encapsulada em lipossomas face à doxorubicina livre. Estes resultados estão de acordo com os reportados em estudos anteriores (Menezes, Pilarski, & Allen, 1998).

Pelos gráficos representados na figura 9, observou-se que o valor médio de IC₅₀ do panobinostat em lipossomas foi ligeiramente inferior em comparação com a formulação do fármaco livre. No entanto, a diferença observada não foi estatisticamente significativa (p=0,917) (tabela 10).

Os valores de IC₅₀ de panobinostat (tabela 8), foram cerca de 36,5 vezes inferiores que os valores de doxorubicina, tendo sido observado com o teste *Tukey* de que existe uma

diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre estes dois fármacos (tabela 10). Estes resultados sugerem que *in vitro*, na linha celular CLBL-1, o panobinostat apresenta um maior efeito citotóxico do que a doxorrubicina.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram a eficácia do panobinostat como composto citotóxico em linhas celulares de linfoma canino, mesmo sendo encapsulado em lipossomas. Além disso, de acordo com os resultados apresentados nas tabelas 8, 9 e 10, este apresenta um menor IC_{50} , na ordem dos nM, face ao IC_{50} da doxorrubicina, na ordem dos μ M. Estes resultados sugerem que o panobinostat revela ser um fármaco mais citotóxico que a doxorrubicina – um dos fármacos convencionalmente aplicados em protocolos quimioterápicos para o tratamento de linfoma canino. Um estudo realizado em células de anemia mieloide aguda humana, no qual se observou um efeito de inibição sinérgica da proliferação celular com os fármacos panobinostat e doxorrubicina, sugere a utilidade da associação destes fármacos para um efeito anti-tumoral mais eficaz (Maison et al., 2009).

Quanto ao panobinostat encapsulado em lipossomas, os resultados *in vitro* sugerem não haver diferenças no efeito de citotoxicidade em comparação com a sua forma livre. Em ensaios clínicos realizados no Homem, a administração de panobinostat originou efeitos secundários como diarreia, fadiga, náuseas, edema periférico, inapetência, vômitos, pirécia, arritmias, perda de peso e sinais hematológicos como trombocitopénia, neutropénia, linfopénia e anemia (San-Miguel et al., 2014). Assim, a encapsulação do panobinostat em lipossomas poderá trazer vantagens como o aumento da eficácia e redução de efeitos secundários, tal como foi observado em cães tratados com doxorrubicina encapsulada em lipossomas (Vail et al., 1997). No entanto, serão necessários mais ensaios para avaliação do efeito anti-tumoral do panobinostat encapsulado em lipossomas *in vivo* e das suas vantagens em relação ao fármaco na forma livre.

Uma vez que foi conseguida uma encapsulação eficiente dos lipossomas com panobinostat e que foram observados efeitos de citotoxicidade semelhantes aos do fármaco na sua forma livre, prosseguiu-se para a avaliação da influência da associação de folatos aos lipossomas como forma de direcionamento específico dos lipossomas para as células neoplásicas.

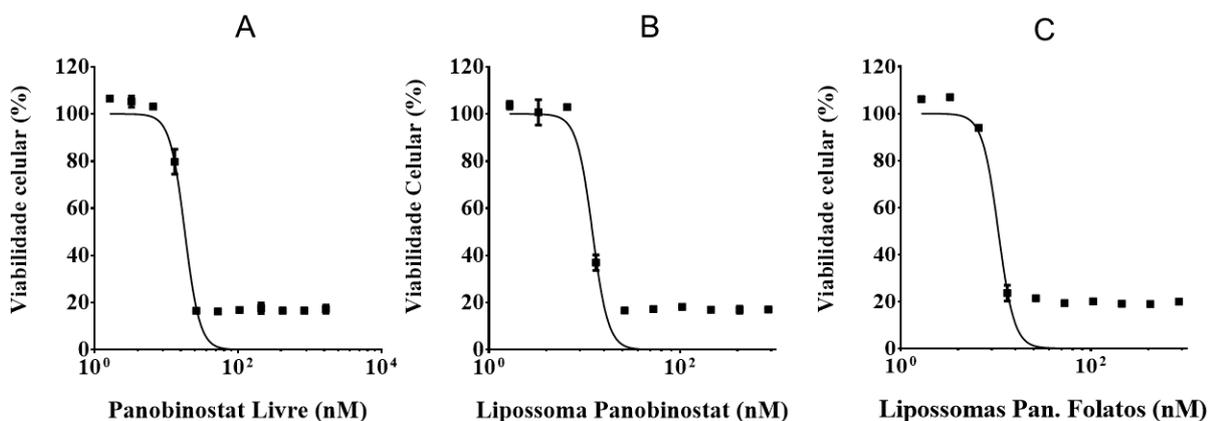
3.1.1. Avaliação da citotoxicidade do panobinostat encapsulado em lipossomas com folatos

Com o objetivo de desenvolver um lipossoma que permita um direcionamento específico para as células neoplásicas foram realizados ensaios de citotoxicidade na linha celular CLBL-1 para avaliar os efeitos do panobinostat encapsulado em lipossomas com folatos (PLFo).

Para tal, foram realizados 3 ensaios independentes, dos quais foi escolhido um gráfico representativo dos resultados obtidos (figura 11). O valor da média e desvio padrão do IC₅₀ obtido para cada fármaco encontram-se representados na tabela 11 e figura 13. Foram aplicados os mesmos testes estatísticos anteriormente referidos (tabelas 12 e 13, figura 13 e ANEXO III).

Os valores de IC₅₀ obtidos para os três fármacos demonstram um efeito citotóxico semelhante entre os três fármacos. No entanto, a diferença entre os valores de IC₅₀ obtidos para o PLFo e o panobinostat livre – cerca de 2 vezes menor – revelou-se ser estatisticamente significativa com um valor de p=0,018 (figura 12 e tabelas 11, 12 e 13).

Figura 11 – Representação gráfica do efeito citotóxico de panobinostat para estudo do direcionamento aos recetores de folatos.

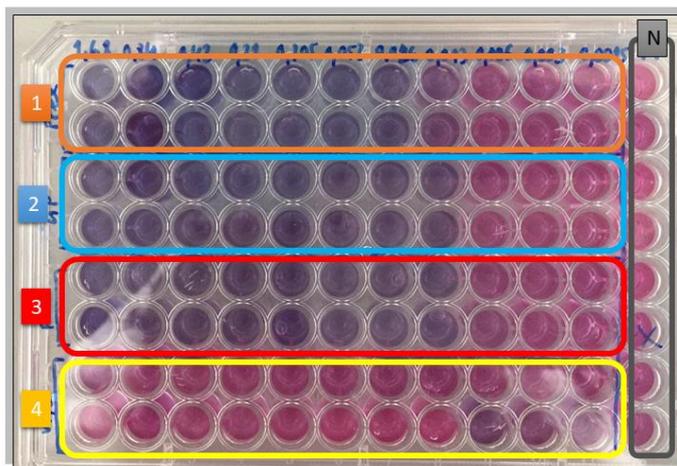


Legenda: (A) panobinostat livre, (B) panobinostat encapsulado em lipossomas e (C) panobinostat em lipossomas.

Tabela 11 – Valores dos IC₅₀ (em nM) obtidos para cada formulação testada em CLBL-1.

	IC ₅₀ (nM)
Panobinostat livre	20,1 ± 3,8
Panobinostat encapsulado em lipossomas	15,0 ± 4,9
Panobinostat encapsulado em lipossomas com folatos	10,6 ± 1,2

Figura 12 – Imagem representativa do ensaio de citotoxicidade na linha celular de linfoma canino CLBL-1.



Legenda: linha 1 – células tratadas com panobinostat livre; linha 2 – células tratadas com panobinostat em lipossoma com PEG; linha 3 – células tratadas com panobinostat em lipossoma com PEG e folatos; linha 4 – controlo negativo de células tratadas com lipossomas com PEG e folatos sem fármaco; linha N – controlo negativo de células tratadas com meio RPMI.

Figura 13 – Diagrama caixa-de-bigodes para representação da distribuição dos valores de IC_{50} relativos aos ensaios de citotoxicidade na linha CLBL-1.

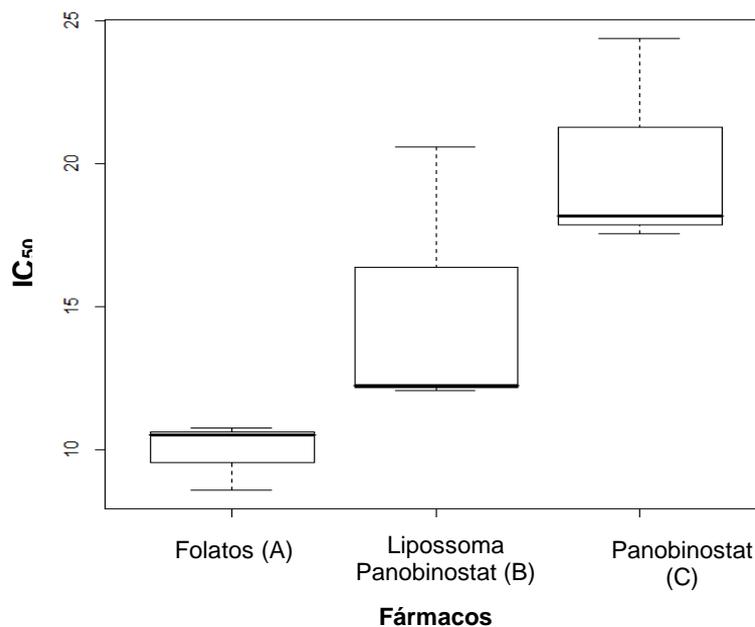


Tabela 12 – Análise da variância do efeito citotóxico do panobinostat e dos lipossomas de panobinostat, com e sem folatos, avaliados na linha CLBL-1

	Graus de Liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de F	Nível de significância
Fármacos	2	0,137	0,068	7,776	0,0216*
Resíduos	6	0,053	0,009	-	-

Códigos de significância:
0 - ***; 0,001 - **; 0,01 - *; 0,05 - .

Tabela 13 – Teste de *Tukey* para identificação das médias que diferem entre si

	Estimativa	Erro Padrão	Valor t	Pr (> t)
Lipossoma panobinostat – folatos	0,165	0,077	2,158	0,158
Panobinostat – folatos	0,302	0,077	3,937	0,018*
Panobinostat – Lipossoma panobinostat	0,136	0,077	1,780	0,254

Códigos de significância:
0 - ***; 0,001 - **; 0,01 - *; 0,05 - .

Os folatos são moléculas amplamente investigadas no âmbito da terapia oncológica. Permitem a internalização de fármacos quimioterápicos em células neoplásicas por intermédio dos recetores de folatos. Para além disso, são moléculas pouco imunogénicas e fáceis de manipular para conjugação com outras estruturas, como os lipossomas (Reddy et al., 2007; Shmeeda et al., 2006).

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que apesar dos valores de IC₅₀ para os lipossomas PEG com e sem folatos não serem significativamente diferentes, parece haver vantagem na aplicação de folatos como meio de direcionamento em comparação com o fármaco na forma livre. Estes resultados são concordantes com os obtidos num estudo de citotoxicidade *in vitro* realizado em células de carcinoma cervical humano (células KB), no qual os valores de IC₅₀ se revelaram semelhantes entre ambas as formulações de doxorubicina em lipossomas com e sem folatos (Scomparin et al., 2015). Contudo, apesar de uma diferença entre os IC₅₀ não estatisticamente significativa, Scomparin (2015) observou que a internalização dos lipossomas com folatos ocorre mais rapidamente que a internalização dos lipossomas sem folatos.

Segundo Parker et al (2005), o linfoma de células B humano, como tumor primário, não apresenta uma grande sobreexpressão de recetores de folatos. Como tal, serão necessários mais estudos para confirmar tanto a sobreexpressão de recetores de folatos nas células de

linfoma canino, como a internalização dos folatos e se estes serão responsáveis por uma maior rapidez no processo de *uptake* celular para posteriormente serem estudados os seus efeitos e vantagens *in vivo*.

3.1.2. Avaliação da citotoxicidade em função do tempo de exposição – diferentes formulações de panobinostat

Com o objetivo de avaliar as diferenças no efeito de citotoxicidade – de panobinostat, lipossomas de panobinostat e PLFo, em função do tempo de exposição – foram realizados ensaios de citotoxicidade com as três formulações em diferentes tempos de exposição – 3 horas (figura 14), 6 horas (figura 15) e 24 horas (anteriormente apresentado – figura 11).

Comparando os resultados obtidos nos diferentes tempos de incubação (figura 14 e 15) observa-se uma diminuição dos valores de IC₅₀ das três formulações de fármacos ao longo dos três tempos de incubação (tabela 14).

Para um tempo de exposição de 3 horas (figura 14) foi observado um valor de IC₅₀ de PLFo cerca de 2 vezes menor em relação ao valor de panobinostat livre e cerca de 2,1 vezes menor que o valor de panobinostat em lipossomas sem folatos. Para controlo negativo, foi também testada uma formulação de lipossomas com PEG associados a moléculas de folatos sem fármaco (lipossomas vazios). Como esperado, os lipossomas sem fármaco não apresentaram efeito citotóxico sobre a linha celular. No entanto, foi observada alguma variação nos valores de viabilidade celular que poderá ser atribuída às diferentes concentrações de meio RPMI em cada poço. O tempo de tratamento testado neste ensaio não foi suficiente para reduzir a viabilidade celular a menos de 50% em todos os fármacos utilizados.

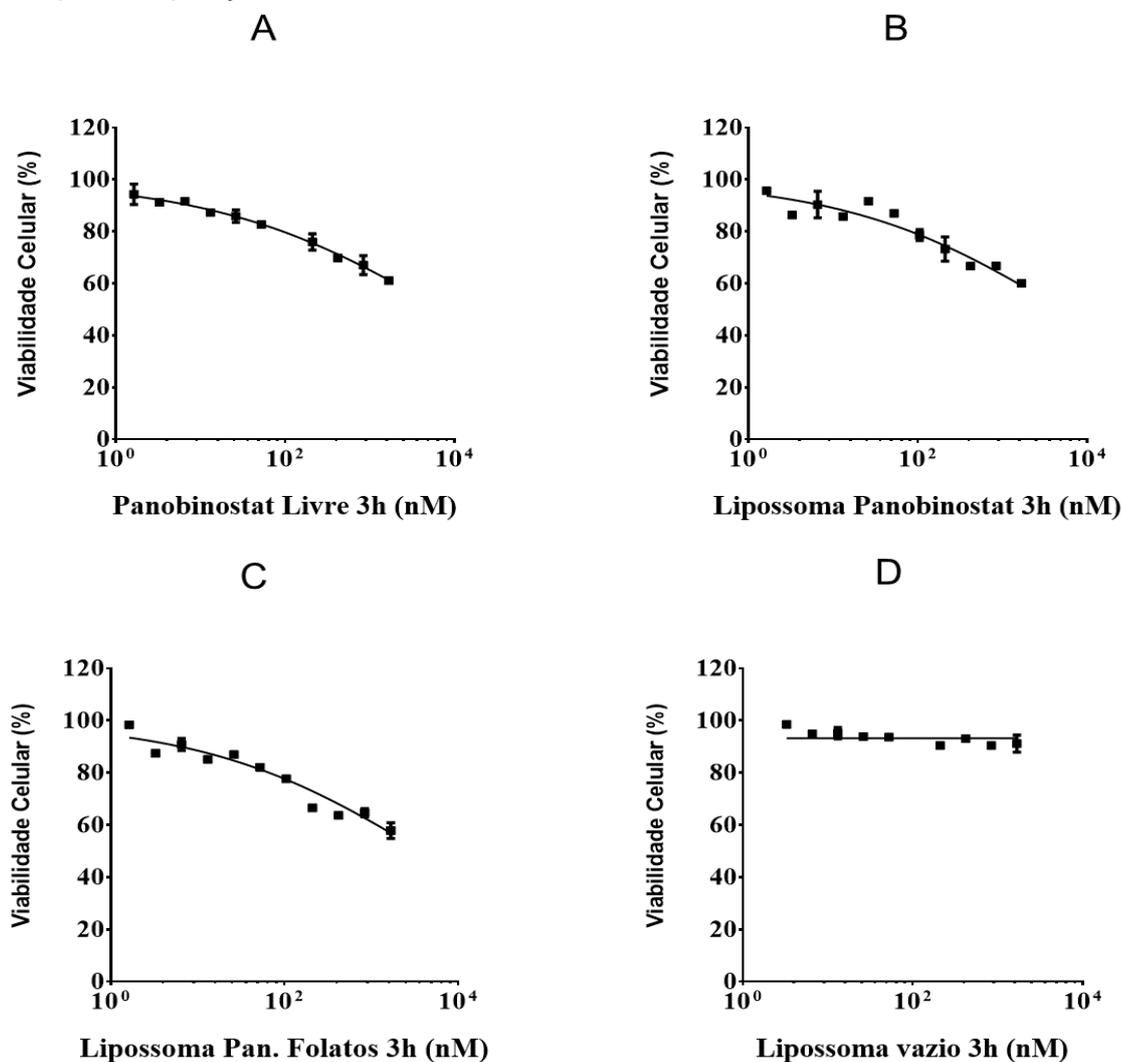
Para um tempo de exposição de 6 horas (figura 15), as diferenças entre os IC₅₀ das diferentes formulações de panobinostat foram semelhantes às obtidas para um período de exposição de 3 horas. Neste ensaio, foi possível obter uma redução da viabilidade celular até 41% para cada fármaco.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem haver um aumento do efeito citotóxico ao longo do tempo, uma vez que após um período de exposição precoce de 3h já é verificado o efeito de inibição da proliferação celular pelo panobinostat. Nos três tempos de incubação é obtido um valor de IC₅₀ mais baixo para o PLFo do que para o fármaco em lipossomas sem folatos, mas semelhante aos valores obtidos para o fármaco livre.

Vários estudos têm sido feitos acerca da internalização de fármacos e de nanotransportadores mediada por recetores de folatos (Gabizon et al., 1999). Num estudo realizado em células de carcinoma do colo do útero humano, foi observado e confirmado que ocorre uma internalização celular mais seletiva e rápida de lipossomas com doxorrubicina direcionados para os recetores de folatos comparativamente com lipossomas não direcionados (Scomparin et al., 2015). Assim, os resultados observados neste estudo sugerem que poderá haver uma vantagem na aplicação de folatos como forma de direcionamento, no entanto, serão

necessários mais estudos para uma fundamentação estatística. Serão também necessários mais estudos para apurar vantagens como a eficácia e a rapidez da internalização dos lipossomas direcionados aos recetores de folatos.

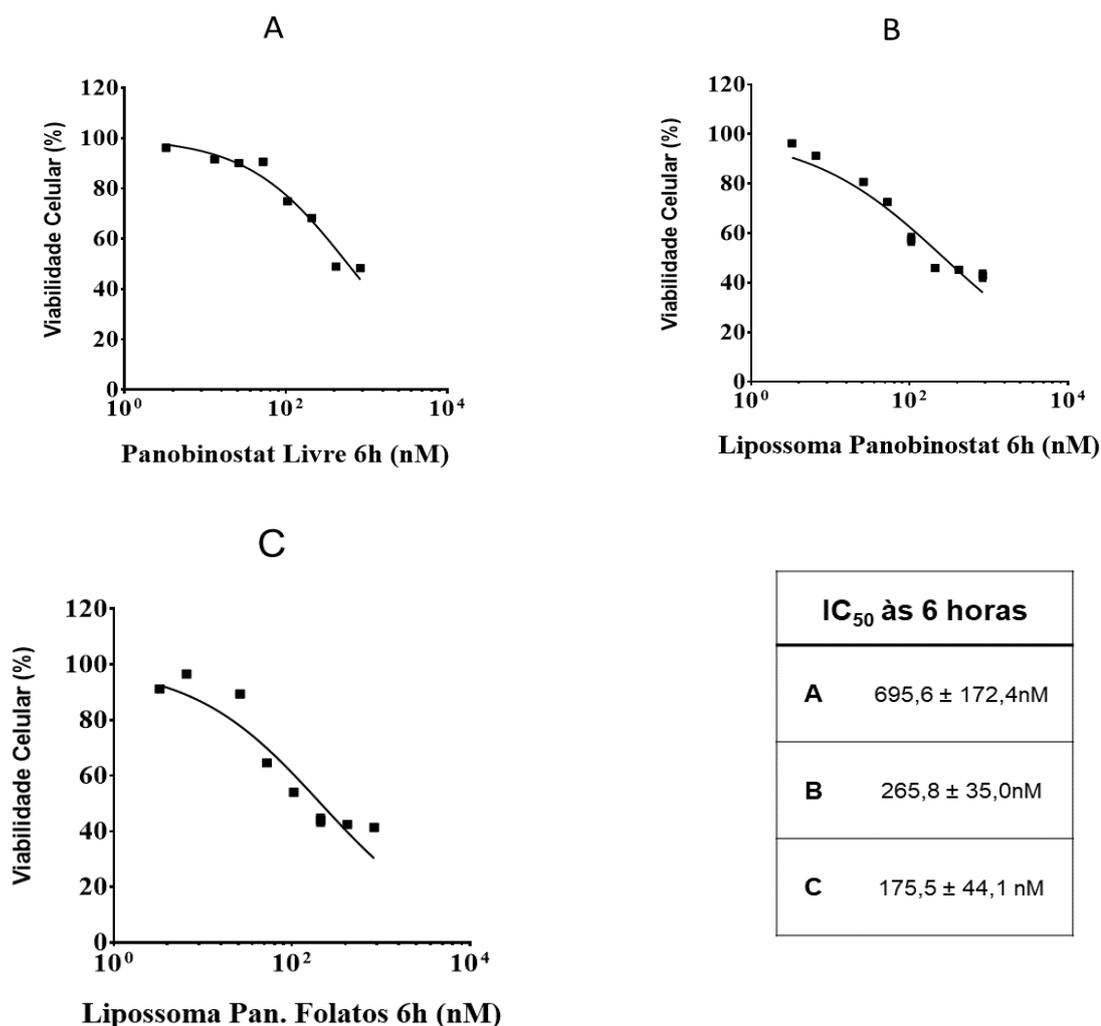
Figura 14 – Ensaio de citotoxicidade de panobinostat encapsulado em lipossomas para um tempo de exposição de 3h, na linha CLBL-1.



IC ₅₀ às 3 horas	
A	7358,5 ± 2479,8 nM
B	5919,0 ± 3879,2 nM
C	4160,0 ± 1904,9 nM

Legenda: (A) panobinostat livre, (B) panobinostat encapsulado em lipossomas com PEG, (C) panobinostat encapsulado em lipossomas com folatos associados ao PEG e (D) formulação de lipossomas vazios.

Figura 15 – Ensaio de citotoxicidade de panobinostat encapsulado em lipossomas para um tempo de exposição de 6 horas, na linha CLBL-1.



Legenda: (A) panobinostat livre, (B) panobinostat encapsulado em lipossomas com PEG, (C) panobinostat encapsulado em lipossomas com folatos associados ao PEG;

Tabela 14 – Valores de IC₅₀ (média e desvio padrão, em nM) obtidos para cada formulação testada na linha CLBL-1 a diferentes tempos de exposição: 3h, 6h e 24h.

	Panobinostat livre	Lipossoma panobinostat	PLFo ¹
3h	7358,5 ± 2479,8	5919,0 ± 3879,2	4160,0 ± 1904,9
6h	695,6 ± 172,4	265,8 ± 35,0	175,5 ± 44,1
24h	20,1 ± 3,8	15,0 ± 4,9	10,6 ± 1,2

¹- PLFo – Panobinostat em lipossomas PEG com folatos

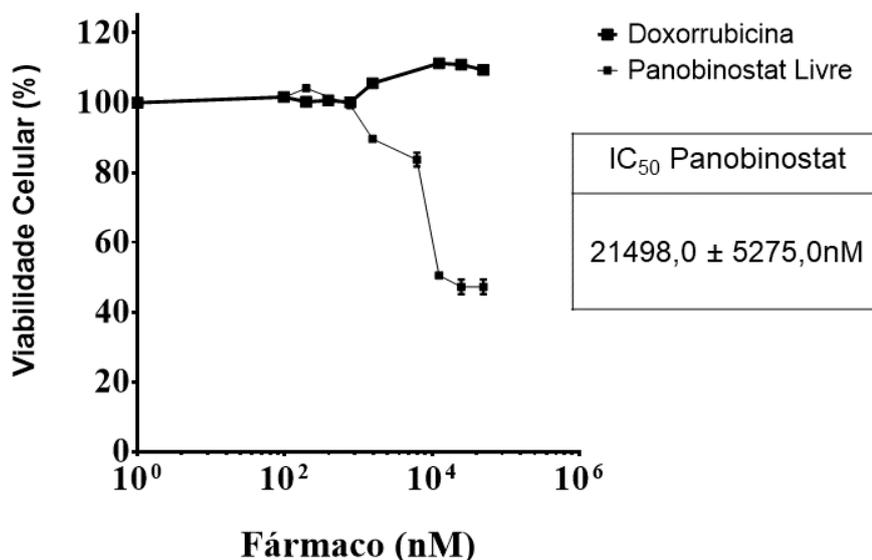
3.2. Glioblastoma humano – linha celular U87

O glioblastoma é uma das neoplasias cerebrais com grande insucesso terapêutico (Hou et al., 2006). Uma das principais dificuldades da terapia convencional neste tipo de neoplasias prende-se com o acesso ao local onde se encontram as células tumorais. Como exemplo, quanto à quimioterapia, a barreira hematoencefálica pode ser um dos entraves à acumulação de uma concentração efetiva de fármaco no local da neoplasia. Outro exemplo é o da resistência à quimioterapia, para a qual surge a necessidade da investigação de tratamentos mais potentes e eficazes que a possam superar (van Tellingen et al., 2015). Para tal, os lipossomas como um sistema de entrega de fármacos com grande atividade citotóxica – por exemplo, o panobinostat – poderão ser uma ferramenta vantajosa para o tratamento deste tipo de neoplasias cerebrais.

Para além das linhas celulares de linfoma, incluídas no projecto de Linfoma Canino, são também exploradas pelo grupo de investigação outras linhas celulares tumorais que incluem tumores cerebrais no Homem. Para tal, considerando o potencial do fármaco panobinostat nas linhas celulares de linfoma canino, foi avaliado o seu efeito numa linha celular de glioblastoma humano, U87 – na sua forma livre e encapsulado em lipossomas.

Num primeiro ensaio de citotoxicidade avaliaram-se os efeitos citotóxicos do panobinostat e doxorrubicina na sua forma livre, na linha celular U87 (figura 16). Neste ensaio observou-se um maior efeito citotóxico do panobinostat em relação à doxorrubicina.

Figura 16 – Ensaio de citotoxicidade com panobinostat e doxorrubicina na forma livre, na linha U87.



Contudo, surgiu a necessidade de otimizar algumas condições do protocolo experimental para poder testar o efeito do panobinostat encapsulado em lipossomas, uma vez que se trata de uma linha celular diferente das linhas de células em suspensão avaliadas nos ensaios de citotoxicidade anteriores.

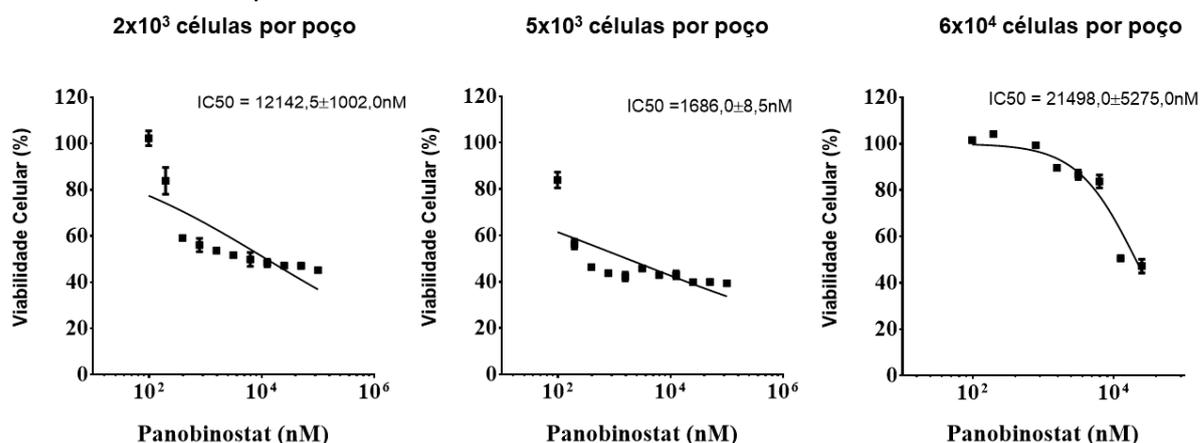
3.2.1. Otimização do protocolo experimental – número de células semeadas por poço

Após observação da eficácia do panobinostat nesta linha celular, realizaram-se ensaios de citotoxicidade para otimização do protocolo experimental quanto ao número de células, com o panobinostat em forma livre.

Com base em estudos realizados em células U87 (Polyak et al., 2011), foram utilizadas três concentrações diferentes de células – 2×10^3 , 5×10^3 e 6×10^4 – por poço (figura 17).

Para os três diferentes números de células por poço testados, observou-se que a concentração celular aplicada no ensaio que melhor permitiu averiguar os efeitos do fármaco foi de 5×10^3 células/poço (figura 17). Quanto aos IC_{50} obtidos, foi também obtido um menor valor de média e desvio padrão para as 5×10^3 células/poço (tabela 15).

Figura 17 – Otimização do número de células semeadas por poço, para o ensaio de citotoxicidade com panobinostat na forma livre.



Legenda:

Neste ensaio foram testados os efeitos citotóxicos de panobinostat em U87 com diferentes números de células plaqueadas por poço - 2×10^3 , 5×10^3 e 6×10^4 .

Tabela 15 – Valores de IC_{50} obtidos para o panobinostat avaliado nos diferentes números de células semeadas por poço

Número de células por poço	IC_{50} (nM)
2×10^3	12142,5 ± 1002,0
5×10^3	1686,0 ± 8,5
6×10^4	21498,0 ± 5275,0

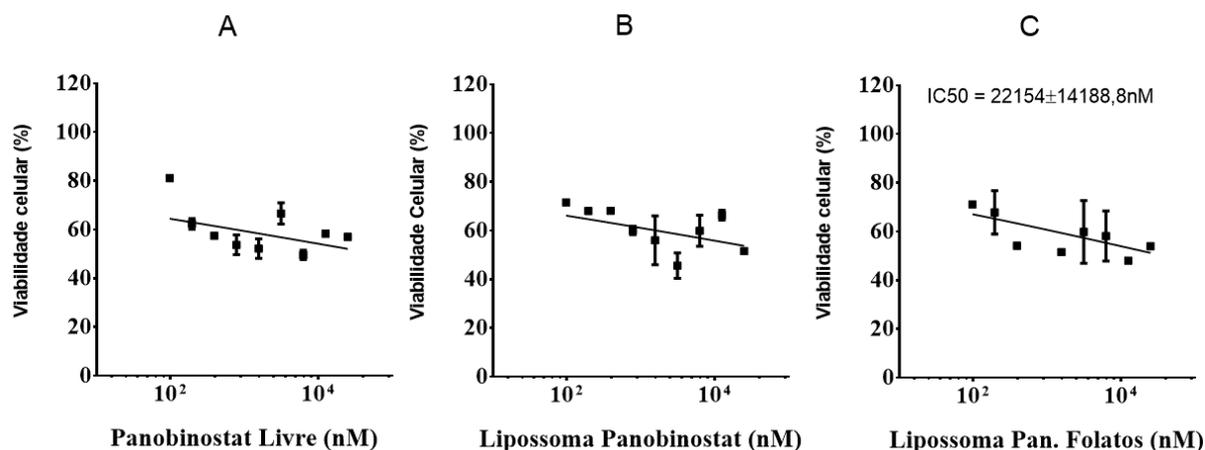
3.2.2. Otimização do protocolo experimental – tempos de exposição

Após otimização do número de células prosseguiu-se para ensaios de citotoxicidade com panobinostat em forma livre e encapsulado em lipossomas, com e sem folatos com 5×10^3 células semeadas por poço. Tendo em conta as condições da experiência realizada por Polyak (2011), foram realizados, no presente estudo, ensaios para otimização do tempo de tratamento – 24 horas e 72 horas – (figuras 18 e 19). Para um período de exposição de 72 horas foram também testados os lipossomas com panobinostat a uma concentração de 6×10^4 células/poço (figura 20).

Conforme observado nas figuras 18 e 19, para um número de células de 5×10^3 por poço, foram obtidos resultados mais constantes às 72h de exposição. Às 24h apenas foi possível reduzir a viabilidade celular a menos de 50% nas células tratadas com PLFo. Neste ensaio, o valor de IC_{50} demonstrou ser menor para as células tratadas com o fármaco encapsulado com e sem folatos – na ordem das centenas de nM – do que o fármaco livre – na ordem dos milhares de nM (tabela 16).

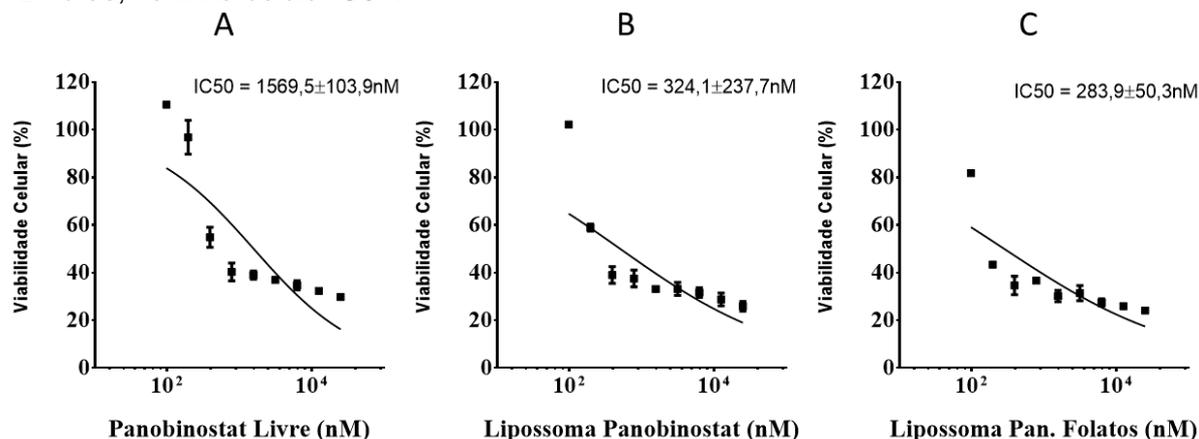
Para um número de 6×10^4 células/poço (tabela 16 e a figura 20), com um menor tempo de exposição observou-se um menor efeito citotóxico dos fármacos em relação à proliferação celular que o observado no ensaio anterior realizado com 5×10^3 células/poço.

Figura 18 – Ensaio de otimização para 5×10^3 células/poço a um tempo de exposição de 24h, na linha celular U87.



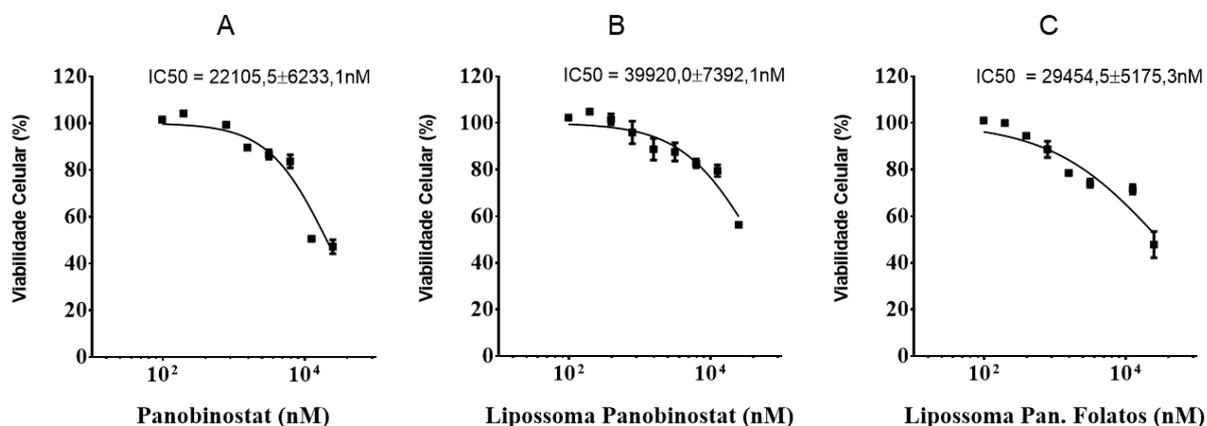
Legenda: (A) panobinostat livre, (B) panobinostat em lipossomas com PEG e (C) panobinostat em lipossomas PEG com folatos.

Figura 19 – Ensaio de otimização com 5×10^3 células por poço a um tempo de exposição de 72 horas, na linha celular U87.



Legenda: (A) panobinostat livre, (B) panobinostat em lipossomas com PEG e (C) panobinostat em lipossomas PEG com folatos.

Figura 20 – Ensaio de otimização com 6×10^4 células por poço a um tempo de exposição de 72 horas, na linha celular U87.



Legenda: (A) panobinostat livre, (B) panobinostat em lipossomas com PEG e (C) panobinostat em lipossomas PEG com folatos.

Tabela 16 – IC_{50} obtidos para um período de exposição de 72h, em 5×10^3 e em 6×10^4 células semeadas por poço

IC_{50} (em nM) obtido para diferentes números de células/poço		
	5×10^3	6×10^4
Panobinostat Livre	1569,5 ± 103,9	22105,5 ± 6233,1
Panobinostat lipossomas	324,1 ± 237,7	39920,0 ± 7392,1
PLFo	283,9 ± 50,3	29454,5 ± 5175,3

Os resultados obtidos demonstraram que o panobinostat é um fármaco potente na inibição da proliferação celular de glioblastoma humano, U87. No entanto, observou-se ser menos eficaz em U87 em comparação com os resultados obtidos nas linhas celulares de linfoma canino. Também, neste estudo, se observou que a associação de moléculas de folatos aos lipossomas tendo como alvo os recetores de folatos poderá ser uma vantagem para o aumento do seu efeito citotóxico nestas células.

O panobinostat apresenta efeitos de inibição de crescimento celular e angiogénese em células de glioblastoma humano (Yao et al., 2017). O seu potencial como fármaco anti-tumoral em glioblastoma humano tem sido investigado em combinação com outros fármacos para potenciação de efeitos citotóxicos como o *bevacizumab* (Lee et al., 2015), a temozolomida (Urdiciain et al., 2018) e ainda como agente radiosensibilizador em combinação com radioterapia (Shi et al., 2016).

De acordo com um estudo realizado na linha celular U87, foi observada a presença de recetores de folatos e da sua utilidade na internalização de doxorubicina em nanotransportadores (Lu, Wei, Ma, Yang, & Chen, 2012).

CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Este estudo teve como objetivo o desenvolvimento e otimização de lipossomas para encapsulação de fármacos citotóxicos de alta potência para serem testados *in vitro* em duas linhas celulares de linfoma canino e uma linha celular de glioblastoma humano.

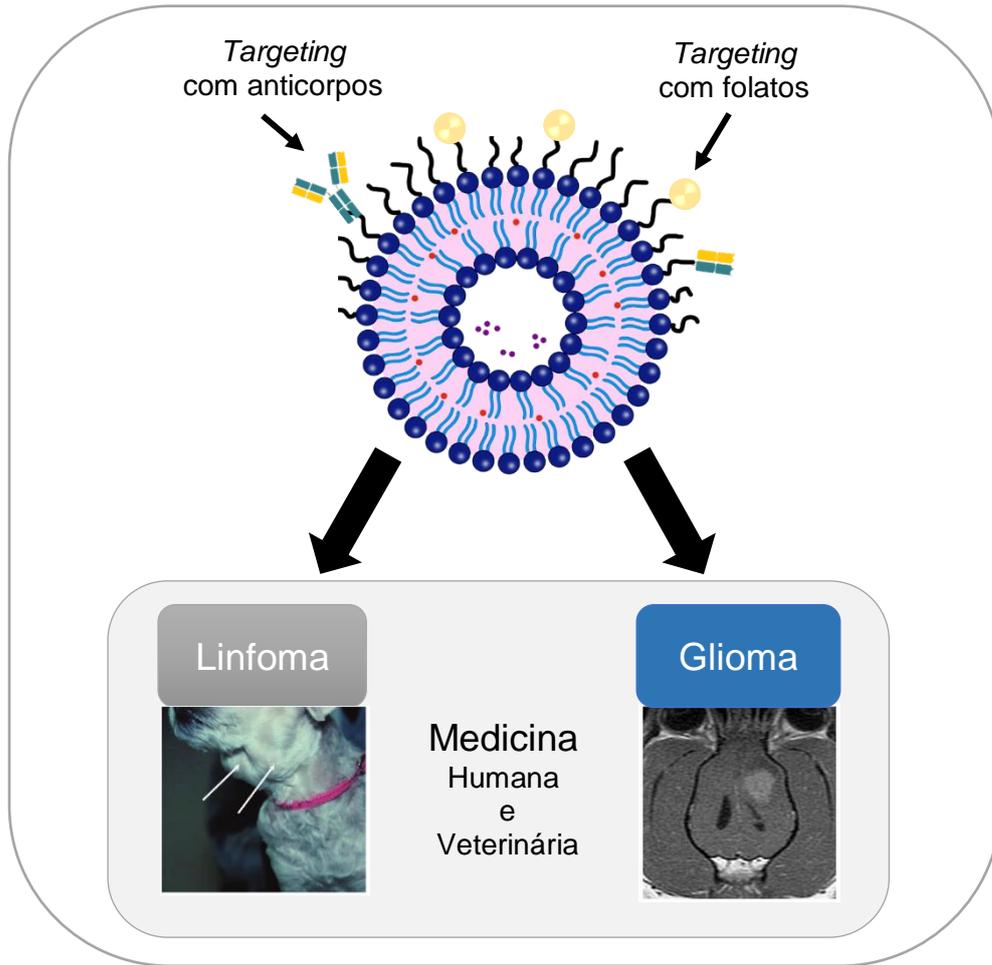
Concluiu-se que os sete fármacos iHDAC testados têm um efeito citotóxico semelhante nas duas linhas celulares de linfoma canino tendo-se destacado, em ambas, o panobinostat como fármaco mais citotóxico. Os resultados obtidos no *western blot* confirmaram a indução da acetilação da histona H3, pelos iHDAC.

A avaliação do efeito citotóxico dos lipossomas com panobinostat e doxorubicina em CLBL-1 demonstrou a maior eficácia do panobinostat em relação à doxorubicina – fármaco convencional aplicado em conjunto com outros fármacos no tratamento do linfoma canino e linfoma de células B humano. Na linha celular de glioblastoma humano foi também observado um maior efeito citotóxico do panobinostat em comparação com o da doxorubicina. Quanto aos lipossomas com panobinostat, concluiu-se que o seu efeito citotóxico é semelhante ao efeito citotóxico do fármaco na sua forma livre. No entanto, o maior efeito citotóxico do panobinostat encapsulado em lipossomas associados a folatos, tanto em linfoma canino como em glioblastoma humano, sugere que este meio de direcionamento específico para os recetores de folatos das células neoplásicas, poderá ser mais vantajoso quanto à internalização do fármaco nas células.

Os iHDAC têm sido investigados para o tratamento de neoplasias tendo sido estudado o seu efeito sinérgico com outros fármacos convencionais aplicados em quimioterapia – como doxorubicina, dexametasona, docetaxel, paclitaxel e gemcitabina (Catley et al., 2003; Fuino et al., 2003; Kim et al., 2003). Poderá também ser possível a combinação de diferentes fármacos citotóxicos potentes, com ações sinérgicas, para encapsulação em lipossomas.

Os estudos *in vitro* desenvolvidos nesta dissertação de mestrado demonstraram a eficácia dos lipossomas como sistemas de transporte de fármacos, tendo em vista o desenvolvimento de um sistema de *drug delivery* que possa ser transversal à Medicina Humana e à Medicina Veterinária (figura 21). Este sistema poderá ser usado em diferentes tipos de neoplasias cujas terapias convencionais ainda apresentem algumas limitações como efeitos secundários indesejáveis e baixa eficácia. Poderá também ser aplicado não só para o diagnóstico e tratamento de doenças oncológicas como para doenças autoimunes, parasitárias, bacterianas ou mesmo para doenças onde a concentração terapêutica no local seja difícil de atingir – como doenças localizadas no cérebro onde a passagem dos fármacos é dificultada pela BHE.

Figura 21 – Aplicação de um sistema de *drug delivery* transversal a Medicina Humana e Medicina Veterinária (esquema original da autora; imagens de linfoma e glioma adaptadas de McEntee & Dewey, 2013; Vail et al., 2013).



BIBLIOGRAFIA

- Adams, W. M., Bjorling, D. E., McAnulty, J. F., Green, E. M., Forrest, L. J., & Vail, D. M. (2005). Outcome of accelerated radiotherapy alone or accelerated radiotherapy followed by exenteration of the nasal cavity in dogs with intranasal neoplasia: 53 cases (1990–2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227(6), 936–941.
- Aguirre-Hernández, J., Milne, B. S., Queen, C., O'Brien, P. C., Hoather, T., Haugland, S., ... Sargan, D. R. (2009). Disruption of chromosome 11 in canine fibrosarcomas highlights an unusual variability of CDKN2B in dogs. *BMC Veterinary Research*, 5(1), 27.
- Aldana-Masangkay, G. I., Rodriguez-Gonzalez, A., Lin, T., Ikeda, A. K., Hsieh, Y.-T., Kim, Y.-M., ... Sakamoto, K. M. (2011). Tubacin suppresses proliferation and induces apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia & Lymphoma*, 52(8), 1544–1555.
- Alt, F. W., Kellems, R. E., Bertino, J. R., & Schimke, R. T. (1977). Selective Multiplication of Dihydrofolate Reductase Genes in Methotrexate-resistant Variants of Cultured Murine Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 253(5), 1357–1370.
- Andoh, T., Ishii, K., Suzuki, Y., Ikegami, Y., Kusunoki, Y., Takemoto, Y., & Okada, K. (1987). Characterization of a mammalian mutant with a camptothecin-resistant DNA topoisomerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(16), 5565–5569.
- Arap, W., Pasqualini, R., & Ruoslahti, E. (1998). Cancer Treatment by Targeted Drug Delivery to Tumor Vasculature in a Mouse Model. *Science*, 279(5349), 377–380.
- Atadja, P. (2009). Development of the pan-DAC inhibitor panobinostat (LBH589): Successes and challenges. *Cancer Letters*, 280(2), 233–241.
- Attardi, L. D., & Jacks, T. (1999). The role of p53 in tumour suppression: lessons from mouse models. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 55(1), 48–63.
- Bacon, N. J., Dernell, W. S., Ehrhart, N., Powers, B. E., & Withrow, S. J. (2007). Evaluation of primary re-excision after recent inadequate resection of soft tissue sarcomas in dogs: 41 cases (1999–2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 230(4), 548–554.
- Bakkenist, C. J., & Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421(6922), 499–506.
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21(3), 381–395.
- Batchelor, T. T., Mulholland, P., Neyns, B., Nabors, L. B., Campone, M., Wick, A., ... van den Bent, M. (2013). Phase III Randomized Trial Comparing the Efficacy of Cediranib As Monotherapy, and in Combination With Lomustine, Versus Lomustine Alone in Patients With Recurrent Glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 31(26), 3212–3218.
- Batist, G., Ramakrishnan, G., Rao, C. S., Chandrasekharan, A., Gutheil, J., Guthrie, T., ... Lee, L. W. (2001). Reduced Cardiotoxicity and Preserved Antitumor Efficacy of Liposome-Encapsulated Doxorubicin and Cyclophosphamide Compared With Conventional Doxorubicin and Cyclophosphamide in a Randomized, Multicenter Trial of Metastatic Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 19(5), 1444–1454.

- Berman, E., Heller, G., Santorsa, J., McKenzie, S., Gee, T., Kempin, S., ... Clarkson, B. (1991). Results of a Randomized Trial Comparing Idarubicin and Cytosine Arabinoside With Daunorubicin and Cytosine Arabinoside in Adult Patients With Newly Diagnosed Acute Myelogenous Leukemia. *Blood*, 77(8), 1666–1674.
- Bianchi, V., Pontis, E., & Reichard, P. (1986). Changes of deoxyribonucleoside triphosphate pools induced by hydroxyurea and their relation to DNA synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 261(34), 16037–16042.
- Biller, B., Berg, J., Garrett, L., Ruslander, D., Wearing, R., Abbott, B., ... Bryan, C. (2016). 2016 AAHA Oncology Guidelines for Dogs and Cats*. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 52(4), 181–204.
- Bley, C. R., Sumova, A., Roos, M., & Kaser-Hotz, B. (2005). Irradiation of Brain Tumors in Dogs with Neurologic Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19(6), 849–854.
- Bolden, J. E., Peart, M. J., & Johnstone, R. W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(9), 769–784.
- Bonnett, B. N., Egenvall, A., Hedhammar, Å., & Olson, P. (2005). Mortality in over 350,000 Insured Swedish dogs from 1995-2000: I. Breed-, Gender-, Age- and Cause-specific Rates, 46(3), 16.
- Boyce, K., & Kitchell, B. (2000). Treatment of canine lymphoma with COPLA/LVP. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 36(5), 395–403.
- Breen, M., & Modiano, J. F. (2008). Evolutionarily conserved cytogenetic changes in hematological malignancies of dogs and humans – man and his best friend share more than companionship. *Chromosome Research*, 16(1), 145–154.
- Brønden, L. B., Flagstad, A., & Kristensen, A. T. (2007). Veterinary cancer registries in companion animal cancer: a review. *Veterinary and Comparative Oncology*, 5(3), 133–144.
- Brønden, L. B., Nielsen, S. S., Toft, N., & Kristensen, A. T. (2010). Data from the Danish Veterinary Cancer Registry on the occurrence and distribution of neoplasms in dogs in Denmark. *Veterinary Record*, 166(19), 586–590.
- Buchwald, M., Krämer, O. H., & Heinzl, T. (2009). HDACi – Targets beyond chromatin. *Cancer Letters*, 280(2), 160–167.
- Budhu, S., Wolchok, J., & Merghoub, T. (2014). The importance of animal models in tumor immunity and immunotherapy. *Current Opinion in Genetics & Development*, 24, 46–51.
- Bueno, R., Appasani, K., Mercer, H., Lester, S., & Sugarbaker, D. (2001). The α folate receptor is highly activated in malignant pleural mesothelioma. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 121(2), 225–233.
- Butler, L. M., Agus, D. B., Scher, H. I., Higgins, B., Rose, A., Cordon-Cardo, C., ... Richon, V. M. (2000). Suberoylanilide Hydroxamic Acid, an Inhibitor of Histone Deacetylase, Suppresses the Growth of Prostate Cancer Cells in Vitro and in Vivo, 60, 5165–5170.
- Byrne, J. D., Betancourt, T., & Brannon-Peppas, L. (2008). Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics - ScienceDirect. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(15), 1615–1626.

- Campbell, R. B., Fukumura, D., Brown, E. B., Mazzola, L. M., Izumi, Y., Jain, R. K., ... Munn, L. L. (2002). Cationic Charge Determines the Distribution of Liposomes between the Vascular and Extravascular Compartments of Tumors. *Cancer Research*, 62(23), 6831–6836.
- Candolfi, M., Curtin, J. F., Nichols, W. S., Muhammad, A. G., King, G. D., Pluhar, G. E., ... Castro, M. G. (2007). Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. *Journal of Neuro-Oncology*, 85(2), 133–148.
- Carpenter, J. S., Sloan, P., Andrykowski, M. A., McGrath, P., Sloan, D., Rexford, T., & Kenady, D. (1999). Risk Factors for Pain After Mastectomy/Lumpectomy. *Cancer Practice*, 7(2), 66–70.
- Catley, L., Weisberg, E., Tai, Y.-T., Atadja, P., Remiszewski, S., Hideshima, T., ... Anderson, K. C. (2003). NVP-LAQ824 is a potent novel histone deacetylase inhibitor with significant activity against multiple myeloma. *Blood*, 102(7), 2615–2622.
- Chaffin, K., & Thrall, D. E. (2002). Results of radiation therapy in 19 dogs with cutaneous mast cell tumor and regional lymph node metastasis, 43(4), 392–395.
- Chamberlain, M. C. (2008). Bevacizumab for recurrent malignant gliomas: Efficacy, toxicity, and patterns of recurrence. *Neurology*, (70), 779–787.
- Charney, S. C., Bergman, P. J., Hohenhaus, A. E., & McKnight, J. A. (2003). Risk factors for sterile hemorrhagic cystitis in dogs with lymphoma receiving cyclophosphamide with or without concurrent administration of furosemide: 216 cases (1990–1996). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222(10), 1388–1393.
- Chun, P. (2015). Histone deacetylase inhibitors in hematological malignancies and solid tumors. *Archives of Pharmacal Research*, 38(6), 933–949.
- Chun, R., Garrett, L. D., & Vail, D. M. (2000). Evaluation of a High-Dose Chemotherapy Protocol with No Maintenance Therapy for Dogs with Lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14(2), 120–124.
- Cohen, D., Reif, J. S., Brodey, R. S., & Keiser, H. (1974). Epidemiological Analysis of the Most Prevalent Sites and Types of Canine Neoplasia Observed in a Veterinary Hospital. *Cancer Research*, 34(11), 2859–2868.
- Cunha, E. S. . (2014). *Avaliação dos efeitos secundários dos fármacos quimioterápicos em animais de companhia - estudo retrospectivo*. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.
- De Jong, W. H., & Borm, P. J. (2008). Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*, 3(2), 133–149.
- Dias, J. N. R., Aguiar, S. I., Pereira, D. M., André, A. S., Gano, L., Correia, J. D. G., ... Aires-da-Silva, F. (2018). The histone deacetylase inhibitor panobinostat is a potent antitumor agent in canine diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*, 9(47), 28586–28598.
- Dobson, J. M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K., & Wood, J. L. N. (2002). Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 43(6), 240–246.

- Dykes, D. J., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Harrison, S. D., Laster, W. R., Simpson-Herren, L., & Griswold, D. P. (1992). Development of Human Tumor Xenograft Models for In Vivo Evaluation of New Antitumor Drugs. *Immunodeficient Mice in Oncology*, 42, 1–22.
- Eckford, P. D. W., & Sharom, F. J. (2009). ABC Efflux Pump-Based Resistance to Chemotherapy Drugs. *Chemical Reviews*, 109(7), 2989–3011.
- Eckschlager, T., Plch, J., Stiborova, M., & Hrabeta, J. (2017). Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1414.
- El-Beltagi, H. M., Martens, A. C. M., Lelieveld, P., Haroun, E. A., & Hagenbeek, A. (1993). Acetyldinaline: A New Oral Cytostatic Drug with Impressive Differential Activity against Leukemic Cells and Normal Stem Cells - Preclinical Studies in a Relevant Rat Model for Human Acute Myelocytic Leukemia. *Cancer Research*, 53, 3008–3014.
- EMA. (2009). *Questions and answers on the withdrawal of the marketing application for Vorinostat MSD*. Acedido em 22 de Novembro de 2018, disponível em https://www.ema.europa.eu/documents/medicine-qa/questions-answers-withdrawal-marketing-application-vorinostat-msd_en.pdf
- EMA. (2010). *summary of European public assessment report (EPAR) for Caelyx*. Acedido em 22 de Novembro de 2018, disponível em <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/caelyx#authorisation-details-section>
- EMA. (2011). *EPAR summary for the public - DepoCyt, liposomal Citarabine*. Acedido em 22 de Novembro de 2018, disponível em https://www.ema.europa.eu/documents/overview/depocyte-epar-summary-public_en.pdf
- EMA. (2012). *summary of European public assessment report (EPAR) for Myocet*. Acedido em 22 de Novembro de 2018, disponível em https://www.ema.europa.eu/documents/overview/myocet-epar-summary-public_en.pdf
- EMA. (2013). *EPAR summary for the public for Mepact - Mifamurtide*. Acedido em 22 de Novembro de 2018, disponível em https://www.ema.europa.eu/documents/overview/mepact-epar-summary-public_en.pdf
- EMA. (2016). *List of nationally authorised medicinal products - active substance: daunorubicin*. Acedido em 22 de Janeiro de 2019, disponível em https://www.ema.europa.eu/documents/psusa/daunorubicin-list-nationally-authorized-medicinal-products-psusa/00000936/201506_en.pdf
- Evans, S. M., Dayrell-Hart, B., Powlis, W., Christy, G., & VanWinkle, T. (1993). Radiation Therapy of Canine Brain Masses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 7(4), 216–219.
- Farese, J. P. (2008). Surgical Oncology Principles. Em J. D. Bonagura & R. B. Kirk, *Kirk's current veterinary therapy. XIV* (pp. 320–323). Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders.
- Farese, J. P., & Withrow, S. J. (2013). Surgical Oncology. Em S. J. Withrow, D. M. Vail, & R. L. Page, *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (5ª, pp. 149–156). Missouri: Saunders Elsevier.

- Fisher, R. I., Gaynor, E. R., Dahlborg, S., Oken, M. M., Grogan, T. M., Mize, E. M., ... Miller, T. P. (1993). Comparison of a Standard Regimen (CHOP) with Three Intensive Chemotherapy Regimens for Advanced Non-Hodgkin's Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 328(14), 1002–1006.
- Flis, S., Gnyszka, A., & Sptawinski, J. (2009). HDAC inhibitors, MS275 and SBHA, enhances cytotoxicity induced by oxaliplatin in the colorectal cancer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 387(2), 336–341.
- Frankfurt, O., & Rosen, S. T. (2004). Mechanisms of glucocorticoid-induced apoptosis in hematologic malignancies: updates. *Current Opinion in Oncology*, 16(6), 553.
- Franklin, W. A., Waintrub, M., Edwards, D., Christensen, K., Prendergrast, P., Woods, J., ... Kolhouse, S. F. (1994). New anti-lung-cancer antibody cluster 12 reacts with human folate receptors present on adenocarcinoma. *International Journal of Cancer*, 8, 89–95.
- Freeman, K. P., Hahn, K. A., Harris, F. D., & King, G. K. (2003). Treatment of dogs with oral melanoma by hypofractionated radiation therapy and platinum-based chemotherapy (1987-1997). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(1), 96–101.
- Fuino, L., Bali, P., Wittmann, S., Donapaty, S., Guo, F., Yamaguchi, H., ... Bhalla, K. (2003). Histone deacetylase inhibitor LAQ824 down-regulates Her-2 and sensitizes human breast cancer cells to trastuzumab, taxotere, gemcitabine, and epothilone B. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2(10), 971–984.
- Gabizon, A., Horowitz, A. T., Goren, D., Tzemach, D., Mandelbaum-Shavit, F., Qazen, M. M., & Zalipsky, S. (1999). Targeting Folate Receptor with Folate Linked to Extremities of Poly(ethylene glycol)-Grafted Liposomes: In Vitro Studies. *Bioconjugate Chemistry*, 10(2), 289–298.
- Garcia-Manero, G., Yang, H., Bueso-Ramos, C., Ferrajoli, A., Cortes, J., Wierda, W. G., ... Kantarjian, H. M. (2007). Phase 1 study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid [SAHA]) in patients with advanced leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood*, 111(3), 1060–1066.
- Garnock-Jones, K. P. (2015). Panobinostat: First Global Approval. *Drugs*, 75(6), 695–704.
- Gatto, B., & Liu, L. F. (1998). Topoisomerase I-targeting drugs: New developments in cancer pharmacology. *Advances in DNA Sequence-Specific Agents*, 3, 39–66.
- Giannakakou, P., Sackett, D. L., Kang, Y. K., Zhan, Z., Buters, J. T., Fojo, T., & Poruchynsky, M. S. (1997). Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant beta-tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(27), 17118–17125.
- Gill, P. S., Wernz, J., Scadden, D. T., Cohen, P., Mukwaya, G. M., von Roenn, J. H., ... Ross, M. E. (1996). Randomized phase III trial of liposomal daunorubicin versus doxorubicin, bleomycin, and vincristine in AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Journal of Clinical Oncology*, 14(8), 2353–2364.
- Green, E. M. (2008). Radiotherapy: Basic Principles and Indications. Em J. D. Bonagura & R. W. Kirk, *Kirk's current veterinary therapy. XIV* (pp. 315–319). Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders.
- Greenstein, S., Ghas, K., Krett, N. L., & Rosen, S. T. (2002). Mechanisms of Glucocorticoid-mediated Apoptosis in Hematological Malignancies. *Clinical Cancer Research*, 8(6), 1681–1694.

- Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M. T., Trubetskoy, V., Torchilin, V., & Langer, R. (1994). Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science*, 263(5153), 1600–
- Groselj, B., Sharma, N. L., Hamdy, F. C., Kerr, M., & Kiltie, A. E. (2013). Histone deacetylase inhibitors as radiosensitisers: effects on DNA damage signalling and repair. *British Journal of Cancer*, 108(4), 748–754.
- Gulyaev, A. E., Gelperina, S. E., Skidan, I. N., Antropov, A. S., Kivman, G. Y., & Kreuter, J. (1999). Significant Transport of Doxorubicin into the Brain with Polysorbate 80-Coated Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 16(10), 1564–1569.
- Gustafson, D. L., & Page, R. L. (2013). Cancer Chemoterapy. Em S. J. Withrow, D. M. Vail, & R. L. Page, *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (5^a, pp. 157–179). Missouri: Saunders Elsevier.
- Hagenbeek, A., Weiershausen, U., & Martens, A. C. (1988). Dinaline: a new oral drug against leukemia? Preclinical studies in a relevant rat model for human acute myelocytic leukemia (BNML). *Leukemia*, 2(4), 226–230.
- Hall, E. J., & Wu, C.-S. (2003). Radiation-induced second cancers: the impact of 3D-CRT and IMRT. *International Journal of Radiation Oncology*Biolog*Physics*, 56(1), 83–88.
- Hayashi, A., Horiuchi, A., Kikuchi, N., Hayashi, T., Fuseya, C., Suzuki, A., ... Shiozawa, T. (2010). Type-specific roles of histone deacetylase (HDAC) overexpression in ovarian carcinoma: HDAC1 enhances cell proliferation and HDAC3 stimulates cell migration with downregulation of E-cadherin. *International Journal of Cancer*, 127(6), 1332–1346.
- Hegi, M. E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., ... Stupp, R. (2005). MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 997–1003.
- Hideshima, T., Bradner, J. E., Wong, J., Chauhan, D., Richardson, P., Schreiber, S. L., & Anderson, K. C. (2005). Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(24), 8567–8572.
- Hifumi, T., Miyoshi, N., Kawaguchi, H., Nomura, K., & Yasuda, N. (2010). Immunohistochemical Detection of Proteins Associated with Multidrug Resistance to Anti-Cancer Drugs in Canine and Feline Primary Pulmonary Carcinoma. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72(5), 665–668.
- Holm, J., Hanses, S. I., Høler-Madsen, M., Sondergaard, K., & Bzorek, M. (1994). Folate receptor of human mammary adenocarcinoma. *APMIS*, 102(1–6), 413–419.
- Holm, Jan, Hansen, S. I., Høier-Madsen, M., Helkjær, P. E., & Nichols, C. W. (1997). Folate Receptors in Malignant and Benign Tissues of Human Female Genital Tract. *Bioscience Reports*, 17(4), 415–427.
- Honscha, K. U., Schirmer, A., Reischauer, A., Schoon, H.-A., Einspanier, A., & Gäbel, G. (2009). Expression of ABC-Transport Proteins in Canine Mammary Cancer: Consequences for Chemotherapy. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(s2), 218–223.
- Hou, L. C., Veeravagu, A., Hsu, A. R., & Tse, V. C. K. (2006). Recurrent glioblastoma multiforme: a review of natural history and management options. *Neurosurgical Focus*, 20(4), E5.

- Hu, Che-Ming J., & Zhang, L. (2009). Therapeutic Nanoparticles to Combat Cancer Drug Resistance. *Current Drug Metabolism*, 10(8), 836–841.
- Hu, Che-Ming Jack, & Zhang, L. (2012). Nanoparticle-based combination therapy toward overcoming drug resistance in cancer. *Biochemical Pharmacology*, 83(8), 1104–1111.
- Huwylar, J., Wu, D., & Pardridge, W. M. (1996). Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), 14164–14169.
- Jain, P. K., Lee, K. S., El-Sayed, I. H., & El-Sayed, M. A. (2006). Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(14), 7238–7248.
- Jain, R. K., & Stylianopoulos, T. (2010). Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 7(11), 653–664.
- Jakola, A. S., Myrmet, K. S., Kloster, R., Torp, S. H., Lindal, S., Unsgård, G., & Solheim, O. (2012). Comparison of a Strategy Favoring Early Surgical Resection vs a Strategy Favoring Watchful Waiting in Low-Grade Gliomas. *JAMA*, 308(18), 1881–1888.
- Jermyn, K., & Lascelles, B. D. X. (2010). Principles of oncological surgery. Em J. M. Dobson & B. D. X. Lascelles, *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology* (3^a, pp. 44–59). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Jiang, J., Liu, Y., Tang, Y., Li, L., Zeng, R., Zeng, S., & Zhong, M. (2016). ALDH1A1 induces resistance to CHOP in diffuse large B-cell lymphoma through activation of the JAK2/STAT3 pathway. *OncoTargets and therapy*, 9, 5349–5360.
- Kager, L., Pötschger, & Bielack. (2010). Review of mifamurtide in the treatment of patients with osteosarcoma. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 6, 279–286.
- Karathanasis, E., Suryanarayanan, S., Balusu, S. R., McNeeley, K., Sechopoulos, I., Karellas, A., ... Bellamkonda, R. V. (2009). Imaging Nanoprobe for Prediction of Outcome of Nanoparticle Chemotherapy by Using Mammography. *Radiology*, 250(2), 398–406.
- Kawasaki, E. S., & Player, A. (2005). Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 1(2), 101–109.
- Keen, J. C., Yan, L., Mack, K. M., Pettit, C., Smith, D., Sharma, D., & Davidson, N. E. (2003). A novel histone deacetylase inhibitor, scriptaid, enhances expression of functional estrogen receptor alpha (ER) in ER negative human breast cancer cells in combination with 5-aza 2'-deoxycytidine. *Breast Cancer Research and Treatment*, 81(3), 177–186.
- Keller, E. T., MacEwen, E. G., Rosenthal, R. C., Helfand, S. C., & Fox, L. E. (1993). Evaluation of Prognostic Factors and Sequential Combination Chemotherapy With Doxorubicin for Canine Lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 7(5), 289–295.
- Kelly, W. K., O'Connor, O. A., Krug, L. M., Chiao, J. H., Heaney, M., Curley, T., ... Richon, V. M. (2005). Phase I Study of an Oral Histone Deacetylase Inhibitor, Suberoylanilide Hydroxamic Acid, in Patients With Advanced Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 23(17), 3923–3931.
- Khan, O., & Thangue, N. B. L. (2012). HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications. *Immunology and Cell Biology*, 90(1), 85–94.

- Khanna, C., Lindblad-Toh, K., Vail, D., London, C., Bergman, P., Barber, L., ... Withrow, S. (2006). The dog as a cancer model. *Nature Biotechnology*, *24*, 1065–1066.
- Khemapech, N., Oranratanaphan, S., Termrungruanglert, W., Lertkhachonsuk, R., & Vasurattana, A. (2013). Salvage Chemotherapy in Recurrent Platinum-Resistant or Refractory Epithelial Ovarian Cancer with Carboplatin and Distearoylphosphatidylcholine Pegylated Liposomal Doxorubicin (Lipo-Dox®). *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *14*(3), 2131–2135.
- Kim, M. S., Blake, M., Baek, J. H., Kohlhagen, G., Pommier, Y., & Carrier, F. (2003). Inhibition of Histone Deacetylase Increases Cytotoxicity to Anticancer Drugs Targeting DNA. *Cancer Research*, *63*(21), 7291–7300.
- Kim, M.-C., D'Costa, S., Suter, S., & Kim, Y. (2013). Evaluation of a side population of canine lymphoma cells using Hoechst 33342 dye. *Journal of Veterinary Science*, *14*(4), 481.
- Kim, T.-Y., Kim, D.-W., Chung, J.-Y., Shin, S. G., Kim, S.-C., Heo, D. S., ... Bang, Y.-J. (2004). Phase I and Pharmacokinetic Study of Genexol-PM, a Cremophor-Free, Polymeric Micelle-Formulated Paclitaxel, in Patients with Advanced Malignancies. *Clinical Cancer Research*, *10*(11), 3708–3716.
- King, L. J., Anderson, L. R., Blackmore, C. G., Blackwell, M. J., Lautner, E. A., Marcus, L. C., ... Mahr, R. K. (2008). Executive summary of the AVMA One Health Initiative Task Force report. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *233*(2), 259–261.
- Kirn, D. H., & Thorne, S. H. (2009). Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. *Nature Reviews Cancer*, *9*(1), 64–71.
- Koukourakis, M. I., Koukouraki, S., Fezoulidis, I., Kelekis, N., Kyrias, G., Archimandritis, S., & Karkavitsas, N. (2000). High intratumoural accumulation of stealth® liposomal doxorubicin (Caelyx®) in glioblastomas and in metastatic brain tumours. *British Journal of Cancer*, *83*(10), 1281–1286.
- Lakshmaiah, K. C., Jacob, L. A., Aparna, S., Lokanatha, D., & Saldanha, S. C. (2014). Epigenetic therapy of cancer with histone deacetylase inhibitors. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, *10*(3), 469–478.
- LaRue, S. M., & Gordon, I. K. (2013). Radiation Therapy. Em S. J. Withrow, D. M. Vail, & R. L. Page, *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (5^a, pp. 180–197). Missouri: Saunders Elsevier.
- Lawley, P. D., & Brookes, P. (1965). Molecular Mechanism of the Cytotoxic Action of Difunctional Alkylating Agents and of Resistance to this Action. *Nature*, *206*(4983), 480–483.
- Lawrence, T. S., Chang, E. Y., Hahn, T. M., Hertel, L. W., & Shewach, D. S. (1996). Radiosensitization of pancreatic cancer cells by 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics*, *34*(4), 867–872.
- Lebwohl, D., & Canetta, R. (1998). Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *European Journal of Cancer*, *34*(10), 1522–1534.
- Lee, E. Q., Reardon, D. A., Schiff, D., Drappatz, J., Muzikansky, A., Grimm, S. A., ... Wen, P. Y. (2015). Phase II study of panobinostat in combination with bevacizumab for recurrent glioblastoma and anaplastic glioma. *Neuro-Oncology*, *17*(6), 862–867.

- Lee, H.-Z., Kwitkowski, V. E., Del Valle, P. L., Ricci, M. S., Saber, H., Habtemariam, B. A., ... Pazdur, R. (2015). FDA Approval: Belinostat for the Treatment of Patients with Relapsed or Refractory Peripheral T-cell Lymphoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 21(12), 2666–2670.
- Lee, J. J., Hughes, C. S., Fine, R. L., & Page, R. L. (1996). P-glycoprotein expression in canine lymphoma: A relevant, intermediate model of multidrug resistance. *Cancer*, 77(9), 1892–1898.
- Lee, R. J., & Low, P. S. (1995). Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped doxorubicin in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1233(2), 134–144.
- LeRoy, B. E., & Northrup, N. (2009). Prostate cancer in dogs: Comparative and clinical aspects. *The Veterinary Journal*, 180(2), 149–162.
- Lindblad-Toh, K., Wade, C. M., Mikkelsen, T. S., Karlsson, E. K., Jaffe, D. B., Kamal, M., ... Lander, E. S. (2005). Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*, 438(7069), 803–819.
- Lipsitz, D., Higgins, R. J., Kortz, G. D., Dickinson, P. J., Bollen, A. W., Naydan, D. K., & LeCouteur, R. A. (2003). Glioblastoma Multiforme: Clinical Findings, Magnetic Resonance Imaging, and Pathology in Five Dogs. *Veterinary Pathology*, 40(6), 659–669.
- Liu, Deli, Xiong, H., Ellis, A. E., Northrup, N. C., Dobbin, K. K., Shin, D. M., & Zhao, S. (2015). Canine Spontaneous Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Represent Their Human Counterparts at the Molecular Level. *PLoS Genetics*, 11(6).
- Liu, Dexi, Mori, A., & Huang, L. (1992). Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM1-containing liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1104(1), 95–101.
- Long, B. H., Wang, L., Lorico, A., Wang, R. C. C., Brattain, M. G., & Casazza, A. M. (1991). Mechanisms of Resistance to Etoposide and Teniposide in Acquired Resistant Human Colon and Lung Carcinoma Cell Lines. *Cancer Research*, 51(19), 5275–5283.
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 330–338.
- LoRusso, P. M., Demchik, L., Foster, B., Knight, J., Bissery, M.-C., Polin, L. M., ... Corbett, T. H. (1996). Preclinical antitumor activity of CI-994. *Investigational New Drugs*, 14(4), 349–356.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., ... Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, 114(2), 97–109.
- Low, P. S., & Antony, A. C. (2004). Folate receptor-targeted drugs for cancer and inflammatory diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(8), 1055–1058.
- Lu, Y.-J., Wei, K.-C., Ma, C.-C. M., Yang, S.-Y., & Chen, J.-P. (2012). Dual targeted delivery of doxorubicin to cancer cells using folate-conjugated magnetic multi-walled carbon nanotubes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 89, 1–9.

- Lwin, T., Lin, J., Choi, Y. S., Zhang, X., Moscinski, L. C., Wright, K. L., ... Tao, J. (2010). Follicular dendritic cell-dependent drug resistance of non-Hodgkin lymphoma involves cell adhesion-mediated Bim down-regulation through induction of microRNA-181a. *Blood*, *116*(24), 5228–5236.
- MacEwen, E. G., Rosenthal, R. C., Fox, L. E., Loar, A. S., & Kurzman, I. D. (1992). Evaluation of L-asparaginase: Polyethylene Glycol Conjugate Versus Native L-asparaginase Combined with Chemotherapy: A Randomized Double-blind Study in Canine Lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *6*(4), 230–234.
- Maiso, P., Colado, E., Ocio, E. M., Garayoa, M., Martín, J., Atadja, P., ... San-Miguel, J. F. (2009). The synergy of panobinostat plus doxorubicin in acute myeloid leukemia suggests a role for HDAC inhibitors in the control of DNA repair. *Leukemia*, *23*(12), 2265–2274.
- Mann, B. S., Johnson, J. R., Cohen, M. H., Justice, R., & Pazdur, R. (2007). FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *The Oncologist*, *12*(10), 1247–1252.
- Marks, P. A. (2007). Discovery and development of SAHA as an anticancer agent. *Oncogene*, *26*(9), 1351–1356.
- Marks, Paul A. (2010). The clinical development of histone deacetylase inhibitors as targeted anticancer drugs. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, *19*(9), 1049–1066.
- Marquard, L., Poulsen, C. B., Gjerdrum, L. M., Brown, P. D. N., Christensen, I. J., Jensen, P. B., ... Ralfkiær, E. (2009). Histone deacetylase 1, 2, 6 and acetylated histone H4 in B- and T-cell lymphomas. *Histopathology*, *54*(6), 688–698.
- Martin, P. M., Cotard, M., Mialot, J.-P., André, F., & Raynaud, J.-P. (1984). Animal models for hormone-dependent human breast cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *12*(1), 13–17.
- Martins, T. L., Kahvegian, M. A. P., Noel-Morgan, J., Leon-Román, M. A., Otsuki, D. A., & Fantoni, D. T. (2010). Comparison of the effects of tramadol, codeine, and ketoprofen alone or in combination on postoperative pain and on concentrations of blood glucose, serum cortisol, and serum interleukin-6 in dogs undergoing maxillectomy or mandibulectomy. *American Journal of Veterinary Research*, *71*(9), 1019–1026.
- Maruyama, K., Kennel, S. J., & Huang, L. (1990). Lipid composition is important for highly efficient target binding and retention of immunoliposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *87*(15), 5744–5748.
- Matsumura, Y., & Maeda, H. (1986). A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Research*, *46*(12 Part 1), 6387–6392.
- Mauldin, G. E., Fox, P. R., Patnaik, A. K., Bond, B. R., Mooney, S. C., & Matus, R. E. (1992). Doxorubicin-Induced Cardiotoxicosis Clinical Features in 32 Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *6*(2), 82–88.
- Maya, S., Kumar, L. G., Sarmiento, B., Sanoj Rejinold, N., Menon, D., Nair, S. V., & Jayakumar, R. (2013). Cetuximab conjugated O-carboxymethyl chitosan nanoparticles for targeting EGFR overexpressing cancer cells. *Carbohydrate Polymers*, *93*(2), 661–669.

- Mayer, L. D., Tai, L. C., Ko, D. S., Masin, D., Ginsberg, R. S., Cullis, P. R., & Bally, M. B. (1989). Influence of vesicle size, lipid composition, and drug-to-lipid ratio on the biological activity of liposomal doxorubicin in mice. *Cancer Research*, *49*(21), 5922–5930.
- McEntee, M. C., & Dewey, C. W. (2013). Tumors of the Nervous System. Em S. J. Withrow, D. M. Vail, & R. L. Page, *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (5^a, pp. 583–596). Missouri: Saunders Elsevier.
- McEntee, Margaret C., Page, R. L., Théon, A., Erb, H. N., & Thrall, D. E. (2004). Malignant Tumor Formation in Dogs Previously Irradiated for Acanthomatous Epulis. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, *45*(4), 357–361.
- Mellanby, R. J., Stevenson, R. K., Herrtage, M. E., White, R. A., & Dobson, J. M. (2002). Long-term outcome of 56 dogs with nasal tumours treated with four doses of radiation at intervals of seven days. *The Veterinary Record*, *151*(9), 253–257.
- Menezes, D. E. L. de, Pilarski, L. M., & Allen, T. M. (1998). In Vitro and in Vivo Targeting of Immunoliposomal Doxorubicin to Human B-Cell Lymphoma. *Cancer Research*, *58*(15), 3320–3330.
- Miranda, N., Portugal, C., Nogueira, P. J., Farinha, C. S., Oliveira, A. L., Alves, M. I., & Martins, J. (2016). *Portugal Doenças Oncológicas em números, 2015* (report) (pp. 7–65). Direção-Geral da Saúde. Acedido em 15 de Setembro, disponível em <https://comum.rcaap.pt/handle/10400.26/15554>
- Moore, A. S., & Frimberger, A. E. (2008). Anticancer Drugs and Protocols: Traditional Drugs. Em J. D. Bonagura & R. W. Kirk, *Kirk's current veterinary therapy. XIV* (pp. 305–311). Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders.
- Moore, Antony S., London, C. A., Wood, C. A., Williams, L. E., Cotter, S. M., L'Heureux, D. A., & Frimberger, A. E. (1999). Lomustine (CCNU) for the Treatment of Resistant Lymphoma in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *13*(5), 395–398.
- Morris, J., & Dobson, J. (2001). Treatment Options. Em J. Morris & J. Dobson, *Small Animal Oncology* (pp. 31–49). Oxford: Blackwell Science.
- Morton, J. J., Bird, G., Refaeli, Y., & Jimeno, A. (2016). Humanized Mouse Xenograft Models: Narrowing the Tumor–Microenvironment Gap. *Cancer Research*, *76*(21), 6153–6158.
- Muggia, F. M. (1999). Doxorubicin-Polymer Conjugates: Further Demonstration of the Concept of Enhanced Permeability and Retention. *Clinical Cancer Research*, *5*(1), 7–8.
- Müller, B. M., Jana, L., Kasajima, A., Lehmann, A., Prinzler, J., Budczies, J., ... Denkert, C. (2013). Differential expression of histone deacetylases HDAC1, 2 and 3 in human breast cancer - overexpression of HDAC2 and HDAC3 is associated with clinicopathological indicators of disease progression. *BMC Cancer*, *13*(215), 1–8.
- Mura, S., & Couvreur, P. (2012). Nanotheranostics for personalized medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *64*(13), 1394–1416.
- Namdar, M., Perez, G., Ngo, L., & Marks, P. A. (2010). Selective inhibition of histone deacetylase 6 (HDAC6) induces DNA damage and sensitizes transformed cells to anticancer agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(46), 20003–20008.

- Nellis, D. F., Ekstrom, D. L., Kirpotin, D. B., Zhu, J., Andersson, R., Broadt, T. L., ... Giardina, S. L. (2005). Preclinical manufacture of an anti-HER2 scFv-PEG-DSPE, liposome-inserting conjugate. 1. Gram-scale production and purification. *Biotechnology Progress*, 21(1), 205–220.
- Ning, L., Jaskula-Sztul, R., Kunnimalaiyaan, M., & Chen, H. (2008). Suberoyl Bishydroxamic Acid Activates Notch1 Signaling and Suppresses Tumor Progression in an Animal Model of Medullary Thyroid Carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, 15(9), 2600–2605.
- O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S., & Dick, J. E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 445(7123), 106–110.
- O'Brien, M. E. R. (2004). Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYXTM/Doxil") versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*, 15(3), 440–449.
- Ohhashi, S., Ohuchida, K., Mizumoto, K., Fujita, H., Egami, T., Yu, J., ... Tanaka, M. (2008). Down-regulation of Deoxycytidine Kinase Enhances Acquired Resistance to Gemcitabine in Pancreatic Cancer. *Anticancer Research*, 28(4B), 2205–2212.
- Omuro, A., & DeAngelis, L. M. (2013). Glioblastoma and Other Malignant Gliomas: A Clinical Review. *JAMA*, 310(17), 1842–1850.
- Pan, X., & Lee, R. J. (2007). Construction of anti-EGFR immunoliposomes via folate–folate binding protein affinity. *International Journal of Pharmaceutics*, 336(2), 276–283.
- Pan, X. Q., Wang, H., & Lee, R. J. (2003). Antitumor Activity of Folate Receptor-Targeted Liposomal Doxorubicin in a KB Oral Carcinoma Murine Xenograft Model. *Pharmaceutical Research*, 20(3), 417–422.
- Pan, X. Q., Zheng, X., Shi, G., Wang, H., Ratnam, M., & Lee, R. J. (2002). Strategy for the treatment of acute myelogenous leukemia based on folate receptor β -targeted liposomal doxorubicin combined with receptor induction using all-trans retinoic acid. *Blood*, 100(2), 594–602.
- Pang, L. Y., & Argyle, D. J. (2016). Veterinary oncology: Biology, big data and precision medicine. *The Veterinary Journal*, 213, 38–45.
- Paoloni, M., Davis, S., Lana, S., Withrow, S., Sangiorgi, L., Picci, P., ... Khanna, C. (2009). Canine tumor cross-species genomics uncovers targets linked to osteosarcoma progression. *BMC Genomics*, 10(625).
- Papahadjopoulos, D., Allen, T. M., Gabizon, A., Mayhew, E., Matthey, K., Huang, S. K., ... Redemann, C. (1991). Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(24), 11460–11464.
- Park, J. W., Hong, K., Kirpotin, D. B., Colbern, G., Shalaby, R., Baselga, J., ... Benz, C. C. (2002). Anti-HER2 Immunoliposomes: Enhanced Efficacy Attributable to Targeted Delivery. *Clinical Cancer Research*, 8, 1172–1181.
- Park, S. Y., Park, S. Y., Jun, J. A., Jun, J. A., Jeong, K. J., Jeong, K. J., ... Kang, J. (2011). Histone deacetylases 1, 6 and 8 are critical for invasion in breast cancer. *Oncology Reports*, 25(6), 1677–1681.

- Parker, N., Turk, M. J., Westrick, E., Lewis, J. D., Low, P. S., & Leamon, C. P. (2005). Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. *Analytical Biochemistry*, 338(2), 284–293.
- Parker, R. J., Eastman, A., Bostick-Bruton, F., & Reed, E. (1991). Acquired cisplatin resistance in human ovarian cancer cells is associated with enhanced repair of cisplatin-DNA lesions and reduced drug accumulation. *The Journal of Clinical Investigation*, 87(3),
- Patel, H. M., Tužel, N. S., & Ryman, B. E. (1983). Inhibitory effect of cholesterol on the uptake of liposomes by liver and spleen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 761(2), 142–151.
- Patel, N. R., Rathi, A., Mongayt, D., & Torchilin, V. P. (2011). Reversal of multidrug resistance by co-delivery of tariquidar (XR9576) and paclitaxel using long-circulating liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 416(1), 296–299.
- Peiffer, L., Poll-Wolbeck, S. J., Flamme, H., Gehrke, I., Hallek, M., & Kreuzer, K.-A. (2014). Trichostatin A effectively induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells via inhibition of Wnt signaling and histone deacetylation. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 140(8), 1283–1293.
- Phuphanich, S., Maria, B., Braeckman, R., & Chamberlain, M. (2007). A pharmacokinetic study of intra-CSF administered encapsulated cytarabine (DepoCyt®) for the treatment of neoplastic meningitis in patients with leukemia, lymphoma, or solid tumors as part of a phase III study. *Journal of Neuro-Oncology*, 81(2), 201–208.
- Platten, M., Wick, W., & Weller, M. (2001). Malignant glioma biology: Role for TGF- β in growth, motility, angiogenesis, and immune escape. *Microscopy Research and Technique*, 52(4), 401–410.
- Polyak, D., Ryppa, C., Eldar-Boock, A., Ofek, P., Many, A., Licha, K., ... Satchi-Fainaro, R. (2011). Development of PEGylated doxorubicin-E-[c(RGDfK)2] conjugate for integrin-targeted cancer therapy. *Polymers for Advanced Technologies*, 22(1), 103–113.
- Ponce, F., Marchal, T., Magnol, J. P., Turinelli, V., Ledieu, D., Bonnefont, C., ... Fournel-Fleury, C. (2010). A Morphological Study of 608 Cases of Canine Malignant Lymphoma in France With a Focus on Comparative Similarities Between Canine and Human Lymphoma Morphology. *Veterinary Pathology*, 47(3), 414–433.
- Raedler, L. A. (2016). Farydak (Panobinostat): First HDAC Inhibitor Approved for Patients with Relapsed Multiple Myeloma. *American Health & Drug Benefits*, 9(Spec Feature), 84–87.
- Rahman, A., Fumagalli, A., Barbieri, B., Schein, P., & Casazza, A. (1986). Antitumor and toxicity evaluation of free doxorubicin and doxorubicin entrapped in cardiolipin liposomes. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 16, 22–27.
- Ratnam, M., Hao, H., Zheng, X., Wang, H., Qi, H., Lee, R., & Pan, X. (2003). Receptor induction and targeted drug delivery: a new antileukaemia strategy. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 3(4), 563–574.
- Reddy, J. A., Dorton, R., Westrick, E., Dawson, A., Smith, T., Xu, L.-C., ... Leamon, C. P. (2007). Preclinical Evaluation of EC145, a Folate-Vinca Alkaloid Conjugate. *Cancer Research*, 67(9), 4434–4442.

- Rehemtulla, A., Stegman, L. D., Cardozo, S. J., Gupta, S., Hall, D. E., Contag, C. H., & Ross, B. D. (2000). Rapid and Quantitative Assessment of Cancer Treatment Response Using In Vivo Bioluminescence Imaging. *Neoplasia*, 2(6), 491–495.
- Riaz, M. K., Riaz, M. A., Zhang, X., Lin, C., Wong, K. H., Chen, X., ... Yang, Z. (2018). Surface Functionalization and Targeting Strategies of Liposomes in Solid Tumor Therapy: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(195), 1–27.
- Roberts, J. J., & Thomson, A. J. (1979). The Mechanism of Action of Antitumor Platinum Compounds. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 22, 71–133.
- Rodriguez, C., Commes, T., Robert, J., & Rossi, J.-F. (1993). Expression of P-glycoprotein and anionic glutathione S-transferase genes in non-hodgkin's lymphoma. *Leukemia Research*, 17(2), 149–156.
- Rodriguez, M. A., Pytlik, R., Kozak, T., Chhanabhai, M., Gascoyne, R., Lu, B., ... Winter, J. N. (2009). Vincristine sulfate liposomes injection (Marqibo) in heavily pretreated patients with refractory aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Cancer*, 115(15), 3475–3482.
- Rosenberg, S. A. (1982). The non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. National Cancer Institute sponsored study of classification of non-Hodgkin's lymphomas. Summary and description of a working formulation for clinical usage. *Cancer*, 49(10), 2112–2135.
- Rummel, S. A., Kraker, A. J., Steinkampf, R. W., Hook, K. E., & Klohs, W. D. (1995). Role of a small molecular weight phosphoprotein in the mechanism of action of CI-994 (N-acetyldinaline). *International Journal of Cancer*, 62(5), 636–642.
- Rütgen, B. C., Hammer, S. E., Gerner, W., Christian, M., de Arespacochaga, A. G., Willmann, M., ... Saalmüller, A. (2010). Establishment and characterization of a novel canine B-cell line derived from a spontaneously occurring diffuse large cell lymphoma. *Leukemia Research*, 34(7), 932–938.
- Rütgen, B. C., Willenbrock, S., Reimann-Berg, N., Walter, I., Fuchs-Baumgartinger, A., Wagner, S., ... Escobar, H. M. (2012). Authentication of Primordial Characteristics of the CLBL-1 Cell Line Prove the Integrity of a Canine B-Cell Lymphoma in a Murine In Vivo Model. *PLOS ONE*, 7(6), e40078.
- Saha, R. N., Vasanthakumar, S., Bende, G., & Snehalatha, M. (2010). Nanoparticulate drug delivery systems for cancer chemotherapy. *Molecular Membrane Biology*, 27(7), 215–231.
- San-Miguel, J. F., Hungria, V. T. M., Yoon, S.-S., Beksac, M., Dimopoulos, M. A., Elghandour, A., ... Richardson, P. G. (2014). Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 15(11), 1195–1206.
- Scherer, H. J. (1940). The forms of growth in gliomas and their practical significance. *Brain*, 63(1), 1–35.
- Scherphof, G. L., Dijkstra, J., Spanjer, H. H., Derksen, J. T. P., & Roerdink, F. H. (1985). Uptake and Intracellular Processing of Targeted and Nontargeted Liposomes by Rat Kupffer Cells In Vivo and In Vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 446(1), 368–384.

- Schiffman, J. D., & Breen, M. (2015). Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1673), 20140231.
- Scomparin, A., Salmaso, S., Eldar-Boock, A., Ben-Shushan, D., Ferber, S., Tiram, G., ... Satchi-Fainaro, R. (2015). A comparative study of folate receptor-targeted doxorubicin delivery systems: Dosing regimens and therapeutic index. *Journal of Controlled Release*, 208, 106–120.
- Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S., & Dvorak, H. F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 219(4587), 983–985.
- Sharma, S., Witteveen, P. O., Lolkema, M. P., Hess, D., Gelderblom, H., Hussain, S. A., ... Mu, S. (2015). A phase I, open-label, multicenter study to evaluate the pharmacokinetics and safety of oral panobinostat in patients with advanced solid tumors and varying degrees of renal function. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 75(1), 87–95.
- Sharma, V., Koul, N., Joseph, C., Dixit, D., Ghosh, S., & Sen, E. (2010). HDAC inhibitor, scriptaid, induces glioma cell apoptosis through JNK activation and inhibits telomerase activity. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(8), 2151–2161.
- Shi, W., Palmer, J. D., Werner-Wasik, M., Andrews, D. W., Evans, J. J., Glass, J., ... Lawrence, Y. R. (2016). Phase I trial of panobinostat and fractionated stereotactic re-irradiation therapy for recurrent high grade gliomas. *Journal of Neuro-Oncology*, 127(3), 535–539.
- Shmeeda, H., Mak, L., Tzemach, D., Astrahan, P., Tarshish, M., & Gabizon, A. (2006). Intracellular uptake and intracavitary targeting of folate-conjugated liposomes in a mouse lymphoma model with up-regulated folate receptors. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(4), 818–824.
- Siedlecki, C. T., Kass, P. H., Jakubiak, M. J., Dank, G., Lyons, J., & Kent, M. S. (2006). Evaluation of an actinomycin-D-containing combination chemotherapy protocol with extended maintenance therapy for canine lymphoma. *The Canadian Veterinary Journal*, 47(1), 52–59.
- Siegal, T., Horowitz, A., & Gabizon, A. (1995). Doxorubicin encapsulated in sterically stabilized liposomes for the treatment of a brain tumor model: biodistribution and therapeutic efficacy. *Journal of Neurosurgery*, 83(6), 1029–1037.
- Simões, S., Moreira, J. N., Fonseca, C., Düzgüneş, N., & Pedrosa de Lima, M. C. (2004). On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(7), 947–965.
- Simpson, R. M., Bastian, B. C., Michael, H. T., Webster, J. D., Prasad, M. L., Conway, C. M., ... Hewitt, S. M. (2014). Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 27(1), 37–47.
- Singh, M. (1999). Transferrin as a targeting ligand for liposomes and anticancer drugs. *Current Pharmaceutical Design*, 5(6), 443–451.
- Singh, Mallika, Lima, A., Molina, R., Hamilton, P., Clermont, A. C., Devasthali, V., ... Johnson, L. (2010). Assessing therapeutic responses in *Kras* mutant cancers using genetically engineered mouse models. *Nature Biotechnology*, 28(6), 585–593.

- Slingerland, M., Hess, D., Clive, S., Sharma, S., Sandstrom, P., Loman, N., ... Gelderblom, H. (2014). A phase I, open-label, multicenter study to evaluate the pharmacokinetics and safety of oral panobinostat in patients with advanced solid tumors and various degrees of hepatic function. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 74(5), 1089–1098.
- Snyder, J. M., Shofer, F. S., Winkle, T. J. V., & Massicotte, C. (2006). Canine Intracranial Primary Neoplasia: 173 Cases (1986–2003). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(3), 669–675.
- Soares, M., Correia, J., Carvalho, S., & Ferreira, F. (2012). Avaliação da expressão de fHER2 em tumores mamários felinos e sua correlação com variáveis clinicopatológicas. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 111(583–584), 191–198.
- Song, J., Noh, J. H., Lee, J. H., Eun, J. W., Ahn, Y. M., Kim, S. Y., ... Nam, S. W. (2005). Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS*, 113(4), 264–268.
- Spugnini, E. P., Thrall, D. E., Price, G. S., Sharp, N. J., Munana, K., & Page, R. L. (2000). Primary Irradiation of Canine Intracranial Masses. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 41(4), 377–380.
- Steplewski, Z., Jeglum, K. A., Rosales, C., & Weintraub, N. (1987). Canine lymphoma-associated antigens defined by murine monoclonal antibodies. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 24(3), 197–201.
- Stewart, F. A., & Dörr, W. (2009). Milestones in normal tissue radiation biology over the past 50 years: From clonogenic cell survival to cytokine networks and back to stem cell recovery. *International Journal of Radiation Biology*, 85(7), 574–586.
- Story, M. D., Voehringer, D. W., Stephens, L. C., & Meyn, R. E. (1993). L-asparaginase kills lymphoma cells by apoptosis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 32(2), 129–133.
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., ... Mirimanoff, R. O. (2005). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 987–996.
- Su, G. H., Sohn, T. A., Ryu, B., & Kern, S. E. (2000). A Novel Histone Deacetylase Inhibitor Identified by High-Throughput Transcriptional Screening of a Compound Library. *Cancer Research*, 60, 3137–3142.
- Sudimack, J., & Lee, R. J. (2000). Targeted drug delivery via the folate receptor. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 41(2), 147–162.
- Suenaga, M., Tomiyasu, H., Watanabe, M., Ogawa, K., Motegi, T., Goto-Koshino, Y., ... Tsujimoto, H. (2017). Comprehensive analysis of gene expression profiles reveals novel candidates of chemotherapy resistant factors in canine lymphoma. *The Veterinary Journal*, 228, 18–21.
- Sundberg, J. P., & Schofield, P. N. (2009). One Medicine, One Pathology, and the One Health concept. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 234(12), 1530–1531.
- Surawicz, T. S., Davis, F., Freels, S., Laws, E. R., & Menck, H. R. (1998). Brain tumor survival: Results from the National Cancer Data Base. *Journal of Neuro-Oncology*, 40(2), 151–160.

- Szlachcic, A., Pala, K., Zakrzewska, M., Jakimowicz, P., Wiedlocha, A., & Otlewski, J. (2012). FGF1-gold nanoparticle conjugates targeting FGFR efficiently decrease cell viability upon NIR irradiation. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5915–5927.
- Takai, N., Ueda, T., Nishida, M., Nasu, K., & Narahara, H. (2006). A novel histone deacetylase inhibitor, Scriptaid, induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial cancer and ovarian cancer cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 17(2), 323–329.
- Tasmuth, T., von Smitten, K., & Kalso, E. (1996). Pain and other symptoms during the first year after radical and conservative surgery for breast cancer. *British Journal of Cancer*, 74(12), 2024–2031.
- Teicher, B. A., Herman, T. S., Holden, S. A., Wang, Y. Y., Pfeffer, M. R., Crawford, J. W., & Frei, E. (1990). Tumor resistance to alkylating agents conferred by mechanisms operative only in vivo. *Science*, 247(4949), 1457–1461.
- Tollett, M. A., Duda, L., Brown, D. C., & Krick, E. L. (2015). Palliative radiation therapy for solid tumors in dogs: 103 cases (2007–2011). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 248(1), 72–82.
- Tran, S., DeGiovanni, P.-J., Piel, B., & Rai, P. (2017). Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery. *Clinical and Translational Medicine*, 6(1), 44.
- Tsuji, N., Kobayashi, M., Nagashima, K., Wakisaka, Y., & Koizumi, K. (1976). A NEW ANTIFUNGAL ANTIBIOTIC, TRICHOSTATIN. *The Journal of Antibiotics*, 29(1), 1–6.
- Tzogani, K., Hennik, P. van, Walsh, I., Graeff, P. D., Folin, A., Sjöberg, J., ... Pignatti, F. (2018). EMA Review of Panobinostat (Farydak) for the Treatment of Adult Patients with Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma. *The Oncologist*, 23(5), 631–636.
- Ungerstedt, J. S., Sowa, Y., Xu, W.-S., Shao, Y., Dokmanovic, M., Perez, G., ... Marks, P. A. (2005). Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(3), 673–678.
- Urdiciain, A., Meléndez, B., Rey, J., Idoate, M., Castresana, J., Urdiciain, A., ... Castresana, J. S. (2018). Panobinostat Potentiates Temozolomide Effects and Reverses Epithelial–Mesenchymal Transition in Glioblastoma Cells. *Epigenomes*, 2(5), 1–12.
- Vail, D. M. (2010). Hematopoietic Tumors. Em S. J. Ettinger & E. C. Feldman, *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (7^a, Vol. 2, pp. 2148–2163). Saunders Elsevier.
- Vail, D. M., Kravis, L. D., Cooley, A. J., Chun, R., & MacEwen, E. G. (1997). Preclinical trial of doxorubicin entrapped in sterically stabilized liposomes in dogs with spontaneously arising malignant tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 39(5), 410–416.
- Vail, D. M., Pinkerton, M. E., & Young, K. M. (2013). Hematopoietic Tumors. Em S. J. Withrow, D. M. Vail, & R. L. Page, *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (5^a, pp. 608–638). Missouri: Saunders Elsevier.
- Vail, David M., Thamm, D. H., Reiser, H., Ray, A. S., Wolfgang, G. H. I., Watkins, W. J., ... Tumas, D. B. (2009). Assessment of GS-9219 in a Pet Dog Model of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Clinical Cancer Research*, 15(10), 3503–3510.
- Valli, V. E., Myint, M. S., Barthel, A., Bienzle, D., Caswell, J., Colbatzky, F., ... Vernau, W. (2011). Classification of Canine Malignant Lymphomas According to the World Health Organization Criteria. *Veterinary Pathology*, 48(1), 198–211.

- van Tellingen, O., Yetkin-Arik, B., de Gooijer, M. C., Wesseling, P., Wurdinger, T., & de Vries, H. E. (2015). Overcoming the blood–brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment. *Drug Resistance Updates*, 19, 1–12.
- Venkatakrishnan, K., Liu, Y., Noe, D., Mertz, J., Bargfrede, M., Marbury, T., ... Milton, A. (2014). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of liposomal mifamurtide in adult volunteers with mild or moderate hepatic impairment. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 77(6), 998–1010.
- Vick, N. A., Khandekar, J. D., & Bigner, D. D. (1977). Chemotherapy of Brain Tumors: The Blood-Brain Barrier Is Not a Factor. *Archives of Neurology*, 34(9), 523–526.
- Villa, G. R., & Mischel, P. S. (2015). Shared Intelligence: A Patient-Derived, Deeply Characterized Glioblastoma Cell Line Resource. *EBioMedicine*, 2(10), 1274–1275.
- Vinothini, G., Balachandran, C., & Nagini, S. (2009). Evaluation of Molecular Markers in Canine Mammary Tumors: Correlation With Histological Grading. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 18(5–6), 193–201.
- Vrana, J. A., Decker, R. H., Johnson, C. R., Wang, Z., Jarvis, W. D., Richon, V. M., ... Grant, S. (1999). Induction of apoptosis in U937 human leukemia cells by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) proceeds through pathways that are regulated by Bcl-2/Bcl-X_L, c-Jun, and p21^{CIP1}, but independent of p53. *Oncogene*, 18(50), 7016–7025.
- Wagner, V., Dullaart, A., Bock, A.-K., & Zweck, A. (2006). The emerging nanomedicine landscape. *Nature Biotechnology*, 24, 1211–1217.
- Walker, J. M., & Kruger, N. J. (2002). *The Protein Protocols Handbook* (2nd edition). Totowa, New Jersey: Humana Press.
- Wang, A. L., & Tew, K. D. (1985). Increased glutathione-S-transferase activity in a cell line with acquired resistance to nitrogen mustards. *Cancer Treatment Reports*, 69(6), 677–682.
- Wang, J. C., Kafeel, M. I., Avezbakiyev, B., Chen, C., Sun, Y., Rathnasabapathy, C., ... Lichter, S. (2011). Histone Deacetylase in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Oncology*, 81(5–6), 325–329.
- Ward, J. F. (1988). DNA Damage Produced by Ionizing Radiation in Mammalian Cells: Identities, Mechanisms of Formation, and Reparability. Em W. E. Cohn & K. Moldave (Eds.), *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (Vol. 35, pp. 95–125). Academic Press.
- Weiss, R. B. (1981). Hypersensitivity Reactions to Cancer Chemotherapeutic Agents. *Annals of Internal Medicine*, 94(1), 66.
- Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V., & Huwyler, J. (2015). Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *Journal of Controlled Release*, 200, 138–157.
- Withrow, S. J., Vail, D. M., & Page, R. L. (2013). Why Worry About Cancer in Companion Animals - Introduction. Em *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (5^a, pp. XV–XVI). Missouri: Saunders Elsevier.
- Wolf, J. L., Siegel, D., Goldschmidt, H., Hazell, K., Bourquelot, P. M., Bengoudifa, B. R., ... Lonial, S. (2012). Phase II trial of the pan-deacetylase inhibitor panobinostat as a single agent in advanced relapsed/refractory multiple myeloma. *Leukemia & Lymphoma*, 53(9), 1820–1823.

- Wu, J., Liu, Q., & Lee, R. J. (2006). A folate receptor-targeted liposomal formulation for paclitaxel. *International Journal of Pharmaceutics*, 316(1–2), 148–153.
- Yao, Z.-G., Li, W.-H., Hua, F., Cheng, H.-X., Zhao, M.-Q., Sun, X.-C., ... Li, J.-M. (2017). LBH589 Inhibits Glioblastoma Growth and Angiogenesis Through Suppression of HIF-1 α Expression. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 76(12), 1000–1007.
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., & Beppu, T. (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *Journal of Biological Chemistry*, 265(28), 17174–17179.
- Yuan, F., Leunig, M., Huang, S. K., Berk, D. A., Papahadjopoulos, D., & Jam, R. K. (1994). Microvascular Permeability and Interstitial Penetration of Sterically Stabilized (Stealth) Liposomes in a Human Tumor Xenograft. *Cancer Research*, 54, 3352–3356.
- Zalipsky, S., Hansen, C. B., Lopes de Menezes, D. E., & Allen, T. M. (1996). Long-circulating, polyethylene glycol-grafted immunoliposomes. *Journal of Controlled Release*, 39(2), 153–161.
- Zandvliet, M., Teske, E., & Schrickx, J. A. (2014). Multi-drug resistance in a canine lymphoid cell line due to increased P-glycoprotein expression, a potential model for drug-resistant canine lymphoma. *Toxicology in Vitro*, 28(8), 1498–1506.
- Zhang, L., & Granick, S. (2006). How to Stabilize Phospholipid Liposomes (Using Nanoparticles). *Nanno Letters*, 6(4), 694–698.
- Zhang, X. D., Gillespie, S. K., Borrow, J. M., & Hersey, P. (2004). The histone deacetylase inhibitor suberic bishydroxamate regulates the expression of multiple apoptotic mediators and induces mitochondria-dependent apoptosis of melanoma cells, 3(4), 425–435.
- Zhang, X., Guo, S., Fan, R., Yu, M., Li, F., Zhu, C., & Gan, Y. (2012). Dual-functional liposome for tumor targeting and overcoming multidrug resistance in hepatocellular carcinoma cells. *Biomaterials*, 33(29), 7103–7114.
- Zhao, X. B., & Lee, R. J. (2004). Tumor-selective targeted delivery of genes and antisense oligodeoxyribonucleotides via the folate receptor. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(8), 1193–1204.
- Zhao, Y.-Z., Dai, D.-D., Lu, C.-T., Chen, L.-J., Lin, M., Shen, X.-T., ... Huang, P.-T. (2013). Epirubicin loaded with propylene glycol liposomes significantly overcomes multidrug resistance in breast cancer. *Cancer Letters*, 330(1), 74–83.
- Zhuang, Z., Fei, F., Chen, Y., & Jin, W. (2008). Suberoyl bis-hydroxamic acid induces p53-dependent apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(12), 1459–1466.

ANEXO I – Abstract do painel exposto no Congresso CIISA 2018 - “Exploring the boundaries of animal, veterinary and biomedical sciences”, em Lisboa

Development and optimization of liposomes encapsulated with potent cytotoxic compounds for immunotherapy

I. Rico¹; J. Dias²; A. André², S. I. Aguiar², M. M. Gaspar³, J. Amaral³, C. Rodrigues³, S. Gil², F. Aires-da-Silva²

¹Integrated Master Student of Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon, Portugal. ²CIISA – Center for Interdisciplinary Research for Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon, Portugal. ³Research Institute for Medicines (iMed.U.Lisboa), Faculty of Pharmacy, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal.

Background: Cancer is one of the leading causes of death in both humans and dogs. There is a rising owners' concern about their dogs' health and therefore the search and development of new methods to improve cancer therapy, dog's welfare and to overcome cancer resistance is growing up. Furthermore, integration of dogs in clinical trials reveals itself as a benefit for both dogs and humans since it allows the access to other therapy protocols inaccessible to Veterinary Medicine, providing results on an animal model much more similar to humans, before starting human clinical trials. Liposomes are being investigated as a drug delivery system of chemotherapeutic agents in order to improve their pharmacokinetics, to reduce the negative side effects and to target cancerous cells. The aim of this study is to assess the cytotoxic effects of a potent anti-tumor agent in canine large B-cell lymphoma – panobinostat HDAC inhibitor – using targeted liposomes as a drug delivery system and comparison with cytotoxic effects of doxorubicin and liposomal doxorubicin.

Material and Methods: The effects of panobinostat, liposomal panobinostat and liposomal panobinostat targeted with folates on CLBL-1 cell viability were measured using the alamarBlue® reagent, 24h after the treatment. Two replicate wells were used for each drug concentration and three independent experiments for each drug were carried out in different days. Best-fit IC₅₀ values were calculated using the log (inhibitor) vs response (variable slope) function. The data was statically analyzed using ANOVA and Tukey test in R version 3.5.0. (2018).

Results and Conclusion: Results showed a lower IC₅₀ value of 20,06nM for panobinostat statistically different of doxorubicin's IC₅₀ of 1050nM. There was no statistic difference between panobinostat's IC₅₀ value and its liposomal formulation IC₅₀ value of 14,97nM. However, liposomal formulation of panobinostat with folates showed a IC₅₀ value of 9,95nM that is slightly lower comparing to panobinostat's IC₅₀, with a pvalue<0,05. This results indicate that panobinostat has a higher cytotoxic activity comparing to doxorubicin, *in vitro*, in agreement with previous studies⁽¹⁾. The use of liposomal formulation could be advantageous in reducing the cytotoxic effects, as shown in previous studies for liposomal doxorubicin⁽²⁾, since its efficacy is similar to the free drug.

Keywords: Panobinostat, HDAC inhibitors, canine lymphoma, liposome

Funding: This work was supported by Fundação para a Ciência e Tecnologia (BBB_BIO_0508_2014; IF_010100, SFRH/BD/90514/2012, SFRH/BD/131468/2017 and by UID/CVT/00276/2013).

⁽¹⁾ Ishida, T., Kirchmeier, M. J., Moase, E. H., Zalipsky, S., & Allen, T. M. (2001). Targeted delivery and triggered release of liposomal doxorubicin enhances cytotoxicity against human B lymphoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1515(2), 144–158. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(01\)00409-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(01)00409-6)

⁽²⁾ Kanter, P. M., Bullard, G. A., Ginsberg, R. A., Pilkiewicz, F. G., Mayer, L. D., Cullis, P. R., & Pavelic, Z. P. (1993). Comparison of the cardiotoxic effects of liposomal doxorubicin (TLC D-99) versus free doxorubicin in beagle dogs. *In Vivo*, 7(1), 17–26.

ANEXO II – Gráficos e tabelas relativos à análise estatística para o ensaio citotoxicidade de panobinostat e doxorrubicina em forma livre e encapsulados em lipossomas - em CLBL-1

Teste de normalidade Shapiro-Wilk para as diferentes formulações de panobinostat e doxorrubicina

	Valor de p
Panobinostat	0,157
Lipossoma Panobinostat	0,055
Doxorrubicina	0,347
Lipossoma de Doxorrubicina	0,359

Distribuição dos valores IC₅₀ relativos a doxorrubicina livre, doxorrubicina encapsulada em lipossomas, panobinostat livre e panobinostat encapsulado em lipossomas.

	IQR	0%	25%	50%	75%	100%
Doxorrubicina	941,550	301,90	482,55	663,20	1424,10	2185,00
Lipossoma doxorrubicina	3853,50	3675,00	4437,50	5200,00	8291,00	11382,00
Panobinostat	3,41	17,58	17,89	18,20	21,30	24,39
Lipossoma panobinostat	4,26	12,07	12,16	12,25	16,42	20,58

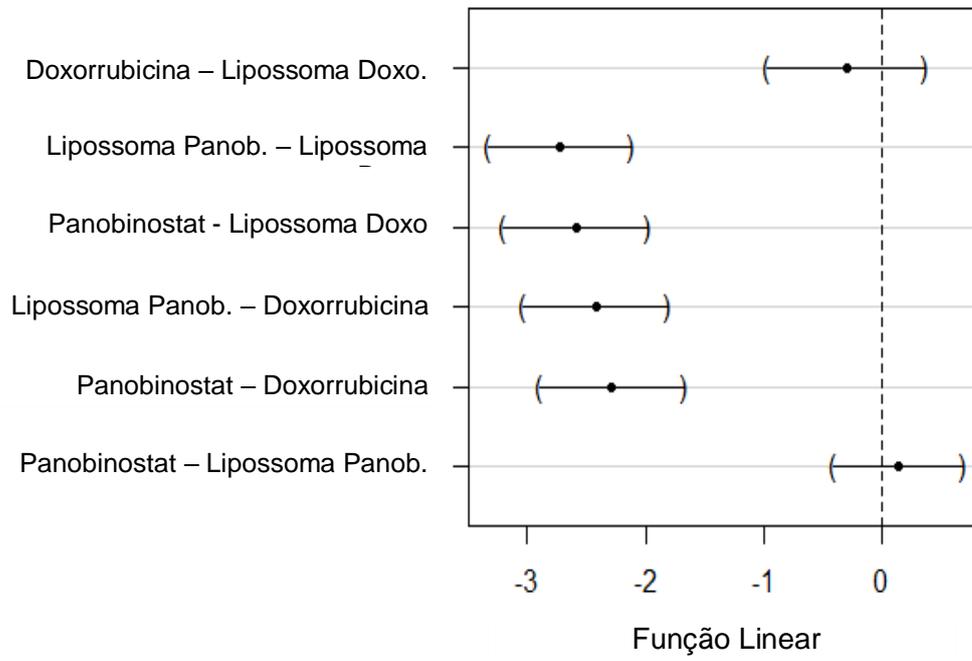
Intervalos de confiança do teste de *Tukey* para comparação de múltiplas médias

	Estimativa	Inferior ¹	Superior ¹
Doxorrubicina – lipossoma Doxo.	-0,8988	-1,5828	-0,2149
Lipossoma Panob. – lipossoma Doxo.	-2,6181	-3,3021	-1,9341
Panobinostat - lipossoma Doxo	-2,4817	-3,1657	-1,7977
Lipossoma Panob. – doxorrubicina	-1,7192	-2,4032	-1,0352
Panobinostat – doxorrubicina	-1,5829	-2,2669	-0,8989
Panobinostat – lipossoma Panob.	0,1363	-0,5477	0,8203

¹ – valores dos limites superior e inferior calculados relativamente ao desvio padrão

Gráfico do nível de confiança para cada associação de fármacos no teste *Tukey*

95% family-wise confidence level



ANEXO III – Gráficos e tabelas relativos à análise estatística para o ensaio citotoxicidade de panobinostat e respectivas formulações de lipossomas com e sem folatos em CLBL-1

Teste de normalidade Shapiro-Wilk para as diferentes formulações de panobinostat

	Valor de p
Panobinostat	0,157
Lipossoma Panobinostat	0,055
Lipossoma Panobinostat com folatos	0,185

Distribuição dos valores IC₅₀ relativos a panobinostat livre, panobinostat encapsulado em lipossomas PEG e panobinostat encapsulado em lipossomas PEG com folatos.

	IQR ¹	0%	25%	50%	75%	100%
Panobinostat	3,40	17,58	17,89	18,20	21,29	24,39
Lipossoma panobinostat	4,25	12,07	12,16	12,25	16,41	20,58
Lipossoma panobinostat com folatos	1,081	8,59	9,55	10,52	10,64	10,75

¹ – IQR: Intervalo interquartis

Intervalos de confiança do teste de *Tukey* para comparação de múltiplas médias.

	Estimativa	Inferior ¹	Superior ¹
Lipossoma panobinostat - folatos	0,165	-0,070	0,400
Panobinostat - folatos	0,302	0,067	0,537
Panobinostat - lipossoma panobinostat	0,136	-0,099	0,371

¹ – valores de limite superior e inferior calculados relativamente ao desvio padrão

Gráfico do nível de confiança para cada associação de fármacos no teste *Tukey*
95% family-wise confidence level

