



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

SAMARA BONESSO DOS REIS

DETERMINAÇÃO DOS MECANISMOS MOLECULARES DA
LIBERAÇÃO INTRACELULAR DE DOXORRUBICINA
CARREADA EM LIPOSSOMAS SENSÍVEIS E NÃO SENSÍVEIS
AO pH

DETERMINATION OF THE MOLECULAR MECHANISMS OF
INTRACELLULAR RELEASE OF DOXORUBICIN
ENCAPSULATED IN pH-SENSITIVE AND pH NON-SENSITIVE
LIPOSOMES

CAMPINAS

2019

SAMARA BONESSO DOS REIS

**DETERMINAÇÃO DOS MECANISMOS MOLECULARES DA
LIBERAÇÃO INTRACELULAR DE DOXORRUBICINA CARREADA EM
LIPOSSOMAS SENSÍVEIS E NÃO SENSÍVEIS AO pH**

**DETERMINATION OF THE MOLECULAR MECHANISMS OF
INTRACELLULAR RELEASE OF DOXORUBICIN ENCAPSULATED IN
pH-SENSITIVE AND pH NON-SENSITIVE LIPOSOMES**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do Título de Mestra em
Biologia Funcional e Molecular, na área de
Bioquímica.*

*Dissertation presented to the Institute of Biology
of the University of Campinas in partial
fulfillment of the requirements for the degree of
Master in Functional and Molecular Biology, in
the area of Biochemistry.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE
À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA SAMARA
BONESSO DOS REIS E ORIENTADA PELO
PROF. DR. MARCELO BISPO DE JESUS.

Orientador: PROF. DR. MARCELO BISPO DE JESUS

**CAMPINAS
2019**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

R277d Reis, Samara Bonesso dos, 1987-
Determinação dos mecanismos moleculares da liberação intracelular de doxorubicina carregada em lipossomas sensíveis e não sensíveis ao pH / Samara Bonesso dos Reis. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Marcelo Bispo de Jesus.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Nanotecnologia. 2. Lipossomas. 3. Doxorubicina. 4. Membranas intracelulares. 5. Apoptose. I. Jesus, Marcelo Bispo de, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Determination of the molecular mechanisms of intracellular release of doxorubicin encapsulated in pH-sensitive and pH non-sensitive liposomes

Palavras-chave em inglês:

Nanotechnology

Liposomes

Doxorubicin

Intracellular membranes

Apoptosis

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Marcelo Bispo de Jesus [Orientador]

Alessandra Gambero

Murilo Vieira Geraldo

Data de defesa: 30-08-2019

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-3511-158X>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2486254775926014>

Campinas, 30 de agosto de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Bispo de Jesus

Profa. Dra. Alessandra Gambero

Prof. Dr. Murilo Vieira Geraldo

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.
(Albert Einstein)

AGRADECIMENTO

Primeiramente agradeço a Deus por essa oportunidade de crescimento.

A minha família por todo apoio, suporte e compreensão que cada um pode oferecer.

Especialmente ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Bispo de Jesus, por me receber em seu laboratório, pela acolhida, que além da orientação científica, dos ensinamentos e discussões teóricas e práticas, teve toda a paciência e compreensão com minhas dificuldades. Obrigada por ter me corrigido quando necessário e em sempre me motivar.

Ao Prof. Dr. André Luís Branco de Barros por gentilmente nos fornecer os lipossomas.

Ao Prof. Dr. Carlos Bonafé pela amizade.

A banca de qualificação pelas contribuições, Dra. Eneida de Paula, Dra. Cristina Pontes Vicente e Dra. Catarina Rapôso Dias Carneiro.

Aos amigos e colegas de laboratório (NanoCell e colaboradores) por termos dividido os momentos bons e superado os momentos de dificuldades. Em especial ao Guilherme, a Tuanny, a Simone, ao Luiz e a técnica Juliana.

A mestrandia Fernanda Garcia Fossa, que além das discussões teóricas, práticas, agradeço pela amizade, companheirismo, apoio e incentivo nessa jornada.

Aos amigos, colegas, companheiros, alunos, professores, técnicos, que cruzaram comigo nessa jornada.

Agradeço, de forma especial, aos professores do programa de pós-graduação Bioquímica Funcional e Molecular.

Agradeço ao programa de pós-graduação da Biologia Funcional e Molecular e todo seu time de funcionários. Agradeço a FAEPEX (processo 3097/17) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Proc. #2014/03002-7) pelo apoio financeiro.

RESUMO

A nanomedicina consiste basicamente no uso de elementos em escala nanométrica para curar, diagnosticar ou prevenir doenças. Uma estratégia abordada para a entrega de fármaco no tecido intersticial de tumores ou no citoplasma de células tumorais é o encapsulamento em lipossomas. Esses são capazes de modificar as propriedades farmacocinéticas dos agentes terapêuticos, aumentando sua especificidade e diminuindo sua toxicidade, como as da doxorubicina, um quimioterápico capaz de acumular tanto nos tecidos tumorais como nos tecidos saudáveis, causando diversos efeitos colaterais. A partir de resultados *in vivo* utilizando lipossoma sensível ao pH para o carreamento de doxorubicina (SpHLdoxo), observou-se que a formulação SpHLdoxo acumulou-se em níveis maiores em comparação com a formulação lipossomal não sensível ao pH (nSpHLdoxo). Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar os mecanismos moleculares *in vitro* da liberação intracelular de doxorubicina carregada por lipossomas sensíveis ao pH (SpHL) comparando com não sensíveis ao pH (nSpHL) e com a doxorubicina livre em células HeLa. A formulação SpHLdoxo apresentou um maior efeito tóxico frente as células HeLa que o nSpHLdoxo no período de 24 horas, e um IC₅₀ similar a doxorubicina livre. Da mesma forma, a internalização das formulações doxorubicina livre e SpHLdoxo foram internalizadas em menos tempo do que a nSpHLdoxo, entretanto a intensidade do sinal do fármaco livre foi maior. Através do ensaio de endocitose constatou-se que não há uma via específica de internalização para as formulações. A formulação SpHLdoxo, apresentou uma liberação intracelular comparável aos de doxorubicina livre. Outra vantagem observada, foi que um disparo da via de apoptose mais intenso no tratamento com SpHLdoxo em relação a doxorubicina livre e nSpHLdoxo, avaliado pela ativação de caspase-3. Sendo assim, o SpHLdoxo pode ser uma alternativa promissora para a efetiva entrega da doxorubicina ao tecido tumoral.

Palavras-chave: nanotecnologia, lipossoma, doxorubicina, HeLa, tráfego intracelular, apoptose.

ABSTRACT

Nanomedicine consists in the use of nanoscale elements to cure, diagnose, or prevent diseases. One approach addressed for drug delivery in the interstitial tissue of tumors, or the cytoplasm of tumor cells is the encapsulation in liposomes. These are capable of modifying the pharmacokinetic properties of the therapeutic agents, increasing their specificity and reducing their toxicity, such as doxorubicin, a chemotherapeutic capable of accumulating in both tumor and healthy tissues, causing several side effects. From *in vivo* results using pH-sensitive liposome for carrying doxorubicin (SpHLdoxo), it was observed that the SpHLdoxo formulation accumulated at higher levels compared to the non-pH-sensitive liposomal formulation (nSpHLdoxo). Therefore, this work aimed was to investigate the *in vitro* molecular mechanisms of intracellular release of doxorubicin from pH-sensitive liposomes (SpHL) compared to non-pH-sensitive liposomes (nSpHL) and free doxorubicin in HeLa cells. The SpHLdox formulation showed higher cytotoxicity on HeLa cells than nSpHLdox within 24 hours, and an IC_{50} similar to free doxorubicin. Similarly, the internalization of the free doxorubicin and SpHLdoxo formulations were faster than nSpHLdoxo; however, the free drug signal intensity was higher. Endocytosis studies found that there is no preferred route for the internalization pH-sensitive and non-pH-sensitive formulations. The intracellular release of SpHLdoxo was comparable to the free doxorubicin. Another advantage observed was that cells treated with SpHLdoxo triggered apoptosis more intensely than cells treated with doxorubicin or nSpHLdoxo, assessed by immunostaining of caspase-3 cleavage. Therefore, SpHLdoxo may be a promising alternative for effective delivery of doxorubicin to tumor tissue.

Key-words: nanotechnology, liposome, doxorubicin, HeLa, intracellular traffic, apoptosis.

Lista de ilustrações

| | |
|---|----|
| FIGURA 1. COMPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS EM ESCALA NANOMÉTRICA. | 15 |
| FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM LIPOSSOMA..... | 16 |
| FIGURA 3. ESTRUTURA QUÍMICA DAS MOLÉCULAS QUE CONSTITUEM O LIPOSSOMA SENSÍVEL AO PH. (A) DOPE, (B) DSPE-PEG 2000 E (C) CHEMS. | 18 |
| FIGURA 4. FASE HEXAGONAL E LAMELAR DO LIPOSSOMA SENSÍVEL AO PH. | 19 |
| FIGURA 5. ESQUEMA DA FORMAÇÃO DAS FASES LAMELAR E HEXAGONAL DA DOPE EM LIPOSSOMAS..... | 20 |
| FIGURA 6. ESTRUTURA DA DOXORRUBICINA. | 21 |
| FIGURA 7. MORFOLOGIA DAS CÉLULAS HELA AVALIADA POR MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE. | 31 |
| FIGURA 8. PRINCIPAIS VIAS DE ENDOCITOSE DE NANOPARTÍCULAS EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS. | 24 |
| FIGURA 9. POSSÍVEIS DIREÇÕES ENVOLVIDAS NO TRÁFEGO INTRACELULAR DAS NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS EM CÉLULAS EUKARIONTES. | 26 |
| FIGURA 10. VIA INTRÍNSECA E VIA EXTRÍNSECA DA APOPTOSE..... | 28 |
| FIGURA 11. CITOTOXICIDADE DA DOXORRUBICINA LIVRE EM CÉLULAS DE CÂNCER HELA. | 47 |
| FIGURA 12. CITOTOXICIDADE DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAS VAZIAS EM CÉLULAS DE CÂNCER HELA. | 48 |
| FIGURA 13. CITOTOXICIDADE DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAS CONTENDO DOXORRUBICINA EM CÉLULAS DE CÂNCER HELA..... | 48 |
| FIGURA 14. CITOTOXICIDADE DA DOXORRUBICINA LIVRE EM CÉLULAS DE CÂNCER HELA AVALIADA PELO ENSAIO COM CALCEÍNA, MTT E RESAZURINA RESPECTIVAMENTE..... | 50 |
| FIGURA 15. CITOTOXICIDADE DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAS VAZIAS E FORMULAÇÕES LIPOSSOMAS CONTENDO DOXORRUBICINA EM CÉLULAS DE CÂNCER HELA. | 52 |
| FIGURA 16. IMAGENS REPRESENTATIVAS DA AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE CELULAR EM CÉLULAS HELA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA. | 54 |
| FIGURA 17. CITOTOXICIDADE UTILIZANDO OS IC ₅₀ DOS TRATAMENTOS COM DOXORRUBICINA EM TEMPOS 6, 12 E 24 HORAS..... | 56 |
| FIGURA 18. CINÉTICA DE INTERNALIZAÇÃO DE DIFERENTES FORMULAÇÕES CONTENDO DOXORRUBICINA NO TEMPO EM CÉLULAS HELA. | 58 |
| FIGURA 19. ACÚMULO INTRACELULAR DE DIFERENTES FORMULAÇÕES CONTENDO DOXORRUBICINA NO TEMPO EM CÉLULAS HELA..... | 59 |
| FIGURA 20. ANÁLISE DE DISTRIBUIÇÃO DA INTENSIDADE INTEGRADA DA DOXORRUBICINA EM CÉLULAS HELA. IMAGENS REPRESENTATIVAS..... | 60 |
| FIGURA 21. INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DA DOXORRUBICINA EM CÉLULAS HELA APÓS TRATAMENTO COM AS FORMULAÇÕES. | 61 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 22. INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DA DOXORRUBICINA EM CÉLULAS HELA APÓS TRATAMENTO COM AS FORMULAÇÕES. | 62 |
| FIGURA 23. INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DA DOXORRUBICINA EM CÉLULAS HELA APÓS TRATAMENTO COM AS FORMULAÇÕES. | 63 |
| FIGURA 24. VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS HELA EM PRESENÇA DE INIBIDORES DE ENDOCITOSE: CLORPROMAZINA, FILIPINA III E WORTMANINA. | 65 |
| FIGURA 25. PORCENTAGEM DE INTERNALIZAÇÃO DA DOXORRUBICINA EM CÉLULAS HELA EM PRESENÇA DE INIBIDORES DE ENDOCITOSE. | 66 |
| FIGURA 26. PORCENTAGEM DE INTENSIDADE DA DOXORRUBICINA EM CÉLULAS HELA EM PRESENÇA DE INIBIDORES DE ENDOCITOSE. | 67 |
| FIGURA 27. VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS HELA TRATADAS COM AS FORMULAÇÕES SENSÍVEIS E NÃO SENSÍVEIS AO PH CONTENDO DOXORRUBICINA EM PRESENÇA DE INIBIDORES DE ENDOCITOSE. | 68 |
| FIGURA 28. IMAGENS DA VALIDAÇÃO DO INIBIDOR DE ACIDIFICAÇÃO ENDOSSOMAL CLOROQUINA EM CÉLULAS HELA. | 71 |
| FIGURA 29. VALIDAÇÃO DO INIBIDOR DE ACIDIFICAÇÃO ENDOSSOMAL CLOROQUINA EM CÉLULAS HELA APÓS 0,5 HORA E 4 HORAS. | 72 |
| FIGURA 30. IMAGENS DA VALIDAÇÃO DO INIBIDOR DE ACIDIFICAÇÃO ENDOSSOMAL BAFIOMICINA EM CÉLULAS HELA. | 73 |
| FIGURA 31. VALIDAÇÃO DO INIBIDOR DE ACIDIFICAÇÃO ENDOSSOMAL BAFIOMICINA EM CÉLULAS HELA APÓS 0,5 HORA E 4 HORAS. | 74 |
| FIGURA 32. IMAGENS DA VALIDAÇÃO DO INIBIDOR DE ACIDIFICAÇÃO ENDOSSOMAL 3-METILADENINA (3-MA) EM CÉLULAS HELA. | 75 |
| FIGURA 33. VALIDAÇÃO DO INIBIDOR DE ACIDIFICAÇÃO ENDOSSOMAL 3-MA EM CÉLULAS HELA APÓS 0,5 HORA E 4 HORAS. | 76 |
| FIGURA 34. VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS HELA EM PRESENÇA DOS INIBIDORES DE ACIDIFICAÇÃO ENDOSSOMAL. | 77 |
| FIGURA 35. VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS HELA EM PRESENÇA DE INIBIDORES DE ACIDIFICAÇÃO ENDOSSOMAL (A) CLOROQUINA 20 μ M, (B) BAFIOMICINA 0,5 μ M E (C) 3-MA 2,5 MM. | 78 |
| FIGURA 36. MARCAÇÃO DE IMUNOCITOQUÍMICA DA PROTEÍNA CASPASE-3 CLIVADA EM CÉLULAS HELA, APÓS TRATAMENTO COM AS FORMULAÇÕES. | 80 |
| FIGURA 37. MARCAÇÃO DE IMUNOCITOQUÍMICA DA PROTEÍNA CASPASE-3 CLIVADA EM CÉLULAS HELA, APÓS TRATAMENTO COM AS FORMULAÇÕES. | 81 |
| FIGURA 38. MARCAÇÃO DE IMUNOCITOQUÍMICA DA PROTEÍNA CASPASE-3 CLIVADA EM CÉLULAS HELA, APÓS TRATAMENTO COM AS FORMULAÇÕES. | 82 |
| FIGURA 39. IMAGENS REPRESENTATIVAS DO ACÚMULO NUCLEAR DA DOXORRUBICINA EM CÉLULAS HELA. | 90 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 40. MARCAÇÃO DE IMUNOCITOQUÍMICA DA PROTEÍNA CASPASE-3 CLIVADA EM CÉLULAS HELA, APÓS TRATAMENTO COM O IC ₅₀ DE CADA FORMULAÇÃO. | 91 |
| FIGURA 41. MARCAÇÃO DE IMUNOCITOQUÍMICA DA PROTEÍNA CASPASE 3 CLIVADA EM CÉLULAS HELA, APÓS TRATAMENTO COM O IC ₅₀ DE CADA FORMULAÇÃO. | 92 |
| FIGURA 42. MARCAÇÃO DE IMUNOCITOQUÍMICA DA PROTEÍNA CASPASE 3 CLIVADA EM CÉLULAS HELA, APÓS TRATAMENTO COM O IC ₅₀ DE CADA FORMULAÇÃO. | 93 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| TABELA 1. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS. | 35 |
| TABELA 2. VALORES DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS (IC) EM CÉLULAS HELA TRATADAS COM DOXORRUBICINA LIVRE AVALIADO PELOS MÉTODOS DE REDUÇÃO DE MTT, COM CALCEÍNA E RESAZURINA. | 51 |
| TABELA 3. VALORES DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS (IC) PARA OS TRATAMENTOS COM DOXORRUBICINA LIVRE, NSPHLDOXO E SPHLDOXO UTILIZANDO O MÉTODO DE CALCEÍNA E DE RESAZURINA. | 55 |
| TABELA 4. COMPARAÇÃO ENTRE OS VALORES DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS (ICS) PARA OS TRATAMENTOS COM DOXORRUBICINA LIVRE, NSPHLDOXO E SPHLDOXO UTILIZANDO O MÉTODO DE CALCEÍNA E DE RESAZURINA. | 56 |

Lista de Abreviações

| | |
|------------|--|
| CHEMS | Hemisuccinato de colestera |
| CTCF | Corrected total cell fluorescence |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phenylindole |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| DOPE | Dioleilfosfatidiletanolamina |
| Doxo | Doxorrubicina |
| Doxo livre | Doxorrubicina livre |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| GFP | <i>Green Fluorescent Protein</i> |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| 3-MA | 3-Metiladenina |
| MTT | brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5 difeniltetrazólio |
| nSpHL | Lipossoma não sensível ao pH |
| nSpHLdoxo | Lipossoma não sensível ao pH carreando doxorrubicina |
| P53 | Proteína 53 |
| PBS | <i>Phosphate-buffered saline</i> |
| PE | Fosfatidiletanolamina |
| PEG | Polietilenoglicol |
| PFA | Paraformaldeído |
| ROS | <i>Reactive Oxygen Species</i> |
| SpHL | Lipossoma sensível ao pH |
| SpHLdoxo | Lipossoma sensível ao pH carreando doxorrubicina |
| SFB | Soro Fetal Bovino |

Sumário

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1. NANOTECNOLOGIA | 15 |
| 1.2. LIPOSSOMAS | 16 |
| 1.3. DOXORRUBICINA | 21 |
| 1.4. ENDOCITOSE E O TRÁFEGO INTRACELULAR DE NANOPARTÍCULAS | 23 |
| 1.5. MORTE CELULAR..... | 26 |
| 1.6. MODELO CELULAR..... | 30 |
| 2. OBJETIVOS | 32 |
| 2.1. OBJETIVOS GERAIS | 32 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 32 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 34 |
| 3.1. MATERIAL..... | 34 |
| 3.2. TAMANHO DA NANOPARTÍCULAS E POTENCIAL ZETA | 34 |
| 3.3. CULTURA DE CÉLULAS | 35 |
| 3.4. AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAS EM CÉLULAS HELA | 35 |
| 3.5. DETERMINAÇÃO DAS VIAS DE INTERNALIZAÇÃO PARA O EFEITO CITOTÓXICO DAS FORMULAÇÕES | 39 |
| 3.6. DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE MORTE CELULAR DAS FORMULAÇÕES POR AVALIAÇÃO DE CASPASE-3 CLIVADA | 44 |
| 3.7. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS..... | 45 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 46 |
| 4.1. AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAS EM CÉLULAS HELA | 46 |
| 4.2. AVALIAÇÃO DO ACÚMULO INTRACELULAR E DO MECANISMO DE INTERNALIZAÇÃO DE DOXORRUBICINA POR ENDOCITOSE..... | 57 |
| 4.3. DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE INTERNALIZAÇÃO POR ENDOCITOSE DAS FORMULAÇÕES | 64 |
| 4.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ACIDIFICAÇÃO ENDOSSOMAL NA CITOTOXICIDADE DAS FORMULAÇÕES..... | 68 |
| 4.5. AVALIAÇÃO DA APOPTOSE EM CÉLULAS HELA TRATADAS COM AS FORMULAÇÕES | 78 |
| 5. CONCLUSÃO | 83 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 85 |
| 7. ANEXOS | 90 |
| 7.1. ACÚMULO NUCLEAR DA DOXORRUBICINA EM CÉLULAS HELA | 90 |
| 7.2. MARCAÇÃO DE IMUNOCITOQUÍMICA DA PROTEÍNA CASPASE-3 CLIVADA EM CÉLULAS HELA EM TEMPOS | 91 |
| 7.3. DECLARAÇÃO DE BIOÉTICA E BIOSSEGURANÇA..... | 94 |
| 7.4. DECLARAÇÃO DE AUTORIA E CO-AUTORIA | 95 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. NANOTECNOLOGIA

A *nanotecnologia* é o conhecimento de materiais em escala nanométrica (1-100 nm – Figura 1) e envolve imagem, medição, modelagem e manipulação de materiais nesse âmbito. Desde o seu surgimento, a nanotecnologia revolucionou uma ampla gama de produtos médicos, equipamentos de biotecnologia e componentes para diversas áreas de pesquisa como agricultura, eletrônica, mecânica e medicina. É destacável para seu uso na medicina, junção denominada *nanomedicina*, que apresenta diversos avanços biomédicos no desenvolvimento de carreadores de fármacos e biomarcadores que auxiliam no diagnóstico e tratamento de doenças (Ivask et al. 2018).

O desenvolvimento de nanomateriais têm se aprimorado cada vez mais, possibilitando a obtenção de partículas mais estáveis (livres de autoagregação) e purificadas, reduzindo os custos de produção e tornando-as mais acessíveis para a pesquisa e desenvolvimento. Na mesma medida, cada vez mais as aplicações da *nanomedicina* chegam ao cotidiano das pessoas. Milhares de toneladas de nanomateriais são produzidos anualmente e é quase impossível determinar quantos produtos contendo nanomateriais estão atualmente disponíveis no mercado (Su et al. 2018).

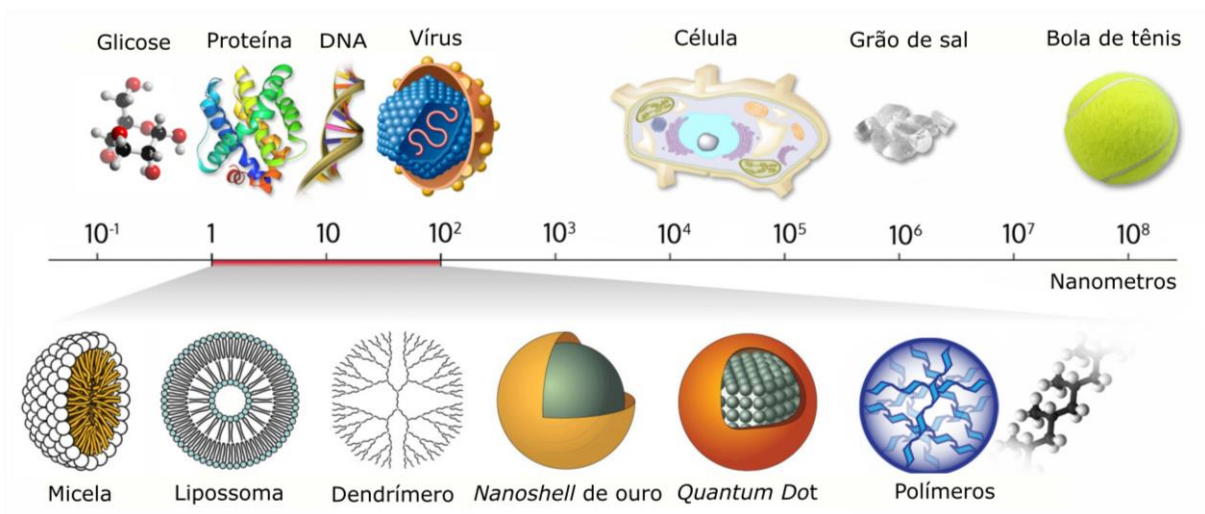


Figura 1. Comparação das nanopartículas em escala nanométrica. Fonte: Wichlab, 2019.

A *nanomedicina* voltada às pesquisas de nanoencapsulação de fármacos, macromoléculas e proteínas é de grande interesse tanto para a indústria farmacêutica como para a indústria biotecnológica (Bertrand et al. 2014). Há vários tipos de nanopartículas que são utilizadas para esse fim, tais como lipossomas, dendrímeros, *quantum dots*, nanotubos de carbono, nanopartículas metálicas, nanofios, entre outras (Akhter et al. 2018). A aplicação da nanotecnologia em sistemas carreadores de fármacos tem apresentado diversificada melhoria na farmacocinética de compostos, diminuição na toxicidade e de outros efeitos adversos e aumento na solubilidade (Miyazaki et al. 2018).

1.2. LIPOSSOMAS

Lipossomas são vesículas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso. Os lipossomas são constituídos por moléculas anfifílicas sendo capazes de encapsular substâncias hidrofílicas, lipofílicas e anfifílicas, que são acomodadas no centro aquoso (cloridrato de doxorrubicina, o fármaco neste presente estudo), na bicamada lipídica ou na interface, respectivamente, Figura 2 (Lombardo et al. 2016).

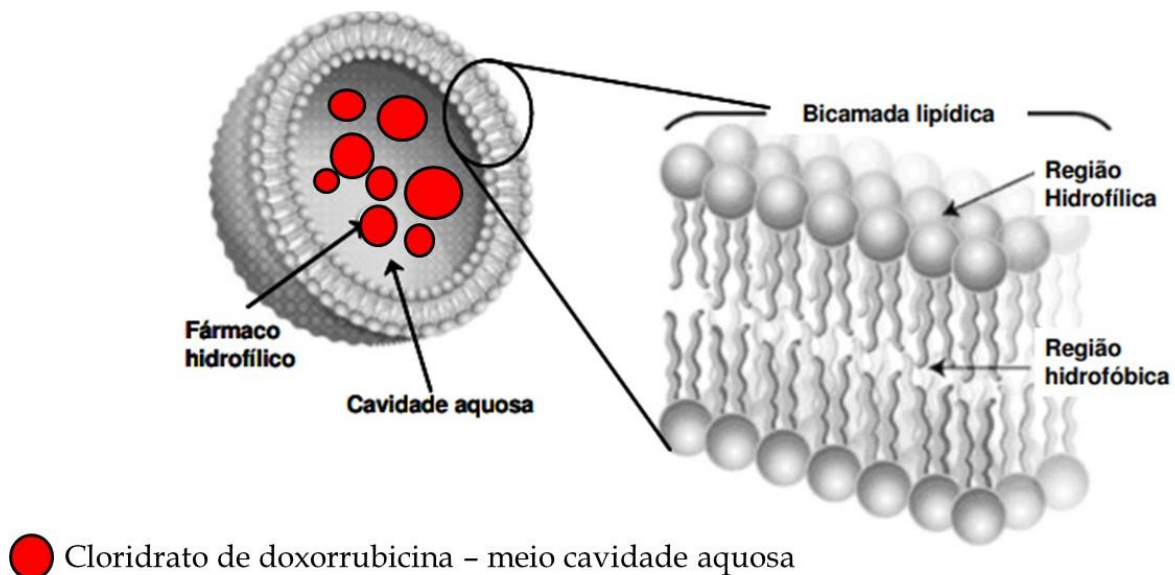


Figura 2. Representação esquemática de um lipossoma e o local onde o princípio ativo cloridrato de doxorrubicina (hidrofílico) é acomodado. Modificado de Leite, 2010.

Os primeiros lipossomas desenvolvidos para o carreamento de fármacos eram formados por fosfolipídios e colesterol, chamados de convencionais, que ao entrarem no organismo eram reconhecidos rapidamente, opsonizados e eliminados da circulação sistêmica pelo sistema fagocitário mononuclear (fígado, baço e medula óssea), tendo assim cinética pouco favorável e potencial toxicidade a estes órgãos (Silva et al. 2016). Esses lipossomas foram alterados e evoluídos em sua estrutura básica para possibilitar aplicação terapêutica mais eficiente, sendo também classificados quanto às características de interação com sistemas biológicos (Allen e Cullis 2013; Kraft et al. 2014).

O aperfeiçoamento desses lipossomas levou ao desenvolvimento de novas formulações, como por exemplo lipossomas responsivos a estímulos, lipossomas termo-sensíveis, lipossomas furtivos peguilados, imunolipossomas, lipossomas catiônicos (lipoplexos), lipossomas fusogênicos e os lipossomas sensíveis ao pH (Tila et al. 2015). Neste trabalho, foram utilizados os lipossomas sensíveis e não sensíveis ao pH.

Os lipossomas não sensíveis ao pH são constituídos por fosfolipídios hidrogenados de fosfatidilcolina de soja (HSPC), distearoilfosfatidil-etanolamina polietilenoglicol2000 (DSPE-PEG 2000) e o colesterol (CHOL). A presença de DSPE-PEG 2000 em bicamadas dos lipossomas resulta em aumento do tempo de circulação sanguínea, prevenindo o reconhecimento e consequente associação com as opsoninas no plasma, inibindo o processo de reconhecimento molecular e a captura pelas células do sistema fagocitário mononuclear, aumentando o aporte de fármaco na região de interesse (Allen e Cullis 2013; Silva et al. 2016).

Os lipossomas sensíveis ao pH são constituídos por dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), hemisuccinato de colesterilo (CHEMS) e polietilenoglicol 2000 de distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE-PEG 2000) (Figura 3).

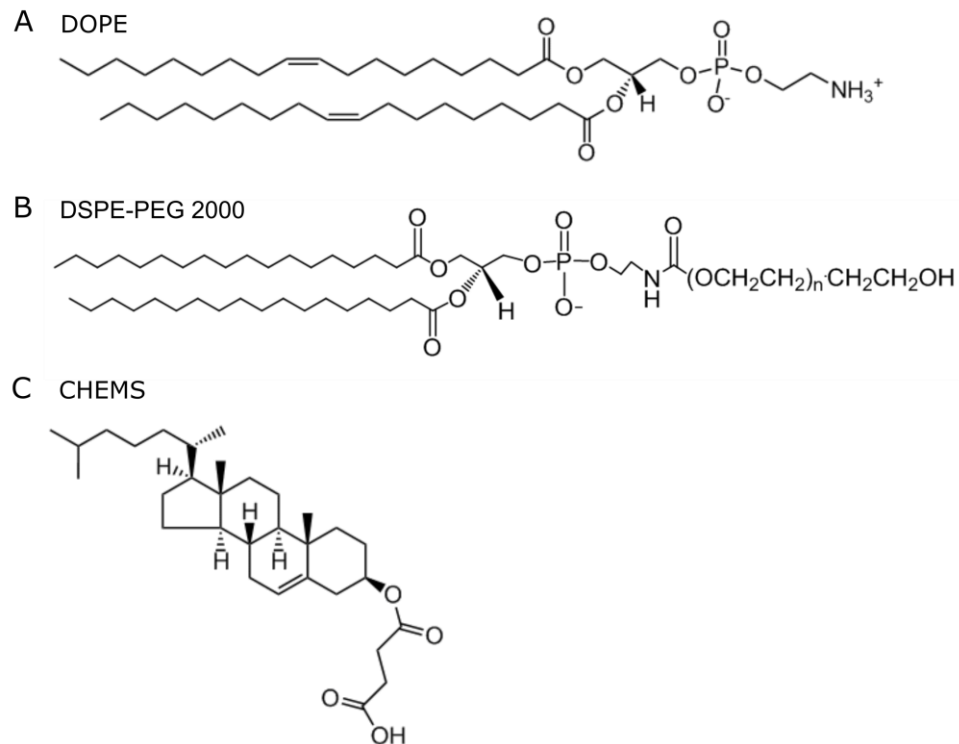


Figura 3. Estrutura química das moléculas que constituem o lipossoma sensível ao pH. (A) DOPE, (B) DSPE-PEG 2000 e (C) CHEMS.

Em meio aquoso e temperatura ambiente, moléculas de DOPE organizam-se sob a forma hexagonal (H_{II}), sendo incapazes de formar vesículas. Para a formação dessas vesículas faz-se necessário a adição de agentes estabilizantes que são normalmente lipídios carboxilados como o CHEMS ($pK_a = 5,8$), que em pH fisiológico se encontram sob a forma ionizada. O CHEMS insere-se entre as moléculas do DOPE agindo como um estabilizante. As repulsões eletrostáticas entre os grupamentos carboxila do CHEMS e os grupos fosfato do DOPE favorecem a organização lamelar, possibilitando a formação dos lipossomas, Figura 4 (Silva et al. 2016).

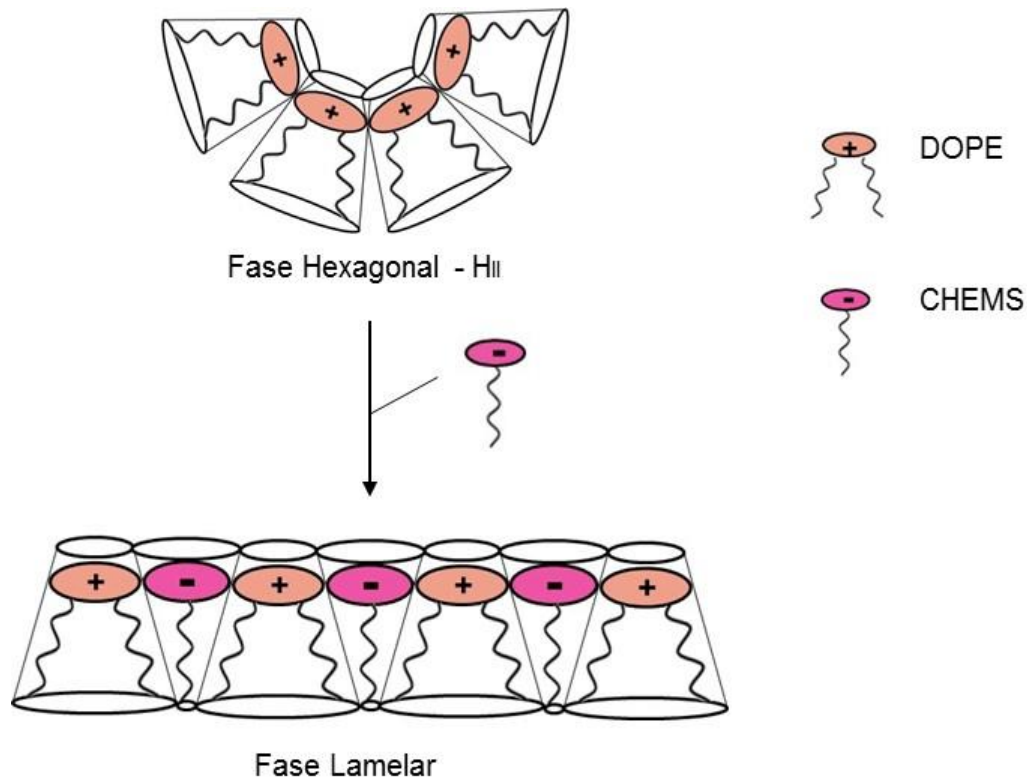


Figura 4. Fase hexagonal e lamelar do lipossoma sensível ao pH.

O DOPE é indispensável para formar bicamadas lipossômicas a um pH fisiológico, onde permanece em sua forma estável (fase lamelar). No entanto, quando endocitado pelas células de câncer, há a diminuição do pH dentro dos endossomos e protonação dos grupos carboxílicos das moléculas de CHEMS. Essa protonação causa o retorno das moléculas do DOPE para a fase H_{II} ocasionando a liberação do material encapsulado (Figura 5). Além disso, há a presença de DSPE-PEG 2000, o mesmo componente do lipossoma não sensível ao pH citado acima, que previne o reconhecimento e consequente associação com as opsoninas no plasma, inibindo o processo de reconhecimento molecular e a captura pelas células do sistema fagocitário mononuclear, aumentando o aporte de fármaco na região de interesse (Silva et al. 2016; Vieira e Gamarra 2016).

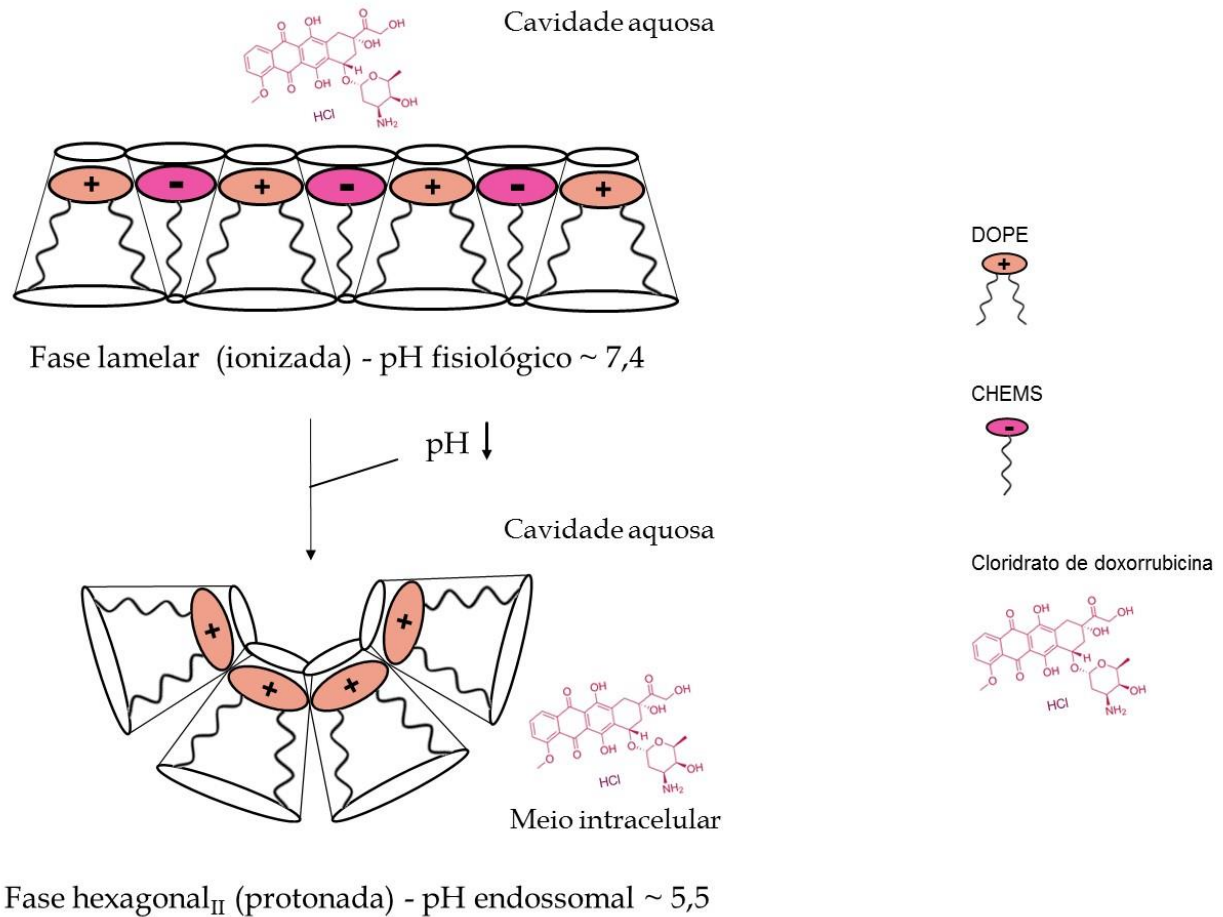


Figura 5. Esquema da formação das fases lamelar e hexagonal da DOPE em lipossomas.

Os lipossomas são uma estratégia interessante para aumentar a concentração de fármaco no tecido de interesse, já que possuem em média o tamanho de 50 a 500 nm (os elencados nesse trabalho possuem entre 114 e 136 nm). Ao contrário dos tecidos saudáveis, a vasculatura tumoral apresenta grandes fenestrações que permitem o extravasamento de macromoléculas ou nanopartículas através dos vasos sanguíneos do tumor. Os tecidos tumorais apresentam outra característica fisiopatológica, a alta atividade proliferativa das células tumorais que impede a nutrição e oxigenação adequada de todo tecido. Além disso, o tecido tumoral é pobre em drenagem linfática, o que permite a retenção prolongada dos lipossomas favorecendo sua absorção. Essas características favorecem um acúmulo da concentração de fármacos na área do tumor, mecanismo conhecido como “permeabilidade e retenção aumentada (EPR)” (Matsumura e Maeda 1986; Torchilin 2011; Maeda, Nakamura, e Fang 2013; Vieira e

Gamarra 2016). As áreas de hipóxia, associadas a intensos processos de glicólise anaeróbica e baixa vascularização, promovem mudanças no ambiente tumoral, gerando um gradiente de pH em relação aos tecidos saudáveis, que podem aumentar seletivamente a liberação de fármaco nessa região por nanoestruturas pH-sensíveis (Heinrich et al. 2016; Miyazaki et al. 2018).

1.3. DOXORRUBICINA

A doxorubicina é um antibiótico antraciclínico citotóxico, utilizado como agente antineoplásico (Figura 6) que é amplamente empregado no tratamento de vários carcinomas humanos, incluindo câncer do colo do útero, câncer de mama, leucemia linfoblástica aguda, linfoma (McGowan et al. 2017).

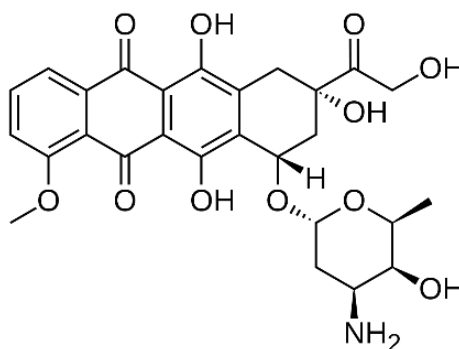


Figura 6. Estrutura da doxorubicina.

A doxorubicina tem como principal mecanismo de ação integrar-se na hélice de fita dupla do DNA formando uma estrutura complexa estável impedindo a replicação e síntese do RNA (Huang et al. 2018). O mecanismo de ruptura do DNA também está relacionado com a ligação da doxorubicina à enzima topoisomerase II, impedindo sua ação de reparo do DNA. Além da inibição dessa enzima, outro mecanismo proposto para ação do fármaco é a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*). A atividade anticancerígena da doxorubicina está associada à elevação de ROS intracelular. A exposição das células a doxorubicina e outras antraciclínicas causa lesão ao DNA, que resulta na ativação da p53, ativando a via das caspases, levando a morte celular por apoptose (Barenholz 2012; de Oliveira Silva et al. 2018; Song et al. 2015; Vijay et al. 2018).

Apesar da alta atividade contra vários tipos de carcinomas humanos, a doxorubicina possui baixa especificidade, conduzindo o acúmulo indesejável em tecidos saudáveis e conseqüentemente causando efeitos citotóxicos graves (Olusanya et al. 2018). Essa toxicidade leva a vários efeitos adversos como náuseas e vômitos, alopecia, mucosite, mielossupressão e a cardiotoxicidade, este último irreversível, fazendo seu tratamento se tornar dose-limitante (Pugazhendhi et al. 2018; Vijay et al. 2018). Devido a essa gama de efeitos tóxicos, tem-se desenvolvido sistemas de entrega de fármacos, para melhorar a especificidade e biodistribuição, diminuir a toxicidade e modificar o perfil farmacocinético de agentes terapêuticos. Sendo assim, a encapsulação da doxorubicina em lipossomas provou ser um método atraente para a redução da sua cardiotoxicidade (Olusanya et al. 2018).

Em meados da década de 1990 o *Food and Drug Administration* (FDA) o órgão governamental dos Estados Unidos responsável pelo controle de novos produtos no mercado americano, aprovou uma formulação lipossomal de doxorubicina utilizada para o tratamento de vários tipos de câncer, o Doxil® (Kraft et al. 2014; Pandey et al. 2016), o primeiro medicamento comercializado à base de lipossomas PEGlados (Barenholz 2012; Jabir et al. 2018). Na forma encapsulada, o efeito cardiotóxico da doxorubicina diminuiu e sua meia vida no organismo foi aumentada, tornando assim seu uso mais seguro (Akhter et al. 2018).

A partir da encapsulação lipossomal de doxorubicina, foi realizado um estudo *in vivo* para a elaboração de uma nova formulação lipossomal sensível ao pH contendo doxorubicina (SpHLdoxo). Essa formulação tem a finalidade de melhorar a absorção do fármaco no tumor, pois a proliferação celular rápida promove alterações no microambiente intratumoral, transformando o pH desta área mais ácido em comparação ao pH do tecido saudável. Isto sugere que o SpHLdoxo, pode ser uma alternativa promissora para efetiva entrega de fármacos antineoplásicos (Silva *et al.*, 2016).

1.4. ENDOCITOSE E O TRÁFEGO INTRACELULAR DE NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas podem ser administradas ao corpo humano por diversas vias como endovenosa, tópica, respiratória, entre outras, e independente da via administrada, as nanopartículas entrarão em contato com células de diversos tecidos do organismo. Por isso, a compreensão das interações entre as nanopartículas com células eucariontes é cada vez mais importante devido sua crescente aplicação (de Jesus e Kapila 2014; Ferreira et al. 2014; Radaic et al. 2016).

Estudos demonstram que a interação celular com nanopartículas é mediada pelo processo de endocitose (Ferreira et al. 2014; Allan Radaic et al. 2016). Este processo é subdividido em diferentes vias de internalização sendo eles, endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolina, macropinocitose e as vias independentes e clatrina e caveolina, que se encontram detalhadamente revisadas pelo nosso grupo (Figura 7) (Allan Radaic et al. 2016).

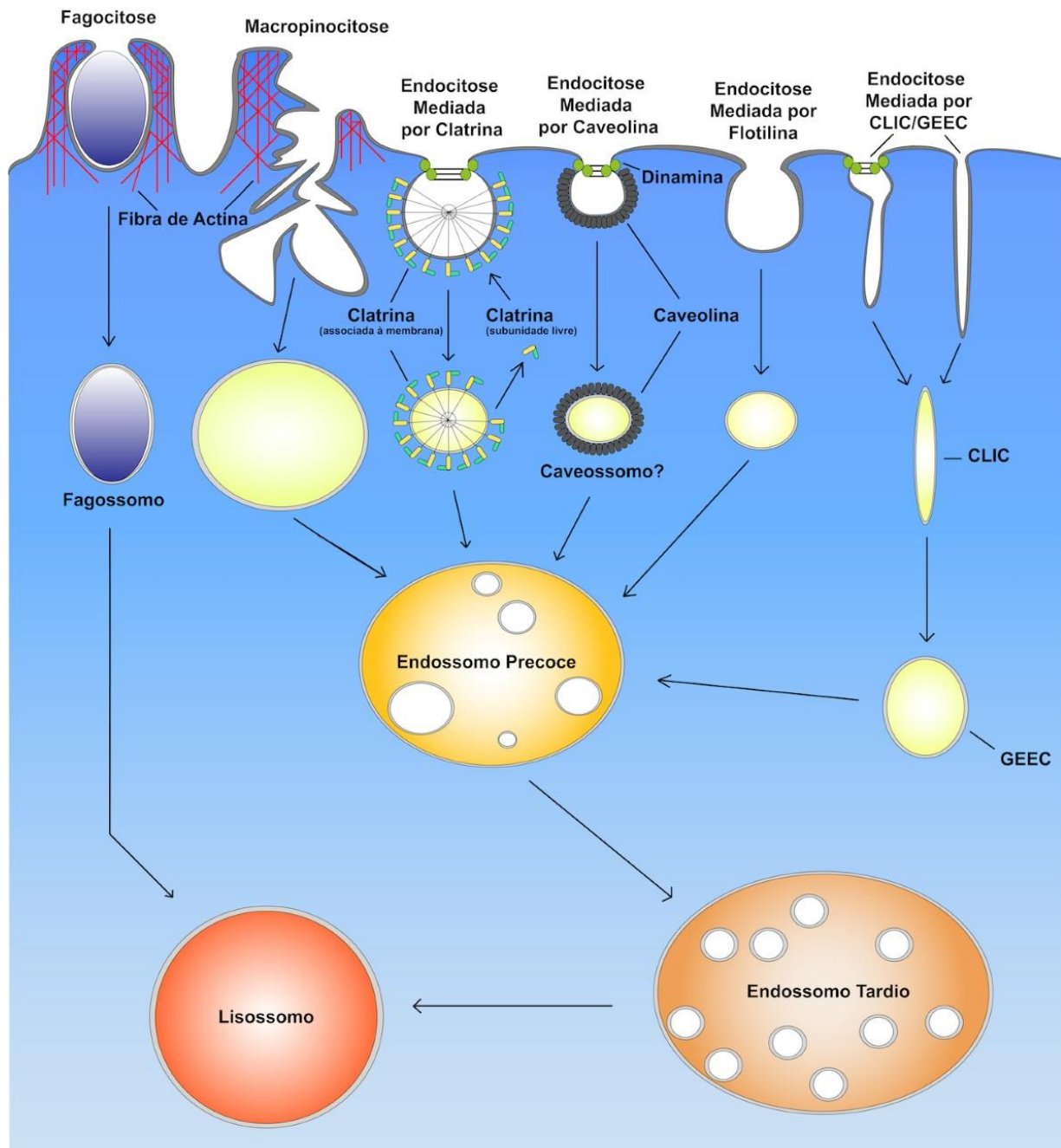


Figura 7. Principais vias de endocitose de nanopartículas em células eucarióticas. A etapa inicial representa as principais vias de endocitose usadas para o estudo da internalização de partículas, que tem como consequência a formação de vesículas intracelulares - fagocitose, macropinocitose, endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolina e endocitose clatrina e caveolina independentes (flotilina e CLIC/GEEC). A segunda etapa representa a via clássica de tráfego intracelular que envolve o processamento das nanopartículas a partir do amadurecimento do endossomo precoce, com destino à degradação lisossomal do material endocitado (Ferreira 2015).

Ao serem internalizadas, as nanopartículas são englobadas por uma vesícula intracelular constituída de parte da membrana, classificada como endossomo precoce. Posteriormente, ocorre a formação do endossomo tardio com destino à degradação lisossomal do material endocitado. Esta via é considerada a rota clássica, porém não é a única via de internalização de nanomateriais (Ferreira et al. 2014; de Jesus e Kapila 2014). Algumas nanopartículas podem levar a degradação lisossomal e liberação de seus constituintes (e.g., catepsinas) no citoplasma que podem causar danos intracelulares, como danos às proteínas, às membranas biológicas e ao DNA, podendo levar a morte celular (Figura 8).

Após internalizadas, as nanopartículas podem atingir diversos alvos intracelulares, como o complexo de Golgi, núcleo, mitocôndria, entre outros. Porém, há que se levar em consideração que a internalização de nanomateriais é dependente dos fatores físico-químicos da matriz destes materiais, tais como tamanho, composição química, carga eletrostática superficial, capacidade de adsorção da superfície, dentre outros fatores (Fichter et al. 2013; Yameen et al. 2014). Além de ser um fenômeno célula-dependente, muito relacionado com a biologia da célula utilizada (de Jesus e Kapila 2014).

A compreensão da internalização de nanopartículas e seu processo intracelular são de extrema importância, pois permite elucidar o mecanismo de ação biológica destas partículas, determinando sua eficiência e possível toxicidade (de Jesus e Kapila 2014).

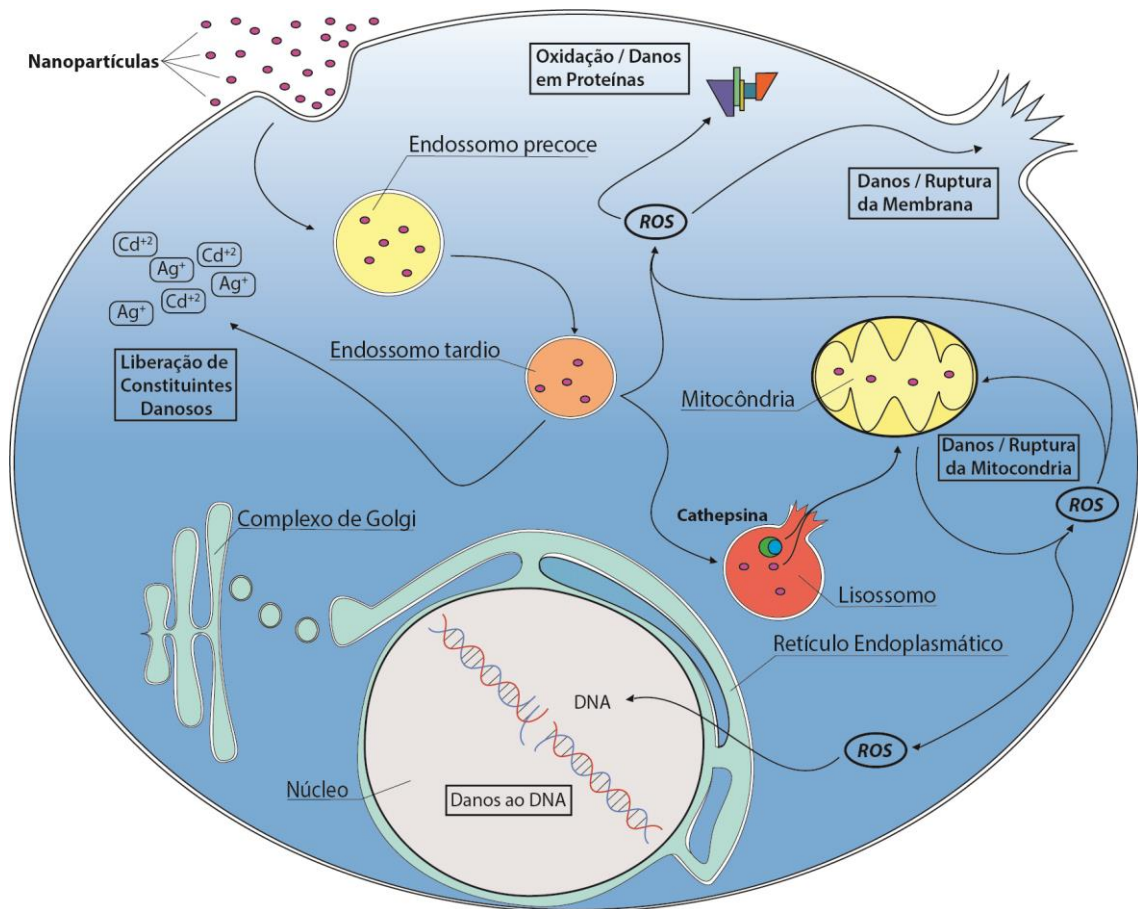


Figura 8. Possíveis direções envolvidas no tráfego intracelular das nanopartículas lipídicas em células eucariotas. A figura mostra os principais efeitos tóxicos desencadeados por nanomateriais em células eucarióticas (Allan Radaic et al. 2016).

1.5. MORTE CELULAR

A partir de 2005, o Comitê de Nomenclatura sobre a morte celular (NCDD) se reuniu para definir as principais modalidades de morte celular em um contexto genético, bioquímico, farmacológico e funcional (em vez de morfológico). O mesmo comitê define alguns tipos de morte celular, tais como apoptose intrínseca ou extrínseca, necrose de transição de permeabilidade mitocondrial (MPT), necroptose, ferroptose, piroptose, partanatos, morte celular entótica, morte celular NETotic, morte celular dependente de lisossomo, morte celular dependente de autofagia, célula imunogênica morte, senescência celular e catástrofe mitótica (Galluzzi et al. 2018).

Dentre os tipos de morte celular, a apoptose se destaca sendo a mais conhecida e estudada sendo um alvo promissor para a terapia antineoplásica, pois

cl clinicamente quimioterápicos são capazes de induzir as células a cometerem suicídio programado por causa de estímulos internos ou externos, ou seja uma morte mais similar ao mecanismo natural da morte celular (Brown e Attardi 2005; Chung 2018; Claire Pfeffer e Amareshwar Singh 2018).

A apoptose é uma forma de morte celular programada, reconhecida morfológicamente como um fenômeno distinto há mais de 30 anos. É altamente conservada e regulada, o que é crucial para o desenvolvimento normal e da homeostase celular. As alterações morfológicas típicas da apoptose são encolhimento celular, fragmentação do DNA, condensação da cromatina e formação do "corpo apoptótico" que permite sua remoção por fagocitose (Blanco, A., & Blanco, G. 2017; Galluzzi et al. 2018). O processo apoptótico começa a partir de duas vias de sinalização canônicas, a extrínseca e intrínseca como demonstrado na Figura 9.

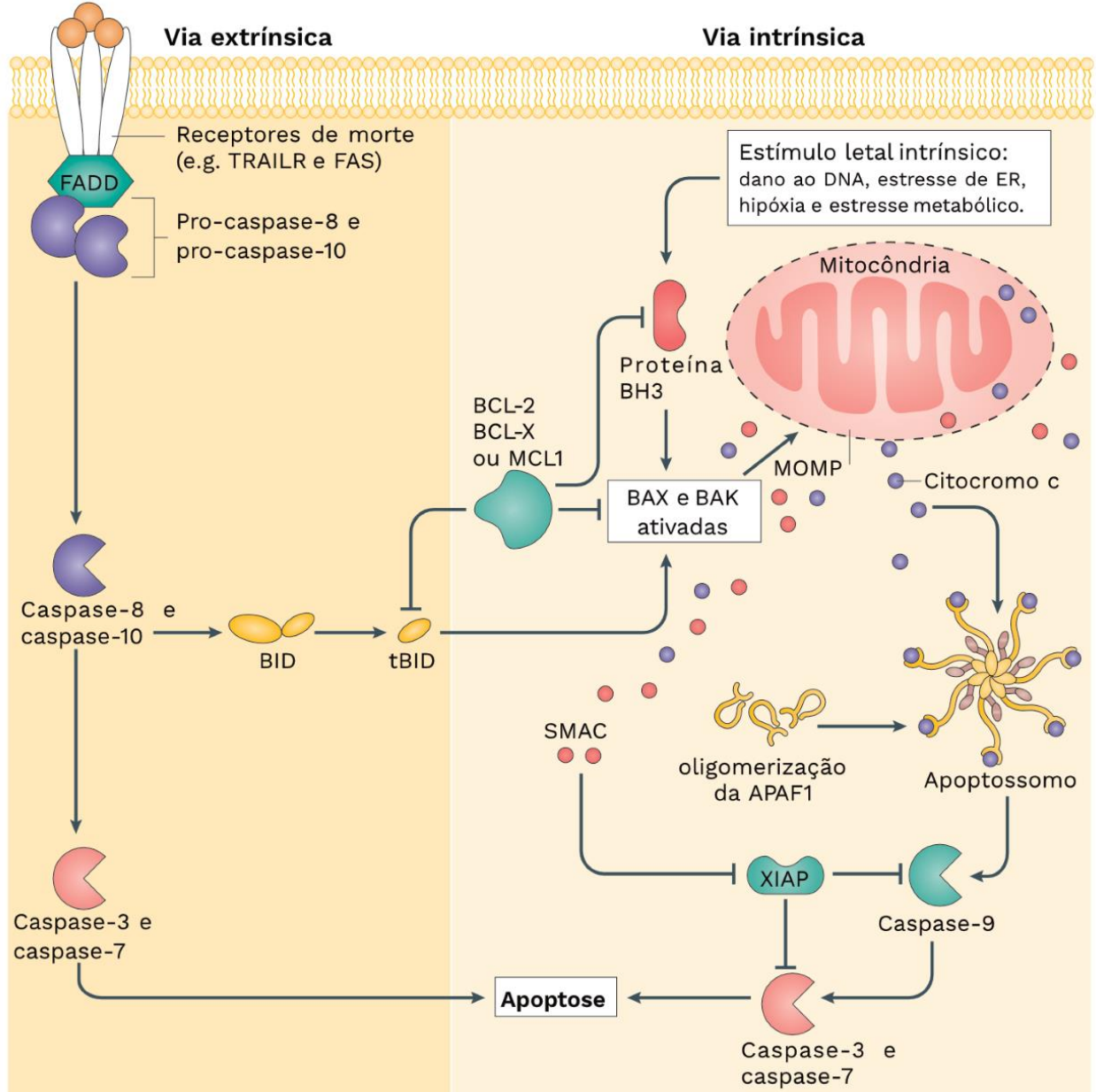


Figura 9. Via intrínseca e via extrínseca da apoptose. A apoptose pode ser iniciada por sinais provenientes da membrana plasmática através da ligação do receptor de morte (via extrínseca) ou da mitocôndria (via intrínseca). A estimulação da via extrínseca pelo TRAIL resulta na agregação do receptor TRAIL (TRAIL-R) e na formação do disco, no qual a pro-caspase-8 se torna ativada e inicia a apoptose por clivagem direta de caspases. A via intrínseca é regulada pela família de proteínas BCL-2, que regulam a formação de poros na membrana mitocondrial externa e a liberação de fatores apoptogênicos como o citocromo c ou SMAC da mitocôndria. A liberação do citocromo c no citosol desencadeia a ativação da caspase-9 através da formação do complexo de apoptossomo contendo o citocromo c / Apaf-1 / caspase-9. O SMAC promove a ativação da caspase através da neutralização do efeito inibitório dos IAPs (Modificado de Ichim e Tait 2016).

Na via extrínseca, o ligante de morte (e.g., FasL, TNF- α , TRAIL) com seus receptores induzem recrutamento e ativação de caspase-8, que subsequentemente ativa as caspases efetoras como a caspase-3. Já a via intrínseca é mediada pela liberação mitocondrial do citocromo c. Este processo é regulado pelos constituintes da família Bcl-2, que inclui três grupos: anti-apoptóticos Bcl-2, Bcl-XL e Mcl-1; os pró-apoptóticos Bax e Bak; e o grupo das proteínas de domínio BH3 como Bad, Bid, Nix e BNip3. Estes últimos colaboram com a apoptose através da via de inibição de proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas ou ativação de pró-apoptóticos Bax e Bak (Ghobrial, Witzig, e Adjei 2005; Ichim e Tait 2016; Nikolettópoulou et al. 2013).

A ativação de proteínas de domínio BH3 por estímulos de estresse promove translocação de Bax/Bak do citosol para a membrana externa da mitocôndria. Essa ação resulta em aumento da permeabilidade da membrana externa mitocondrial, liberando citocromo c do espaço intermembrana para o citoplasma. Então no citosol, o citocromo c forma um complexo com o a proteína ativadora protease de apoptose-1 (Apaf-1), dATP e pró-caspase-9. O resultado é a formação de uma estrutura conhecida como o apoptossoma, que por sua vez ativa a caspase-9 (Fox e MacFarlane 2016; Ichim e Tait 2016).

Tanto as vias apoptóticas extrínsecas quanto as intrínsecas convergem na ativação dos executores a caspases-3, 6, e 7. Além disso, ambas estão interligadas, por exemplo, por BID. Tal proteína contém o domínio BH3 da família Bcl-2, que após clivagem por caspase-8 desencadeia apoptose intrínseca, amplificando assim o sinal da via extrínseca. Estas duas vias de sinalização apoptóticas são evolutivamente conservadas, mas os eventos moleculares precisos envolvidos na regulação de cascatas enzimáticas de caspases são muitas vezes específicos para o tipo de célula e estímulo de morte (Fox e MacFarlane 2016; Ichim e Tait 2016; Nikolettópoulou et al. 2013; Santos et al. 2019).

1.6. MODELO CELULAR

1.6.1. CÂNCER DO COLO DO ÚTERO E AS CÉLULAS HELA

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) 2018, há aproximadamente 530 mil casos novos de câncer do colo do útero por ano no mundo. Ele é responsável por 265 mil óbitos por ano, sendo a quarta causa mais frequente de morte por câncer em mulheres. No Brasil, as taxas de incidência estimada e de mortalidade apresentam valores intermediários em relação aos países em desenvolvimento, porém são elevadas quando comparadas às de países desenvolvidos com programas de detecção precoce bem estruturados.

O câncer do colo do útero é caracterizado pela replicação desordenada do epitélio de revestimento do órgão, comprometendo o tecido subjacente (estroma), podendo invadir estruturas e órgãos contíguos ou à distância. É uma doença de desenvolvimento lento, que pode cursar sem sintomas em fase inicial e evoluir para quadros de sangramento vaginal intermitente ou após a relação sexual, secreção vaginal anormal e dor abdominal associada com queixas urinárias ou intestinais nos casos mais avançados. Diversos são os tratamentos para este tipo de câncer como excisão local, quimioterapia e/ou radioterapia em estágios mais avançados. O tipo de tratamento dependerá do estadiamento da doença, tamanho do tumor e fatores pessoais, como idade e desejo de ter filhos. Os tratamentos conjugados podem usar diferentes classes de fármacos com o objetivo de combater o câncer por diferentes caminhos (INCA, 2018).

Henrietta Lacks foi diagnosticada com câncer do colo do útero e morreu no Hospital Johns Hopkins, em 1951. Antes de morrer, os médicos removeram o tecido celular sem permissão da família para pesquisa médica, como de costume na época. Suas células se multiplicaram e sobreviveram a uma taxa extraordinariamente alta, tornando-se a primeira linhagem celular de câncer humano imortalizada em cultura de células, denominada HeLa (Figura 10). Com isso, muitas pesquisas *in vitro* tornaram-se possíveis, como por exemplo, Jonas Salk, na década de 50, desenvolveu sua vacina contra a poliomielite utilizando essa linhagem (William *et al.*, 1953; Lucey, Nelson-Rees, e Hutchins 2009; Gilgenkrantz 2014).

Decidiu-se trabalhar com as células HeLa, por ser um dos modelos celulares mais estudados na atualidade, de fácil manipulação, baixo custo, citado por várias publicações correlatas, fornecendo um grande papel comparativo para análises. Abaixo, segue a morfologia celular da HeLa (Figura 10).

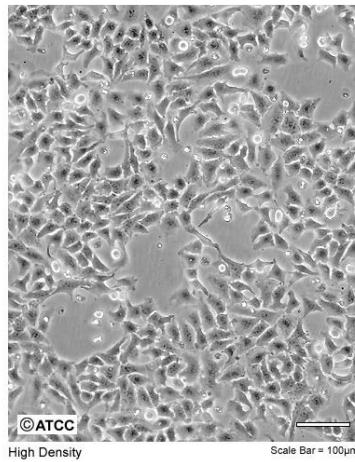


Figura 10. Morfologia das células HeLa avaliada por microscopia de Contraste de Fase. Fonte: ATCC, 2018

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Comparar os mecanismos moleculares da formulação de lipossoma sensível ao pH carreando doxorrubicina entre as formulações de lipossoma não sensível ao pH carreando doxorrubicina e a doxorrubicina livre.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar os objetivos gerais supracitados estabelecemos os seguintes objetivos específicos:

- 1.** Avaliar a citotoxicidade das formulações lipossomais em células HeLa
 - a. Determinar o IC₅₀ por MTT;
 - b. Determinar o IC₅₀ por calceína;
 - c. Determinar o IC₅₀ por resazurina
 - d. Determinar a citotoxicidade das formulações em tempos.

- 2.** Elucidar a via de internalização e a liberação de doxorrubicina intracelular das formulações por citometria de fluxo
 - a. Determinar a cinética de internalização entre as formulações;
 - b. Determinar o acúmulo intracelular de doxorrubicina encapsulada e livre;

- 3.** Determinar a localização intracelular da doxorrubicina por microscopia confocal.

- 4.** Avaliar o mecanismo de endocitose das formulações e o efeito na citotoxicidade
 - a. Validar o uso dos inibidores através da viabilidade celular em presença dos inibidores de endocitose;
 - b. Avaliar o efeito citotóxico das formulações em presença de inibidores de endocitose.

- 5.** Avaliar a acidificação endossomal para efeito da liberação de doxorrubicina carregada em lipossomas sensíveis ao pH

- a. Validar a atividade dos inibidores de acidificação endossomal;
 - b. Validar o uso dos inibidores através da viabilidade celular dos inibidores de acidificação endossomal;
 - c. Avaliar o efeito citotóxico das formulações em presença de inibidores de acidificação endossomal cloroquina e bafilomicina e 3-metiladenina (3-MA).
- 6. Comparar a ativação da apoptose entre as formulações**
- a. Avaliar a imunomarcagem da caspase-3 clivada, a fim de observar a morte celular por apoptose.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

O cloridrato de doxorubicina (doxo) foi adquirido de 141 ACIC Chemicals (Brantford, Ontario, Canadá). Os fosfolipídios fosfatidilcolina de soja completamente hidrogenado (*phospholipids hydrogenate soy phosphatidylcholine* - HSPC), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) e distearoilfosfatidil-etanolamina polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG 2000) foram fornecidos por Lipoid GmbH (EUA). O hemisuccinato de colesterila (CHEMS) e o colesterol (CHOL) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, EUA). Todos os outros reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) (Silva et al. 2016).

3.2. TAMANHO DA NANOPARTÍCULAS E POTENCIAL ZETA

O diâmetro médio das partículas foi medido por espalhamento dinâmico de luz (DLS) em um ângulo fixo de 90 ° e 25 °C. O potencial zeta foi avaliado pela mobilidade eletroforética. O diâmetro médio e o potencial zeta foram medidos antes e após o processo de encapsulação. As análises foram realizadas em triplicata utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Inglaterra). As amostras foram diluídas usando solução de NaCl a 0,9% (p / v) na proporção de 1:100 (Silva et al. 2016).

A caracterização físico-química dos lipossomas (SpHL, nSpHL, SpHLdoxo e nSpHLdoxo) estão apresentadas na Tabela 1. Embora possa ser notada uma ligeira diferença de tamanho entre SpHL (114,8 nm) e nSpHL (115,7 nm), analisando a distribuição de partículas, é possível confirmar a similaridade de ambas as formulações, uma vez que mais de 99% delas são menores que 200 nm (Silva et al. 2016).

Tabela 1. Caracterização das nanopartículas. Foi avaliado o diâmetro, PDI, potencial Zeta. Os valores médios são apresentados +/- desvio padrão (DP).

| Formulações | Tamanho (nm) | Número de vesículas <200 nm (%) | Índice de polidispersividade (PDI) | Potencial Zeta (mV) |
|-------------|--------------|---------------------------------|------------------------------------|---------------------|
| SpHL | 114,8 ± 3,8 | 99,8 ± 0,3 | 0,06 ± 0,01 | -3,2 ± 0,2 |
| SpHLdoxo | 134,9 ± 1,2 | 99,4 ± 0,1 | 0,08 ± 0,02 | -2,0 ± 0,2 |
| nSpHL | 115,7 ± 2,6 | 99,9 ± 0,1 | 0,08 ± 0,04 | -3,9 ± 0,2 |
| nSpHLdoxo | 135,2 ± 2,0 | 99,5 ± 0,1 | 0,05 ± 0,02 | -2,4 ± 0,2 |

3.3. CULTURA DE CÉLULAS

Células de câncer HeLa foram cultivadas em frascos de cultura de 25 ou 75 cm² contendo meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - Lonza, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativo (Gibco, Brasil) e antibiótico - 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, Brasil) – citado nesse trabalho como meio de cultura DMEM suplementado. As células foram mantidas a 37 °C, com atmosfera de 5% de CO₂ em incubadora Panasonic COM-170AICUVL-PA e incubadora Forma Scientific, EUA.

3.4. AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS EM CÉLULAS HELA

3.4.1. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR MTT

O ensaio por MTT, como todos os métodos de viabilidade celular descritos nesse trabalho, visa determinar a viabilidade celular monitorando a citotoxicidade resultante da interação das células com agentes ou condições citotóxicas. O ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5 difeniltetrazólio) consiste na captação deste corante (um sal de coloração amarela e solúvel em água) e sua redução à formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água) pela atividade das enzimas desidrogenases mitocondriais, resultando no acúmulo deste composto em células viáveis. Dessa forma, a redução do MTT ao formazan, é diretamente proporcional à atividade mitocondrial, que pode ser quantificada pela densidade óptica a 570 nm.

Foram plaqueadas 10^4 células/poço, em meio de cultura DMEM suplementado, em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA). Posteriormente, as células foram tratadas com lipossoma vazio não sensível ao pH (nSpHL), lipossoma vazio sensível ao pH (SpHL), solução de doxorubicina livre (doxo livre), lipossoma não sensível ao pH carregado com doxorubicina (nSpHLdoxo) e lipossoma sensível ao pH carregado com doxorubicina (SpHLdoxo), diluídas em meio DMEM sem SFB e antibiótico e incubadas por 24 horas, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂. Após o tratamento, os poços foram lavados com solução PBS (*Phosphate-buffered saline*) (Sigma-Aldrich) e adicionados a solução de MTT (0,5 mg/mL Sigma-Aldrich, EUA) diluída em meio FluoroBrite™ DMEM (Gibco, Brasil) sem SFB e antibiótico, na qual as células foram incubadas por 40 minutos, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, cristais de formazan púrpura intracelular são visíveis sob microscópio. No final do procedimento, o meio foi removido cuidadosamente e foram adicionados 100 µL de DMSO (Synth) para solubilização do formazan. As placas foram agitadas por 15 minutos e a absorbância foi medida a $\lambda = 570$ nm no Leitor Multidetecção Híbrido Cytation 5 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

3.4.2. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR CALCEÍNA

A calceína AM é um corante permeável à membrana celular, que em células viáveis é hidrolisada do éster de acetoximetilo por esterases intracelulares sendo convertida à calceína, que apresenta fluorescência verde ($\lambda =$ excitação/emissão ~492/517). Para imagem utilizamos Hoechst 33342, um corante que possui a capacidade de se ligar a moléculas de DNA, emitindo fluorescência azul quando ligado, foi utilizado para determinar o total de células. Desta forma, utiliza-se esse método para determinar a viabilidade celular na maioria das células eucariotas.

Foram plaqueadas 10^4 células/poço, em meio de cultura DMEM suplementado, em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA). Posteriormente, as células foram tratadas com nSpHL, SpHL, Doxo livre, nSpHLdoxo e SpHLdoxo, diluídas em meio DMEM sem SFB e antibiótico e incubadas por 24 horas, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂. Após o

período de tratamento, o meio foi removido cuidadosamente e foram adicionados 50 μ L em cada poço da solução de Hoechst 33342 (1 μ M Thermo Fisher Scientific) e calceína AM (0,5 μ M Thermo Fisher Scientific) em meio FluoroBrite™ DMEM (Gibco, Brasil) sem SFB e antibiótico, na qual as células foram incubadas por 40 minutos, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ e a fluorescência correspondente a cada poço foi lida e foram adquiridas imagens no mesmo equipamento, Leitor Multidetecção Híbrido Cytation 5 (*BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA*), na incubação, as placas foram visualizadas usando uma objetiva de 10x configurado com cubos de luz DAPI e GFP. O gerador de imagens utiliza uma combinação de fontes de luz LED em conjunto com filtros passa-banda e espelhos dicróicos para fornecer luz de comprimento de onda apropriada. Os cubos de luz DAPI usam um filtro de excitação 337/50 e um filtro de emissão 447/60, o cubo de luz GFP usa um filtro de excitação 469/35 e um filtro de emissão 525/39. Além disso, a fluorescência de calceína (excitação/emissão ~ 492/517 nm) foi medida para estimar a viabilidade celular usando o Leitor Multidetecção Híbrido Cytation 5 (*BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA*).

E para avaliar a viabilidade nos tempos de 6, 12 e 24 horas, foram plaqueadas 10⁴ células/poço, em meio de cultura DMEM suplementado, em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA). Posteriormente, as células foram tratadas com nSpHL, SpHL, Doxo livre, nSpHLdoxo e SpHLdoxo, diluídas em meio DMEM sem SFB e antibiótico e incubadas por 6, 12 e 24 horas, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂. Após o período de tratamento, o meio foi removido cuidadosamente e foram adicionados 50 μ L em cada poço da solução de Hoechst 33342 (1 μ M Thermo Fisher Scientific) e calceína AM (0,5 μ M Thermo Fisher Scientific) em meio FluoroBrite™ DMEM (Gibco, Brasil) sem SFB e antibiótico, na qual as células foram incubadas por 40 minutos, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ e a fluorescência correspondente a cada poço foi lida no Leitor Multidetecção Híbrido Cytation 5 (*BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA*), em λ = Calceína excitação/emissão ~492/517 nm.

3.4.3. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR RESAZURINA

A resazurina, é um composto permeável as células, não tóxico, de cor azul e praticamente não fluorescente. Ao entrar nas células viáveis, a resazurina é reduzida a resorufina, um composto que é vermelho e altamente fluorescente. Desta forma, a resazurina utiliza o poder redutor de células viáveis para medir quantitativamente a viabilidade celular.

Foram plaqueadas 10^4 células/poço, em meio de cultura DMEM suplementado, em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA). Posteriormente, as células foram tratadas com nSpHL, SpHL, Doxo livre, nSpHLdoxo e SpHLdoxo, diluídas em meio DMEM sem SFB e antibiótico e incubadas por 24 horas, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂. Após o período de tratamento, o meio foi removido cuidadosamente e foram adicionados 100 µL em cada poço da solução de resazurina (0,015 mg/mL Sigma-aldrich) diluída em meio FluoroBrite™ DMEM (Gibco, Brasil) sem SFB e antibiótico, na qual as células foram incubadas por 3 horas, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ e a fluorescência correspondente a cada poço foi lida no Leitor Multidetecção Híbrido Cytation 5 (*BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA*), em λ = excitação/emissão ~560/590 nm.

E para avaliar a viabilidade nos tempos de 6, 12 e 24 horas, foram plaqueadas 10^4 células/poço, em meio de cultura DMEM suplementado, em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA). Posteriormente, as células foram tratadas com nSpHL, SpHL, Doxo livre, nSpHLdoxo e SpHLdoxo, diluídas em meio DMEM sem SFB e antibiótico e incubadas por 6, 12 e 24 horas, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂. Após os respectivos tratamentos, o meio foi removido cuidadosamente e foram adicionados 100 µL em cada poço da solução de resazurina (0,015 mg/mL Sigma-aldrich) diluída em meio FluoroBrite™ DMEM (Gibco, Brasil) sem SFB e antibiótico, na qual as células foram incubadas por 3 horas, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ e a fluorescência correspondente a cada poço foi lida no Leitor Multidetecção Híbrido Cytation 5 (*BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA*), em λ = excitação/emissão ~560/590 nm.

3.5. DETERMINAÇÃO DAS VIAS DE INTERNALIZAÇÃO PARA O EFEITO CITOTÓXICO DAS FORMULAÇÕES

Nessa etapa, uma série de estudos foram conduzidas para elucidar os mecanismos de endocitose e o subsequente tráfego intracelular das nanopartículas, bem como os efeitos da acidificação endossomal e sua influência no lipossoma sensível ao pH. Inicialmente utilizamos citometria de fluxo, a fim de fornecer informações da cinética e dados quantitativos do acúmulo de nanopartículas marcadas com a doxorrubicina, a qual possui propriedades fluorescentes (λ = excitação/emissão ~480/585 nm), sendo possível uma detecção direta do composto estudado, não necessitando a marcação com sondas fluorescentes. Na sequência, foram utilizados inibidores de endocitose para auxiliar na discriminação entre a(s) via(s) de entrada(s) utilizada(s) pelas nanopartículas e inibidores de acidificação endossomal para sugerir se o ambiente ácido das células tumorais interfere na liberação da doxorrubicina no lipossoma sensível ao pH. Por fim, verificamos translocação da doxorrubicina para o núcleo e para o lisossomo das células HeLa. Esses estudos foram de vital importância para esclarecer e comparar os mecanismos de ação intracelular e a liberação da doxorrubicina entre as formulações lipossomais.

3.5.1. DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE INTERNALIZAÇÃO

Foram plaqueadas 10^5 células/poço, em meio de cultura DMEM suplementado, em placas de 12 poços e incubadas por 24 horas, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA). As células foram tratadas com as formulações nas concentrações de IC₅₀ (500 μ L), determinadas no teste de viabilidade celular, diluídas em meio DMEM sem SFB e antibiótico e incubadas a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂, em diferentes tempos: 5 min, 15 min, 30 min, 45 min, 1h, 2h, 4h e 6h. Posteriormente, o meio dos poços foram sugados e cuidadosamente lavados com PBS (500 μ L Sigma-Aldrich). Foi adicionado tripsina 0,1% (200 μ L Sigma-Aldrich) em cada poço e a amostra foi incubada por 10 minutos. Após as células se desprenderem, foram ressuspensas em solução PBS (200 μ L Sigma-Aldrich) e transferidas para tubos de citometria. As amostras foram lidas no citômetro de fluxo utilizando o laser de Argônio (λ

= excitação/emissão ~488/575 nm/canal FLH2) (*FACS/Calibur, Becton Dickinson, Mansfield, MA*).

3.5.2. AVALIAÇÃO DA ENDOCITOSE E SEU EFEITO NA CITOTOXICIDADE DAS FORMULAÇÕES

3.5.2.1. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS INIBIDORES DE ENDOCITOSE

Foram plaqueadas 10^4 células/poço, em meio de cultura DMEM suplementado, em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA). O meio foi removido cuidadosamente e as células foram pré-incubadas com 100 µL da solução de cada inibidor. As células foram incubadas com três inibidores em diferentes concentrações (concentrações essas, escolhidas em torno das condições de uso sugeridas pelo fabricante): clorpromazina (Sigma-Aldrich) 2,5 µM, 5 µM e 10 µM; filipina III (Sigma-Aldrich) 5 µM, 10 µM e 20 µM e wortmanina (Cayman Chemical) 50 nM, 100 nM e 150 nM e um outro grupo controle com 100 µL de meio DMEM sem SFB e antibiótico, por um período de 6 horas. Após o tratamento, todos os poços foram aspirados e adicionados 100 µL de meio DMEM sem SFB e antibiótico por 18 horas e/ou até totalizar 24 horas de tratamento. Após esse período, o meio foi removido cuidadosamente e foram adicionados 100 µL em cada poço da solução de resazurina (0,015 mg/mL Sigma-aldrich) diluída em meio FluoroBrite™ DMEM (Gibco, Brasil) sem SFB e antibiótico no qual as células foram incubadas por 3 horas, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ e a fluorescência correspondente a cada poço foi lida no Leitor Multidetecção Híbrido Cytation 5 (*BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA*), em λ = excitação/emissão ~560/590 nm.

3.5.2.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DA FORMULAÇÃO NA PRESENÇA DE INIBIDORES DE ENDOCITOSE

Foram plaqueadas 10^4 células/poço, em meio de cultura DMEM suplementado, em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA). O meio DMEM foi aspirado e as células foram pré-incubadas por 30 minutos com 100 µL da solução de cada inibidor (clorpromazina 10 µM Sigma-Aldrich; filipina III 20 µM Sigma-Aldrich; e wortmanina 100 nM Cayman

Chemical) e um outro grupo com 100 μ L de meio DMEM sem SFB e antibiótico. Após a incubação, os inibidores foram sugados e os poços foram tratados com o IC₅₀ de cada formulação, diluídas nos respectivos inibidores, e o grupo que continha apenas meio DMEM sem SFB e antibiótico foi tratado com o IC₅₀ de cada formulação por 6 horas, a 37 °C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. Após o tratamento, todos os poços foram aspirados e adicionados 100 μ L de meio DMEM sem SFB e antibiótico por 18 horas e/ou até totalizar 24 horas de tratamento. Após esse período, o meio foi removido cuidadosamente e foram adicionados 100 μ L em cada poço da solução de resazurina (0,015 mg/mL Sigma-aldrich) diluída em meio FluoroBrite™ DMEM (Gibco, Brasil) sem SFB e antibiótico, na qual as células foram incubadas por 3 horas, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ e a fluorescência correspondente a cada poço foi lida no Leitor Multidetecção Híbrido Cytation 5 (*BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA*), em λ = excitação/emissão ~560/590 nm.

3.5.2.3. DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE INTERNALIZAÇÃO EM PRESENÇA DE INIBIDORES DE ENDOCITOSE

Foram plaqueadas 10⁵ células/poço, em meio de cultura DMEM suplementado, em placas de 12 poços e incubadas por 24 horas, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA). As células foram pré-tratadas com os inibidores de acidificação endossomal clorpromazina (10 μ M Sigma-Aldrich), filipina III (20 μ M Sigma-Aldrich) e wortmanina (100 nM Cayman Chemical) por 30 min e logo em seguida tratadas com as formulações nas concentrações de IC₅₀ diluídas nos respectivos inibidores (500 μ L), determinadas no teste de viabilidade celular, diluídas em meio DMEM sem SFB e antibiótico e incubadas a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂, em diferentes tempos: 30 min, 1h, 4h e 6h. Posteriormente, o meio dos poços foram sugados e cuidadosamente lavados com 500 μ L da solução PBS (Sigma-Aldrich). Foi adicionado 200 μ L de tripsina 0,1% (Sigma-Aldrich) em cada poço e a amostra foi incubada por 10 minutos. Após as células se desprenderem, foram ressuspensas em PBS (200 μ L Sigma-Aldrich) e transferidas para tubos de citometria. As amostras foram lidas no citômetro de fluxo utilizando o laser de Argônio (λ = excitação/emissão ~488/575 nm/canal FLH2) (*FACS/Calibur, Becton Dickinson, Mansfield, MA*).

3.5.3. AVALIAÇÃO DA ACIDIFICAÇÃO ENDOSSOMAL E SEU EFEITO NA CITOTOXICIDADE DAS FORMULAÇÕES

3.5.3.1. VALIDAÇÃO DOS INIBIDORES DE ACIDIFICAÇÃO ENDOSSOMAL

Foram plaqueadas 10^4 células/poço, em meio de cultura DMEM suplementado, em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA). Para a avaliação do efeito dos inibidores na acidificação de organelas ácidas (endossomos tardios e lisossomos), inicialmente as células foram incubadas com LysoTracker Red DND-99 (Invitrogen), para isso o meio foi removido cuidadosamente e as células foram incubadas por 30 minutos com 80 µL da solução com inibidor e 20 µL da solução de LysoTracker Red DND-99 (Invitrogen). As células foram incubadas com três inibidores em diferentes concentrações: cloroquina (Sigma-Aldrich) 10 µM, 20 µM e 50 µM; bafilomicina (Cayman Chemical) 0,1 µM, 0,5 µM e 1 µM e 3-MA (Sigma-Aldrich) 2,5 mM, 5 mM e 10 mM, concentrações essas, escolhidas em torno das condições de uso sugeridas pelo fabricante. Posteriormente, as imagens foram feitas no Leitor Multidetecção Híbrido Cytation 5 (*BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA*) na incubação, as placas foram visualizadas usando uma objetiva de 20x configurado com cubos de luz RFP. O gerador de imagens utiliza uma combinação de fontes de luz LED em conjunto com filtros passa-banda e espelhos dicróicos para fornecer luz de comprimento de onda apropriada. O cubo de luz RFP usa uma excitação 531/40 e 593/40 filtros de emissão. Além disso, a fluorescência do LysoTracker Red DND-99 (RFP ex / em ~ 531/593 nm) foi medida após 30 minutos de incubação e incubou-se novamente e essas mesmas imagens foram feitas após 4 horas.

Utilizando o Fiji (Schindelin et al. 2012) as células foram circuladas e foi medida a intensidade em pixels integrada utilizada para calcular a CTCF (*corrected total cell fluorescence*) que é = Intensidade integrada - área da célula selecionada X média da fluorescência do background da imagem.

3.5.3.2. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS CÉLULAS HELA EM PRESENÇA DOS INIBIDORES DE ACIDIFICAÇÃO ENDOSSOMAL

Foram plaqueadas 10^4 células/poço, em meio de cultura DMEM suplementado, em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA). O meio foi removido cuidadosamente e as células foram pré-incubadas com 100 µL da solução de cada inibidor. As células foram incubadas com três inibidores em diferentes concentrações: cloroquina (Sigma-Aldrich) 10 µM, 20 µM e 50 µM; bafilomicina (Cayman Chemical) 0,1 µM, 0,5 µM e 1 µM e 3-MA (Sigma-Aldrich) 2,5 mM, 5 mM e 10 mM e um outro grupo controle com 100 µL de meio DMEM sem SFB e antibiótico por 4 horas. Após o tratamento, todos os poços foram aspirados e adicionados 100 µL de meio DMEM sem SFB e antibiótico por 18 horas e/ou até totalizar 24 horas de tratamento. Após esse período, o meio foi removido cuidadosamente e foram adicionados 100 µL em cada poço da solução de resazurina (0,015 mg/mL Sigma-aldrich) diluída em meio FluoroBrite™ DMEM (Gibco, Brasil) sem SFB e antibiótico no qual as células foram incubadas por 3 horas, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ e a fluorescência correspondente a cada poço foi lida no Leitor Multidetecção Híbrido Cytation 5 (*BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA*), em λ = excitação/emissão ~560/590 nm.

3.5.3.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DAS FORMULAÇÕES NA PRESENÇA DOS INIBIDORES DE ACIDIFICAÇÃO ENDOSSOMAL

Foram plaqueadas 10^4 células/poço, em meio de cultura DMEM suplementado, em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ (Forma Scientific, EUA). O meio DMEM foi aspirado e as células foram pré-incubadas por 30 minutos com 100 µL da solução de cada inibidor cloroquina (20 µM Sigma-Aldrich), bafilomicina (0,5 µM Cayman Chemical) e 3-MA (2,5 mM Sigma-Aldrich) e um outro grupo com 100 µL de meio DMEM sem SFB e antibiótico. Após a incubação, os inibidores foram sugados e os poços foram tratados com o IC₅₀ de cada formulação, diluídas nos respectivos inibidores, e o grupo que continha apenas meio DMEM sem SFB e antibiótico foi tratado com o IC₅₀ de cada formulação por 4 horas, a 37 °C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. Após o tratamento, todos os poços foram aspirados e

adicionados 100 µL de meio DMEM sem SFB e antibiótico por 18 horas e/ou até totalizar 24 horas de tratamento. Após esse período, o meio foi removido cuidadosamente e foram adicionados 100 µL em cada poço da solução de resazurina (0,015 mg/mL Sigma-aldrich) diluída em meio FluoroBrite™ DMEM (Gibco, Brasil) sem SFB e antibiótico, na qual as células foram incubadas por 3 horas, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ e a fluorescência correspondente a cada poço foi lida no Leitor Multidetecção Híbrido Cytation 5 (*BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA*), em λ = excitação/emissão ~560/590 nm.

3.6. DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE MORTE CELULAR DAS FORMULAÇÕES POR AVALIAÇÃO DE CASPASE-3 CLIVADA

A ativação das proteases da família das caspases é um dos eventos mais importantes da apoptose. Assim, técnicas como a imunocitoquímica utilizando anticorpos específicos que reconhecem as formas ativas das caspases, auxiliando na detecção da apoptose.

Foram plaqueadas 10⁵ células/poço em lamínulas 18 mm pré-tratadas com *Poly-L-lisine Hydrochloride* (Sigma-Aldrich) utilizando o meio de cultura DMEM suplementado. As placas foram incubadas por 24 horas, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ (*Forma Scientific, EUA*). A seguir, as células foram tratadas com as formulações nas concentrações de IC₅₀, determinadas no teste de viabilidade celular, diluídas em meio DMEM sem SFB e antibiótico e incubadas por 6, 12 e 24 horas, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂. Após o término dos tratamentos as células foram lavadas com solução PBS (Sigma-Aldrich), fixadas por 20 minutos com paraformaldeído 4% (PFA 4% Sigma-Aldrich em solução PBS Sigma-Aldrich) à temperatura ambiente, após a fixação as células foram lavadas por 3 vezes com solução PBS (Sigma-Aldrich). Em seguida, as células foram incubadas com solução glicina (0,1 M Fisher Scientific em solução PBS Sigma-Aldrich) por 20 minutos, permeabilizadas com Triton X-100 (0,2% Sigma-Aldrich em solução PBS Sigma-Aldrich) por 2 minutos e bloqueadas com solução de SFB 10% (em solução PBS Sigma-Aldrich) por cinco minutos. Subsequentemente, as amostras foram incubadas com o anticorpo para Caspase 3 clivada (Asp175) anti-coelho mAb (*Rabbit mAb - Cell Signaling*) por 60 minutos a 37 °C em câmara úmida. As lamínulas

foram lavadas, por 1 minuto, três vezes com PBS (Sigma-Aldrich). Após, foram incubadas com o anticorpo secundário Alexa Fluor® 647 anti-coelho IgG (*ThermoFisher Scientific, Molecular Probes, Oregon, EUA*) e para marcação dos núcleos utilizou-se DAPI (4',6 diamidino-2-fenilindol Enzo Life Sciences), que é marcador de DNA, por 30 minutos a 37 °C em câmara úmida. Por fim, as lamínulas foram lavadas novamente em PBS (Sigma-Aldrich) por três vezes e as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro utilizando o meio de montagem aquoso Faramount, Dako (*Cell signaling technology, 2013*). As amostras foram analisadas usando um microscópio confocal da marca Leica, modelo TCS SP5, equipado com lentes de imersão 63x, sendo posteriormente analisadas utilizando o software CellProfiler (Carpenter et al. 2006).

3.7. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados apresentados foram analisados pelo software *Graphpad Prism 6.0* (*GraphPad Softwares, EUA*), cujos resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. Foi considerada significância estatística quando $p < 0,05$. Para análise de normalidade dos dados, utilizou-se o teste “t” de *Student*, para diferenças entre as variáveis com distribuição normal foram submetidas à análise de variância (ANOVA), seguida de pós teste de Tukey para análises de três ou mais grupos, e seguida do pós teste de Dunnet para comparar os diferentes grupos com o grupo controle.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DAS FORMULAÇÕES LIPOSSOMAIS EM CÉLULAS HELA

Para investigar os mecanismos moleculares das formulações lipossomais contendo doxorubicina, inicialmente determinou-se a viabilidade em células HeLa após o tratamento com doxorubicina livre, para posteriormente compará-las com o efeito das formulações lipossomais utilizando o método de redução do MTT.

A Figura 11 mostra a curva de viabilidade das células HeLa (0,001 μM a 100 μM) tratadas no período de 24 horas com doxorubicina livre solubilizada em tampão HEPES (N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)). É possível observar uma curva dose-resposta e determinar a concentração responsável pela redução em 50% da viabilidade celular (IC_{50}). A regressão sigmoidal dos dados resultou em um alto coeficiente de correlação ($R^2 = 0,983$) e um valor de IC_{50} para a doxorubicina de $2,50 \pm 0,36 \mu\text{M}$. Na literatura foram encontrados valores muito próximos aos valores determinados pelo nosso grupo, tais como, 1,64 μM e 2,20 μM (Manohar et al. 2013; Pan, Qiu, e Hong 2015).

Como as formulações lipossomais são suspensas em HEPES, afim de evitar qualquer influência do solvente utilizado nos experimentos, realizou-se uma curva de viabilidade em células HeLa usando volume máximo (20 μL) usado nos experimentos e não foi encontrada influência significativa na viabilidade celular exposta, tendo como resultado $102,9 \pm 5,76 \%$ de células viáveis comparadas ao grupo controle (a saber, DMEM sem SFB e sem antibiótico) $100 \pm 5,49 \%$. Portanto, conclui-se que o tampão HEPES não apresenta citotoxicidade no modelo utilizado. Mesmo assim, em todos os demais experimentos realizados essa solução foi utilizada como controle (valores não apresentados nos resultados a seguir), mas utilizados como um controle de qualidade do experimento.

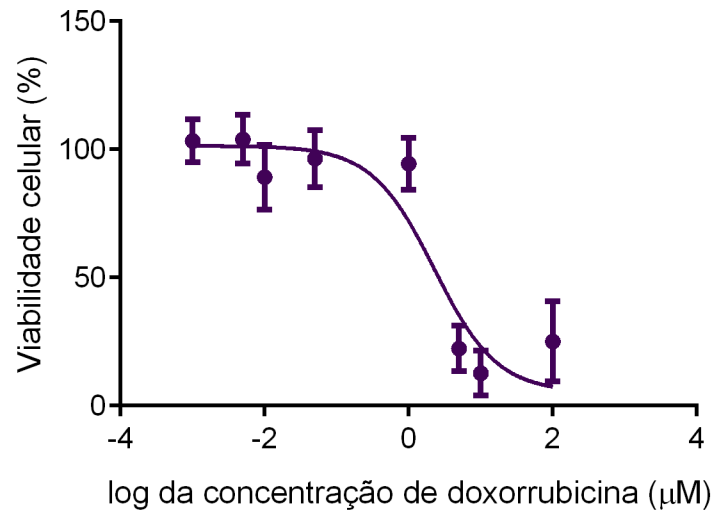


Figura 11. Citotoxicidade da doxorubicina livre em células de câncer HeLa. As células foram tratadas com doxorubicina, diluída em HEPES, nas seguintes concentrações: 0,001 µM; 0,005 µM; 0,01 µM; 0,05 µM; 1 µM; 5 µM; 10 µM; 100 µM. Os tratamentos foram realizados por um período de 24 horas, incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT. O grupo controle, não tratado, foi considerado como 100% de viabilidade celular. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes (n=3).

Na investigação da citotoxicidade das formulações lipossomais em células HeLa, foi possível observar (Figura 12 e Figura 13) que os valores de viabilidade celular encontrados foram relativamente altos, chegando a 300% do grupo controle. Indicando que o tratamento com lipossomas induziria a um crescimento celular significativo, o que era pouco provável pelo pouco tempo de tratamento, e na inspeção visual ao microscópio não foi observado um crescimento celular significativo relativo ao grupo controle. Eliminando-se assim a possibilidade de alguma variável como erro experimental, pois o experimento foi realizado em três dias independentes, supõe-se que a interferência seja oriunda das formulações lipossomais, possivelmente pelo aumento do espalhamento de luz em 570 nm, pois isso não foi observado nos ensaios com doxorubicina livre (Figura 11). Além disso, a interferência de lipossomas no teste de redução de MTT já foi descrita na literatura (Angius e Floris 2015) e observada pelo nosso grupo em outros ensaios com formulações contendo nanopartículas lipídicas (dados não mostrados).

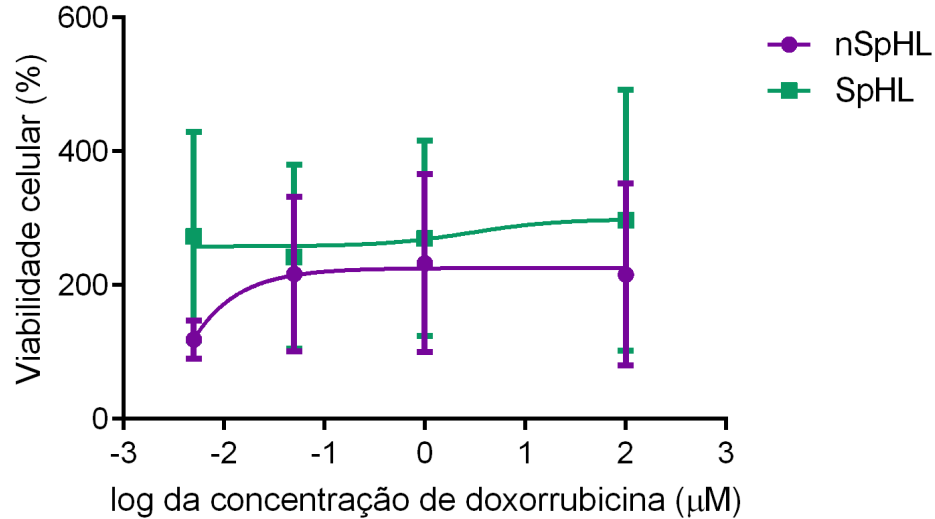


Figura 12. Citotoxicidade das formulações lipossomais vazias em células de câncer HeLa. As células foram tratadas com lipossoma não sensível ao pH (nSpHL) e sensível ao pH (SpHL) diluídas em HEPES, em concentrações de 0,001 µM; 0,05 µM; 1 µM e 100 µM. Os tratamentos foram realizados por um período de 24 horas, incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução de MTT. O grupo controle, não tratado, foi considerado como 100% de viabilidade celular. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes (n=3).

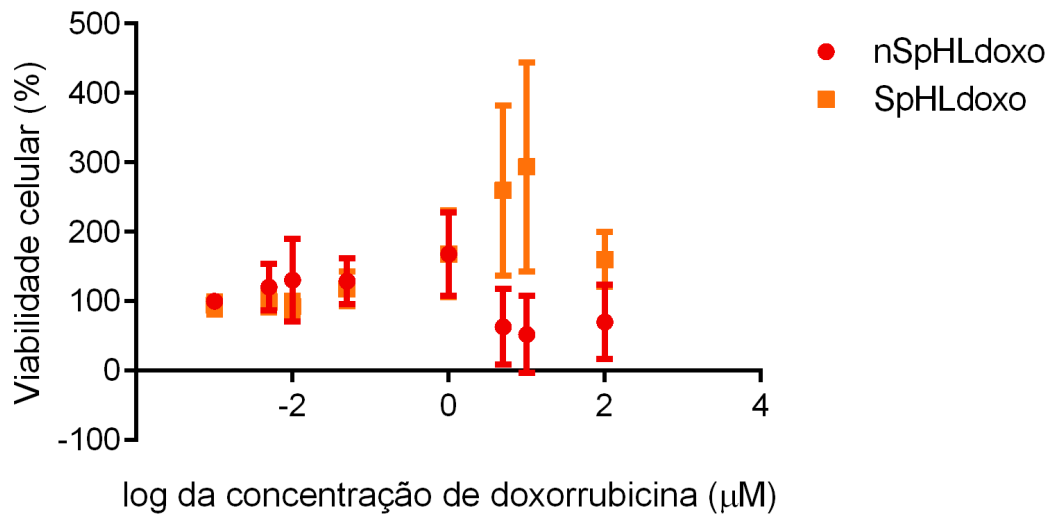


Figura 13. Citotoxicidade das formulações lipossomais contendo doxorrubicina em células de câncer HeLa. As células foram tratadas com lipossoma não sensível ao pH com doxorrubicina (nSpHLdoxo) e sensível ao pH com doxorrubicina (SpHLdoxo) diluídas em HEPES, em concentrações de 0,001 µM; 0,005 µM; 0,01 µM; 0,05 µM; 1 µM; 5 µM; 10 µM; 100 µM. Os tratamentos foram realizados por um período de 24 horas, incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução de MTT. O grupo controle, não tratado, foi considerado como 100% de viabilidade celular. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes (n=3).

Após observar que o teste de redução de MTT não foi um método adequado para a determinação da viabilidade de células expostas a tratamentos com formulações lipossomais, procurou-se uma alternativa que utilizasse um princípio diferente daquele utilizado pelo teste de redução do MTT (*i.e.*, absorvância). Dentre as opções decidiu-se testar dois métodos de viabilidade celular para avaliar se havia interferência com os lipossomas vazios, o método de calceína (Figura 15 A e C) e o método de resazurina (Figura 15 B e D), ambos aferem a viabilidade celular utilizando fluorescência. Como mostra a Figura 15 A e C, e Figura 15 B e D, esses testes não sofreram as mesmas limitações técnicas apresentadas pelo ensaio de redução do MTT. Portanto, as leituras não apresentaram quaisquer interferências notáveis na presença das formulações lipossomais (nSpHL e SpHL).

Após a certificação que o método de calceína e resazurina não sofreram influência dos lipossomas na viabilidade celular, comparou-se os valores de doxorubicina livre obtidos pelos três métodos (MTT, calceína e resazurina) (Figura 14), com a finalidade de validar as metodologias para continuidade dos experimentos e comparações das formulações (nSpHLdoxo e SpHLdoxo). Dessa forma, foi possível determinar a viabilidade celular utilizando a doxorubicina livre pelos três métodos, que tiveram valores de IC_{50} para a doxorubicina livre de $2,50 \pm 0,36 \mu\text{M}$ pelo método de MTT; $3,01 \pm 0,28 \mu\text{M}$ pelo ensaio de calceína; e $3,22 \pm 1,28 \mu\text{M}$ pelo método de resazurina.

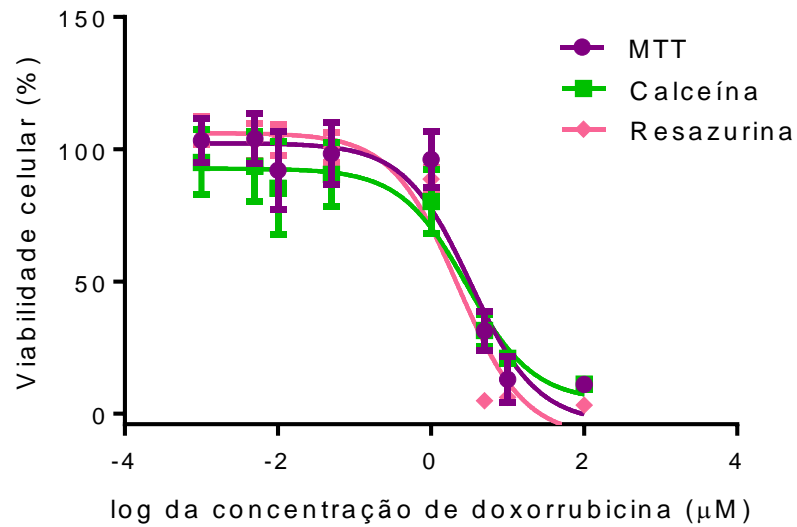


Figura 14. Citotoxicidade da doxorubicina livre em células de câncer HeLa avaliada pelo ensaio com calceína, MTT e resazurina respectivamente. As células foram tratadas com doxorubicina solução estoque de 2 mg/ml, diluída em HEPES, em concentrações de 0,001 µM; 0,005 µM; 0,01 µM; 0,05 µM; 1 µM; 5 µM; 10 µM; 100 µM. Os tratamentos foram realizados por um período de 24 horas, incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O grupo controle não tratado foi considerado como 100% das células na viabilidade celular. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes (n=3).

Na Tabela 2 estão apresentados os valores da concentração inibitória em 50 de redução de viabilidade (IC₅₀) com os seus respectivos desvios padrão. Através da análise estatística comparou-se os testes de calceína e resazurina com o método de MTT. Por fim, como não foram encontradas diferenças significativas, os resultados indicam que os métodos são intercambiáveis para a avaliação da citotoxicidade da doxorubicina livre. Isso também confirmou que os valores obtidos são comparáveis aos encontrados na literatura e discutidos anteriormente.

Tabela 2. Valores da concentração inibitória 50 (IC_{50}) em células HeLa tratadas com doxorubicina livre avaliado pelos métodos de redução de MTT, calceína e resazurina. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os métodos de viabilidade celular, determinada pelo teste “t” de Student. Cada valor representa a média \pm D.P de três experiências independentes ($n=3$).

| | MTT | Calceína | Resazurina |
|-----------|--------------------------------|-----------------|-----------------|
| % | Doxorrubicina livre (μ M) | | |
| IC_{50} | $2,50 \pm 0,36$ | $3,01 \pm 0,28$ | $3,22 \pm 1,28$ |

A avaliação da toxicidade dos lipossomas vazios foi realizada a partir da concentração lipídica máxima (280 μ M), relativa a máxima concentração utilizada nos estudos com os lipossomas contendo doxorubicina encapsulada. Verificou-se que tanto as formulações sensíveis como as não sensíveis ao pH não apresentaram toxicidade e nem interferência na avaliação da viabilidade celular pelos métodos de calceína e resazurina, de acordo com a curva dose-resposta obtida (Figura 15 A e B), confirmados pela observação das células ao microscópio. A partir dos resultados descritos iniciou-se a investigação da hipótese principal: avaliar a possível diferença na entrega intracelular de doxorubicina por lipossomas sensíveis comparados a não sensíveis ao pH e a doxorubicina livre, com a finalidade de correlacionar com os resultados *in vivo* já descritos por Silva et al. 2016.

Na Figura 15 C e D, temos a curva de viabilidade celular na qual observa-se que as formulações dos lipossomas sensíveis ao pH carregando doxo (SpHLdoxo) possuem um efeito citotóxico maior ($2,75 \mu$ M \pm 0,33 e $2,16 \mu$ M \pm 0,22) quando comparadas com a formulação não sensível ao pH carregando doxo (nSpHLdoxo $9,69 \pm 2,92 \mu$ M e $27,73 \pm 9,6 \mu$ M) em ambos os métodos de viabilidade celular (calceína e resazurina respectivamente) como demonstrado na Tabela 3.

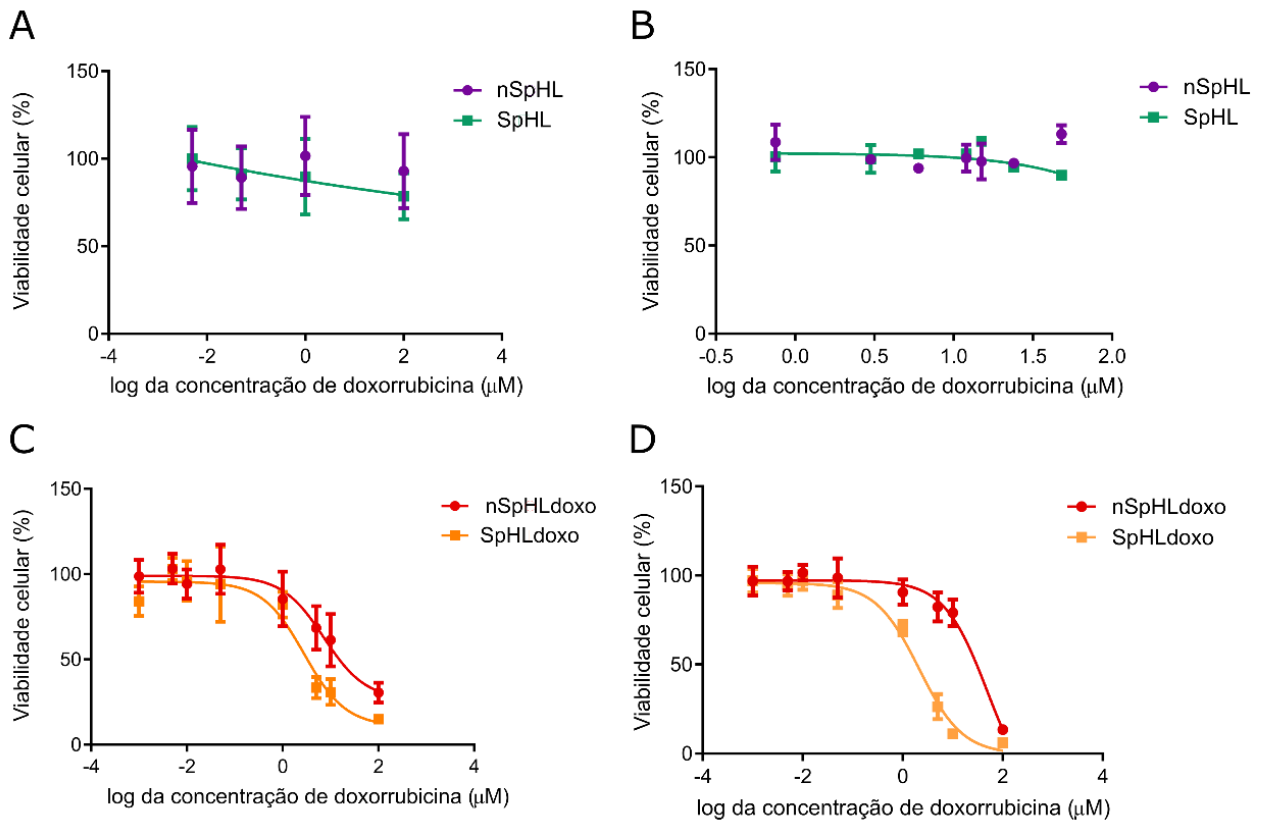


Figura 15. Citotoxicidade das formulações lipossomais vazias e formulações lipossomais contendo doxorubicina em células de câncer HeLa. As células foram tratadas com lipossoma não sensível ao pH (nSpHL) e sensível ao pH (SpHL) diluídas em HEPES, em concentrações de 35 μM; 70 μM; 140 μM e 280 μM (concentração lipídica). (A) Viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio com calceína; (B) Viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio com resazurina. As células foram tratadas com lipossoma não sensível ao pH carregando doxo (nSpHLdoxo) e sensível ao pH carregando doxo (SpHLdoxo) diluídas em HEPES, em concentrações de 0,001 μM; 0,05 μM; 1 μM e 100 μM (concentração de doxorubicina). (C) Viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio com calceína; (D) Viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio com resazurina. Os tratamentos foram realizados por um período de 24 horas, incubadas em estufa a 37°C e 5% CO₂. O grupo controle não tratado foi considerado como 100% das células na viabilidade celular. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes (n=3).

Para corroborar a curva de viabilidade celular pelo método de calceína, foi adquirido imagens por fluorescência (Figura 16), onde pode-se observar as células viáveis, em verde, marcação para calceína e a marcação nuclear por Hoechst 33342, o qual se liga ao DNA nuclear corando-o de azul. Para a marcação das células consideradas mortas, seria necessário uma marcação específica, como por exemplo usando o marcador de núcleo Iodeto de Propídio (PI), pois esse marcador é impermeável à membrana celular, portanto diferenciaria as células que não estão viáveis, mas infelizmente a emissão de fluorescência do PI é na região do vermelho, o que causa

sobreposição com o espectro de emissão da doxorubicina e como o mecanismo de ação da doxorubicina é através da ligação ao DNA não seria possível distinguir entre a marcação do PI e da doxorubicina.

Ao observar a imagem pelo contraste de fase, à esquerda, as células com alteração da morfologia e citoplasma reduzido, características de células mortas, são as que tem somente o núcleo marcado. Portanto, nesse estudo, as células que apresentaram apenas marcação nuclear, foram consideradas mortas, já que a ausência da fluorescência verde indica que essas células não estão com a membrana íntegra.

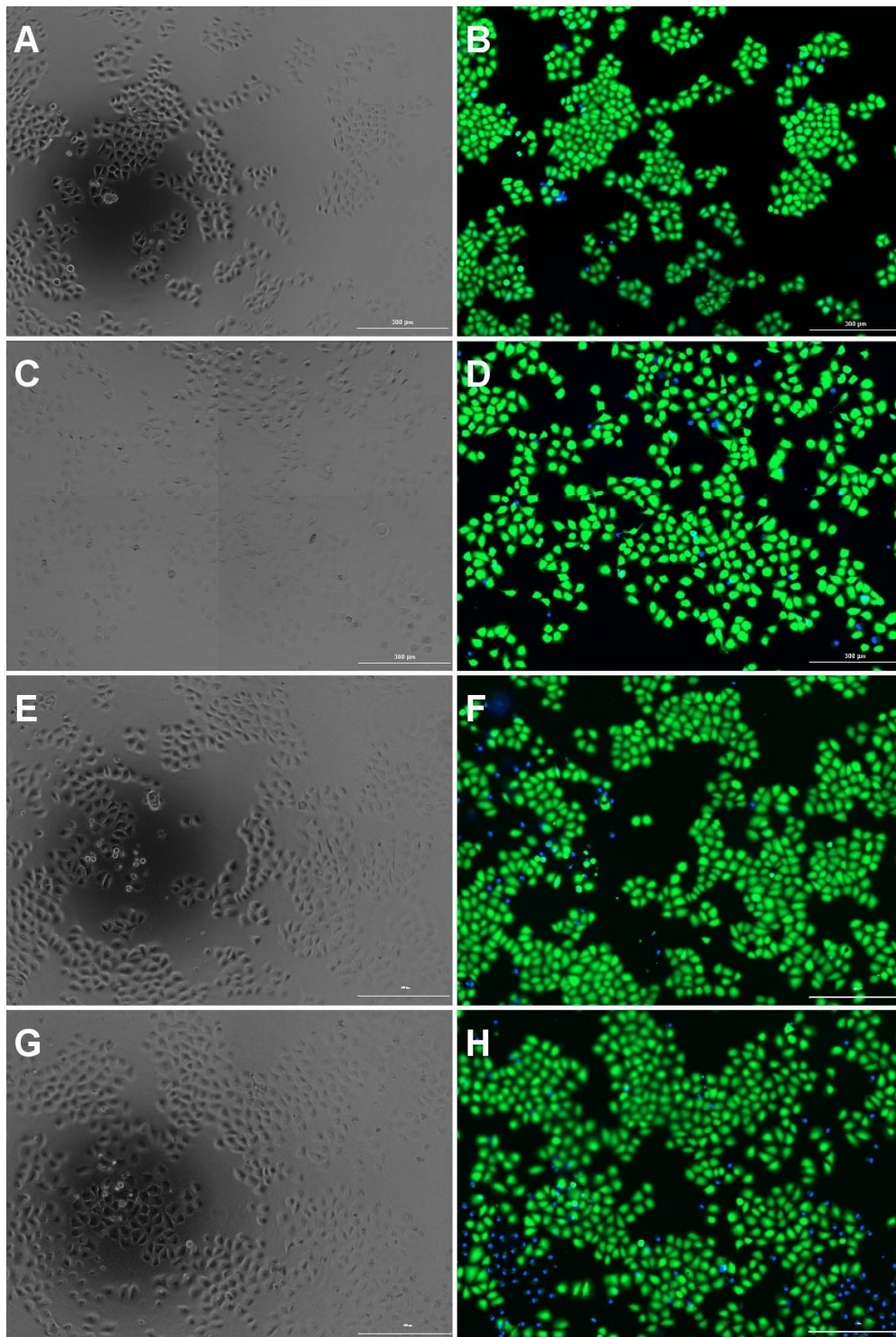


Figura 16. Imagens representativas da avaliação da permeabilidade celular em células HeLa por microscopia de fluorescência. Linhas: (A) e (B) – grupo controle; (C) e (D) – IC_{50} no tratamento de doxorubicina livre; (E) e (F) - IC_{50} no tratamento nSpHLdoxo; (G) e (H) - IC_{50} no tratamento SpHLdoxo. Colunas: 1- imagem de campo claro; 2 – sobreposição das marcações com Hoechst 33342 (DAPI - azul) e Calceína (GFP - verde). Barra de escala: 300 μ m.

Na Tabela 3 encontram-se descritos os valores da concentração inibitória 50 (IC_{50}) das formulações em ambos os ensaios (calceína e resazurina), obtidos a partir das curvas de viabilidade (Figura 15). As concentrações inibitórias foram comparadas pela análise estatística e como não foram encontradas diferenças significativas, os resultados indicam que os métodos são intercambiáveis para a avaliação da citotoxicidade das formulações.

Tabela 3. Valores da concentração inibitória 50 (IC_{50}) para os tratamentos com doxorubicina livre, nSpHLdoxo e SpHLdoxo utilizando o método de calceína e de resazurina. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os métodos de viabilidade celular, determinada pelo teste “t” de Student. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes ($n=3$).

| % | Doxo livre (μM) | | nSpHLdoxo (μM doxo) | | SpHLdoxo (μM doxo) | |
|-----------|------------------------|-----------------|---------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------|
| | Calceína | Resazurina | Calceína | Resazurina | Calceína | Resazurina |
| IC_{50} | 3,01 \pm 0,28 | 3,22 \pm 1,28 | 9,69 \pm 2,92 | 27,73 \pm 9,6 | 2,75 \pm 0,33 | 2,16 \pm 0,22 |

Após a determinação dos valores da concentração inibitória 50 (IC_{50}) para os tratamentos de 24 horas usando as duas metodologias, decidiu-se avaliar se a citotoxicidade era tempo-depende. Para isso, a citotoxicidade das formulações em células HeLa foram realizadas nos tempos de 6, 12 e 24 horas. Na Figura 17, observa-se que somente no tempo de 24 horas as formulações foram citotóxicas, determinando assim esse tempo para os demais experimentos, cuja etapa seguinte foi aprofundar os conhecimentos sobre o acúmulo intracelular de doxorubicina e o mecanismo de internalização em células HeLa.

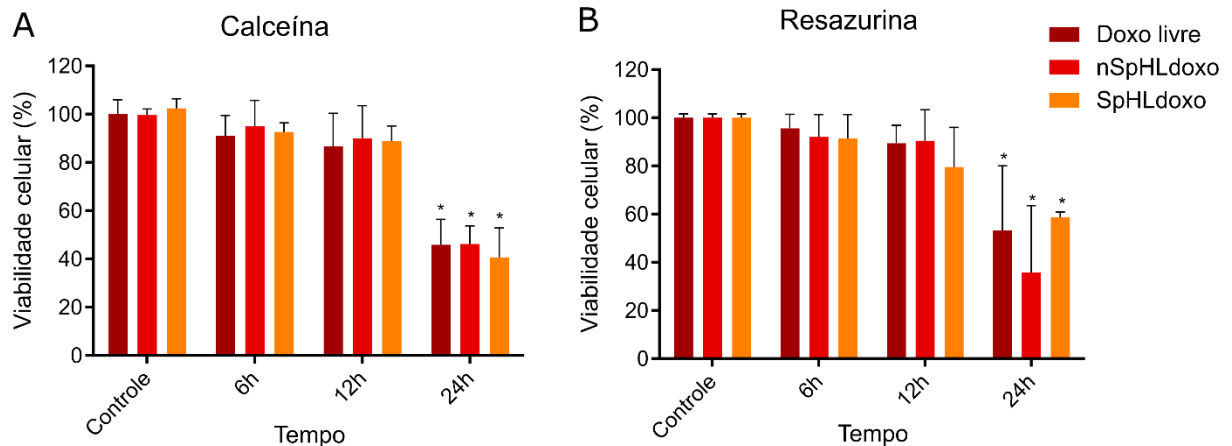


Figura 17. Citotoxicidade utilizando os IC_{50} dos tratamentos com doxorubicina em tempos 6, 12 e 24 horas. As células foram tratadas com nSpHLdoxo e SpHLdoxo, com a concentração do IC_{50} de cada formulação. Os tratamentos foram realizados por um período de 6, 12 e 24 horas, incubadas em estufa a 37°C e 5% CO_2 . (A) Viabilidade celular avaliada pelo ensaio com calceína; (B) Viabilidade celular avaliada pelo ensaio com resazurina. O grupo controle não tratado foi considerado como 100% das células na viabilidade celular e esse parâmetro foi utilizado para a normalização de cada tempo. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes ($n=3$). A análise estatística foi realizada utilizando o teste Two-Way ANOVA e de comparação múltipla pelo Tukey Test. Nível de significância $p < 0,05$.

Após avaliar que os métodos são intercambiáveis para a avaliação da citotoxicidade das formulações, decidiu-se dar continuidade aos experimentos com o método de resazurina. Ao comparar o valor da concentração inibitória 50 (IC_{50}) entre as formulações (Tabela 4) pelo método de resazurina, no período de 24 horas, foram encontradas diferenças significativas somente da formulação nSpHLdoxo ($27,73 \mu M \pm 9,6$) entre a doxo livre ($3,22 \mu M \pm 1,28$) e SpHLdoxo ($2,16 \mu M \pm 0,22$).

Tabela 4. Comparação entre os valores da concentração inibitória 50 (IC_{50}) para os tratamentos com doxorubicina livre, nSpHLdoxo e SpHLdoxo utilizando o método de calceína e de resazurina. As diferenças ($p < 0,05$) foram determinadas pelo teste “t” de Student realizado aos pares em relação aos grupos descritos com letras: ‘a’ grupo Doxorubicina livre, ‘b’ grupo nSpHLdoxo e ‘c’ grupo SpHLdoxo.

| % | Doxo livre (μM) | nSpHLdoxo (μM doxo) | SpHLdoxo (μM doxo) |
|-----------|------------------------|---------------------------|--------------------------|
| IC_{50} | $3,22 \pm 1,28$ | $27,73 \pm 9,6$ (a, c) | $2,16 \pm 0,22$ |

Com base nesses resultados podemos verificar que a encapsulação de doxorubicina em lipossomas sensíveis ao pH não reduzem seu efeito citotóxico. Como observado *in vivo*, há um acúmulo maior do lipossoma sensível ao pH em relação ao não

sensível no sítio do tumor, podendo inferir que os lipossomas sensíveis ao pH podem possuir o mesmo efeito farmacológico que a doxorubicina livre, porém com menor toxicidade sistêmica devido ao acúmulo tumoral observado por Silva et al. 2016. Com esses dados justifica-se a continuação das investigações dos mecanismos moleculares *in vitro*.

4.2. AVALIAÇÃO DO ACÚMULO INTRACELULAR E DO MECANISMO DE INTERNALIZAÇÃO DE DOXORRUBICINA POR ENDOCITOSE

4.2.1. ACÚMULO INTRACELULAR DE DOXORRUBICINA LIVRE E ENCAPSULADA

Com o estudo do processo de endocitose das formulações lipossomais carreadoras de doxorubicina em células HeLa, buscou-se elucidar e investigar os mecanismos de ação e possíveis diferenças entre as mesmas. Inicialmente avaliou-se a cinética de internalização das formulações em diferentes tempos, utilizando a citometria de fluxo, uma técnica que permite avaliar individualmente as células através da focalização hidrodinâmica em um capilar e também analisar milhares de células por segundo para obter resultados dependentes das propriedades intrínsecas das amostras, como tamanho das células, granulosidade e intensidade da fluorescência.

Para a análise foram consideradas 10 mil células como padrão para os testes descritos abaixo. Na Figura 18 o gráfico relaciona a porcentagem de células que apresentaram fluorescência emitida pela doxorubicina em diferentes tempos de exposição (5, 15, 30, 45 minutos e 1, 2, 4 e 6 horas) incubadas com o IC₅₀ (3,22 µM) da doxorubicina livre obtidas no método de viabilidade de resazurina, nos permitindo avaliar a quantidade de células que internalizou o fármaco e estimar assim a prevalência desse efeito na população de células.

A partir da análise da cinética de internalização verificou-se que a doxo livre apresentou o mesmo perfil que o SpHLdoxo atingindo 100% de internalização no tempo de 1 hora, em contrapartida, o nSpHLdoxo a partir de 15 min seu perfil foi significativamente menor até 1 hora de exposição, alcançando 100% de internalização somente a partir de 4 horas. Sendo assim, uma possível explicação para essa diferença é que a formulação nSpHLdoxo não só é internalizada com menor proporção, mas que

há uma diferença na liberação do fármaco e seu acesso ao núcleo demora mais tempo do que as outras formulações (resultados descritos a seguir), podendo ter afetado o padrão de fluorescência do fármaco.

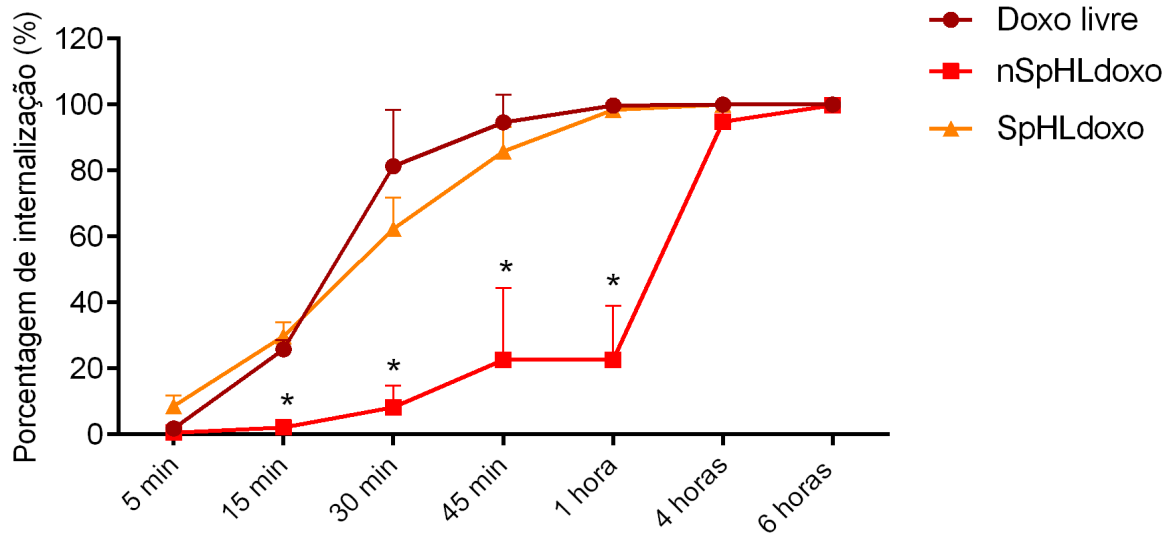


Figura 18. Cinética de internalização de diferentes formulações contendo doxorubicina no tempo em células HeLa. A internalização foi obtida através da multiplicação do número de células pela média de fluorescência de doxorubicina (canal FLH2). As células foram tratadas com as formulações de doxorubicina (Doxo livre, nSpHLdoxo e SpHLdoxo) durante 5 min, 15 min, 30 min, 45 min, 1 hora, 2 horas, 4 horas e 6 horas, tripsinizados e acessados por citometria de fluxo. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes ($n=3$). A análise estatística foi realizada utilizando o teste Two-Way ANOVA e de comparação múltipla pelo Tukey Test. Nível de significância * $p < 0,05$.

Como mencionado anteriormente, a citometria de fluxo avalia a intensidade de fluorescência do sinal analisado. Em nosso contexto, esse valor estaria relacionado com a quantidade de fármaco (*i.e.*, doxorubicina) no interior das células. Na Figura 19, pode-se observar que após 1 hora de tratamento, houve um aumento significativo na intensidade de fluorescência na doxo livre quando comparada com as formulações nSpHLdoxo e SpHLdoxo. A intensidade de fluorescência depende não só da concentração do composto, mas também do ambiente químico em que este se encontra. Portanto, a diferença observada aqui não pode ser interpretada diretamente (*i.e.*, não se pode afirmar que um tratamento tem o dobro de concentração que outro em determinado tempo). É descrito que a doxorubicina sofre supressão de fluorescência (do inglês, *quenching*) quando está em alta concentração, o que pode acontecer quando

incorporada às formulações lipossomais e quando ligada ao DNA (Mohan e Rapoport 2010). Esse efeito tem implicações diretas para nosso estudo, pois se a concentração de uma população fluorescente de moléculas intracelulares de doxorubicina exceder um limite particular, a fluorescência celular medida por citometria de fluxo não é diretamente correlacionada à concentração real de doxorubicina intracelular.

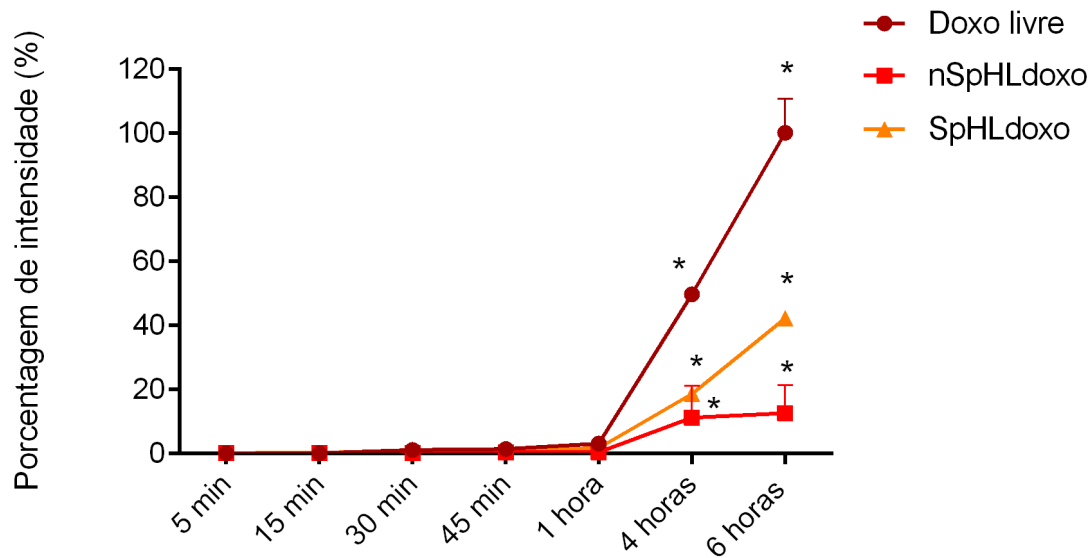


Figura 19. Acúmulo intracelular de diferentes formulações contendo doxorubicina no tempo em células HeLa. A internalização foi obtida pela multiplicação do número de células pela média de fluorescência da doxorubicina (canal FLH2). As células foram tratadas como o IC_{50} das formulações de doxorubicina (Doxo livre, nSpHLdoxo e SpHLdoxo) durante 5 min, 15 min, 30 min, 45 min, 1 hora, 2 horas, 4 horas e 6 horas, tripsinizados e acessados por citometria de fluxo. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes ($n=3$). A análise estatística foi realizada utilizando o teste Two-Way ANOVA e de comparação múltipla pelo Tukey Test. Nível de significância * $p < 0,05$.

Para melhor entender o perfil de internalização e distribuição intracelular da doxorubicina livre e carregada pelos lipossomas, utilizou-se a microscopia de fluorescência (Figura 39 em anexo) e posteriormente a microscopia confocal (Figura 20).

As imagens apresentadas na Figura 20, mostram que o tratamento com doxorubicina leva a uma marcação nuclear, uma vez que o fármaco é um intercalante de DNA (Vijay et al. 2018). A análise da intensidade de fluorescência foi feita pelo software CellProfiler, no qual o núcleo foi utilizado para formar a primeira máscara (azul) e a segunda máscara (branco) delimita o perímetro celular marcada por caspase (borda da célula) (Figura 20 B).

A partir da segmentação da imagem, foi possível dividi-la em duas regiões intrínsecas (citoplasma e núcleo), nas quais mediu-se a distribuição da intensidade integrada da doxorubicina (Figura 20 B), sendo representada a intensidade da célula como um todo, do citoplasma e do núcleo.

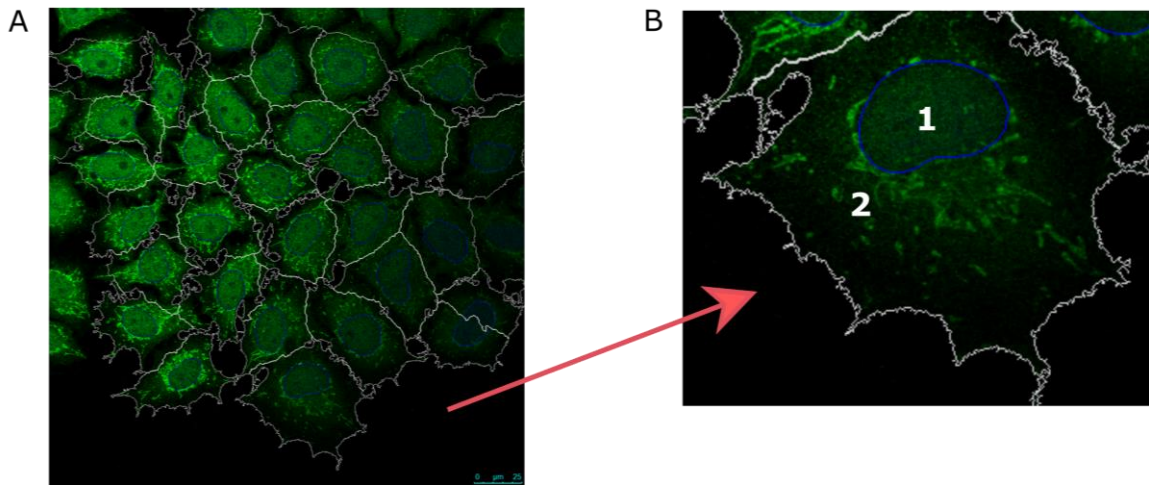


Figura 20. Análise de distribuição da intensidade integrada da doxorubicina em células HeLa. Imagens representativas. Para a análise da intensidade integrada da doxorubicina, foi utilizado o método de divisão da célula em duas regiões para analisar a distribuição da intensidade. (A) Imagem representativa da segmentação da célula; (B) Zoom de uma célula segmentada em duas regiões (1 representa o núcleo e 2 o perímetro da célula). Imagem representativa das máscaras geradas pelo CellProfiler para segmentar o núcleo (em azul) e o perímetro da célula (em branco). Escala = 50 μm .

Com a finalidade de determinar a localização de doxorubicina intracelular, as células foram tratadas com o IC_{50} (3,22 μM) da doxorubicina livre obtidas pelo método de viabilidade celular resazurina, nos tempos de 6, 12 e 24 horas. As imagens foram adquiridas pelo confocal e tratadas pelo software CellProfiler e foi determinado os valores isolados da intensidade integrada de fluorescência da doxorubicina na célula total, no citoplasma e núcleo.

Nos resultados relativos a intensidade de doxorubicina na célula total, evidenciou que a doxo livre e o SpHLdoxo apresentam um mesmo perfil de intensidade de fluorescência nos tempos de 6, 12 e 24 horas (Figura 21, Figura 22 e Figura 23).

Pode-se verificar que no tempo de 6 horas (Figura 21), houve uma intensidade de fluorescência maior no núcleo em comparação com o citoplasma nos tratamentos de doxo livre e SpHL, sugerindo um acúmulo maior de doxorubicina neste local, em

contrapartida, o nSpHLdoxo demonstrou ter acúmulo menor no núcleo, no mesmo período.

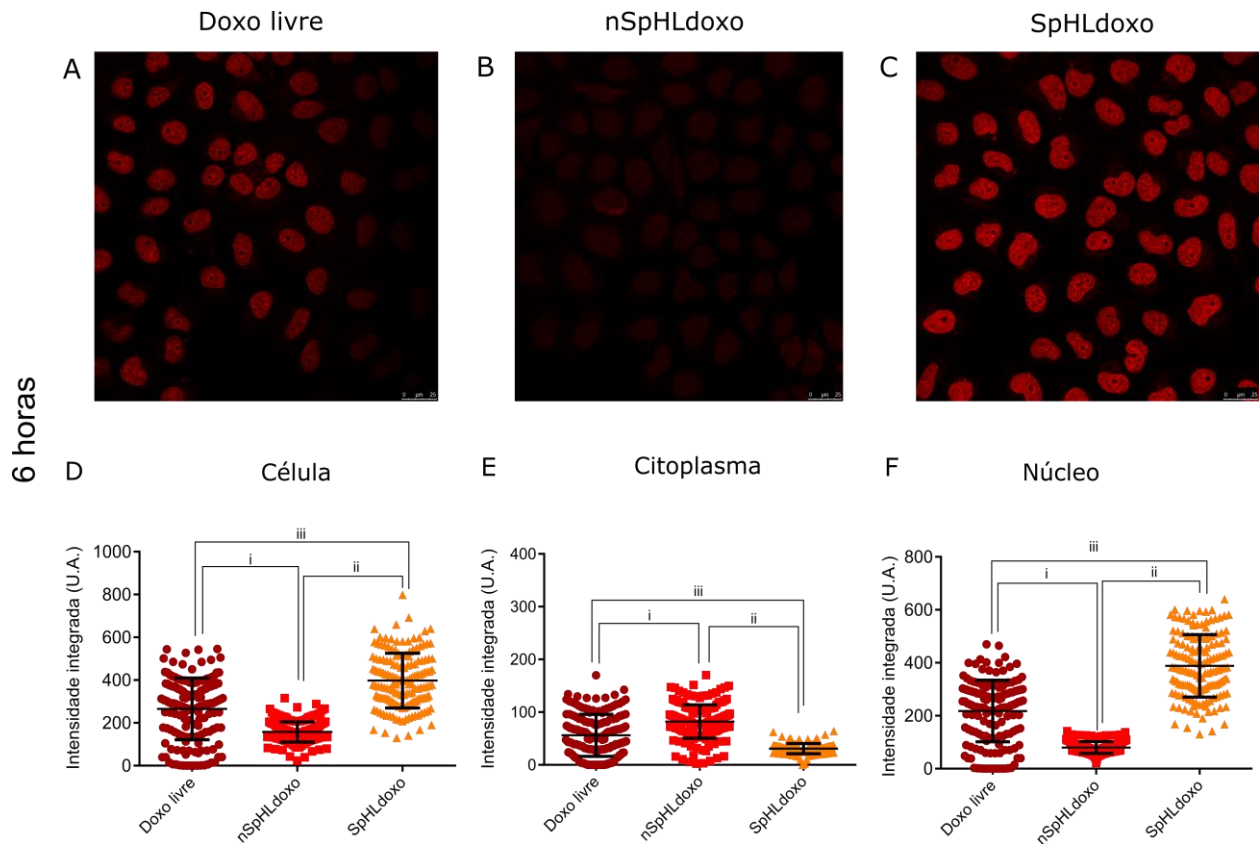


Figura 21. Intensidade de fluorescência da doxorubicina em células HeLa após tratamento com as formulações. As lâminas foram preparadas utilizando lamínulas em placas de 12 poços onde $4,0 \times 10^5$ células foram plaqueadas por poço. As células foram tratadas com o IC_{50} ($3,22 \mu M$) da doxorubicina livre. Após o período de 6 horas, o material foi fixado com PFA 4% e, subsequentemente, as imagens foram adquiridas por microscopia confocal. Em vermelho está a marcação com doxorubicina. (A) Doxorubicina livre; (B) nSpHLdoxo; (C) SpHLdoxo; (D) intensidade integrada da doxorubicina na célula total, no citoplasma (E) e no núcleo (F). Nível de significância $p < 0,05$. Onde (i) mostra a diferença significativa entre doxo livre e nSpHLdoxo; (ii) diferença significativa entre SpHLdoxo e nSpHLdoxo; e (iii) diferença significativa entre doxo livre e SpHLdoxo.

No tempo de 12 horas, Figura 22, podemos verificar que a intensidade de fluorescência da doxo livre e do SpHLdoxo encontram-se semelhantes ao que foi observado em 6 horas, ou seja a doxorubicina está mais presente no núcleo (intensidade maior de doxorubicina no núcleo). Por outro lado o nSpHLdoxo manteve a distribuição de fluorescência similar entre o núcleo e o citoplasma, nos tempos de 6 e 12 horas.

Porém no tempo de 24 horas, Figura 23, podemos verificar que a intensidade de fluorescência da doxo livre e do SpHLdoxo encontram-se semelhante ao perfil que foi observado em 6 e 12 horas, ou seja, aumentando sua intensidade no núcleo. Em compensação o nSpHLdoxo demonstrou acúmulo maior no núcleo em 24 horas, quando comparado aos tempos de 6 e 12 horas.

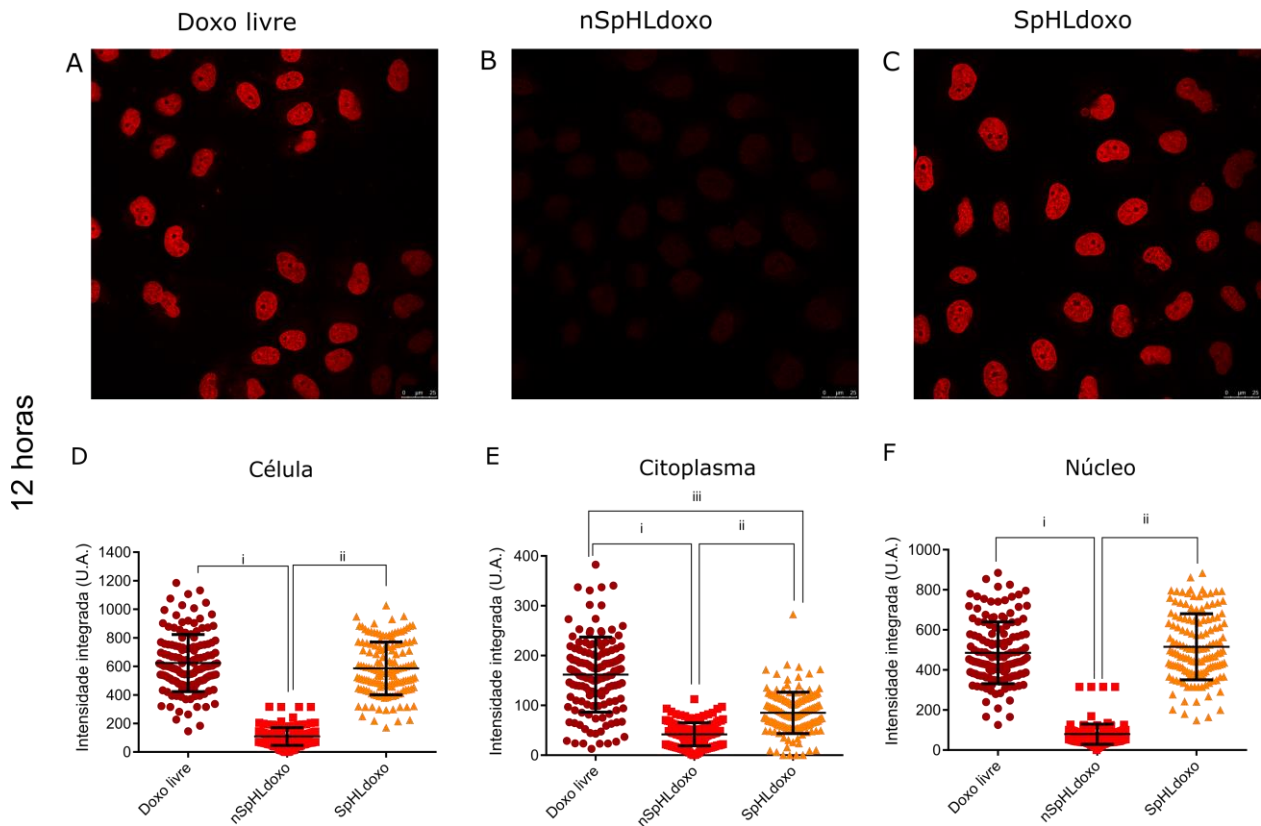


Figura 22. Intensidade de fluorescência da doxorubicina em células HeLa após tratamento com as formulações. As lâminas foram preparadas utilizando lamínulas em placas de 12 poços onde $4,0 \times 10^5$ células foram plaqueadas por poço. As células foram tratadas com o IC_{50} ($3,22 \mu M$) da doxorubicina livre. Após o período de 12 horas, o material foi fixado com PFA 4% e, subsequentemente, as imagens foram adquiridas por microscopia Confocal. Em vermelho está a marcação com doxorubicina. (A) Doxorubicina livre; (B) nSpHLdoxo; (C) SpHLdoxo; (D) intensidade integrada da doxorubicina na célula total, no citoplasma (E) e no núcleo (F). Nível de significância $p < 0,05$. Onde (i) mostra a diferença significativa entre doxo livre e nSpHLdoxo; (ii) diferença significativa entre SpHLdoxo e nSpHLdoxo; e (iii) diferença significativa entre doxo livre e SpHLdoxo.

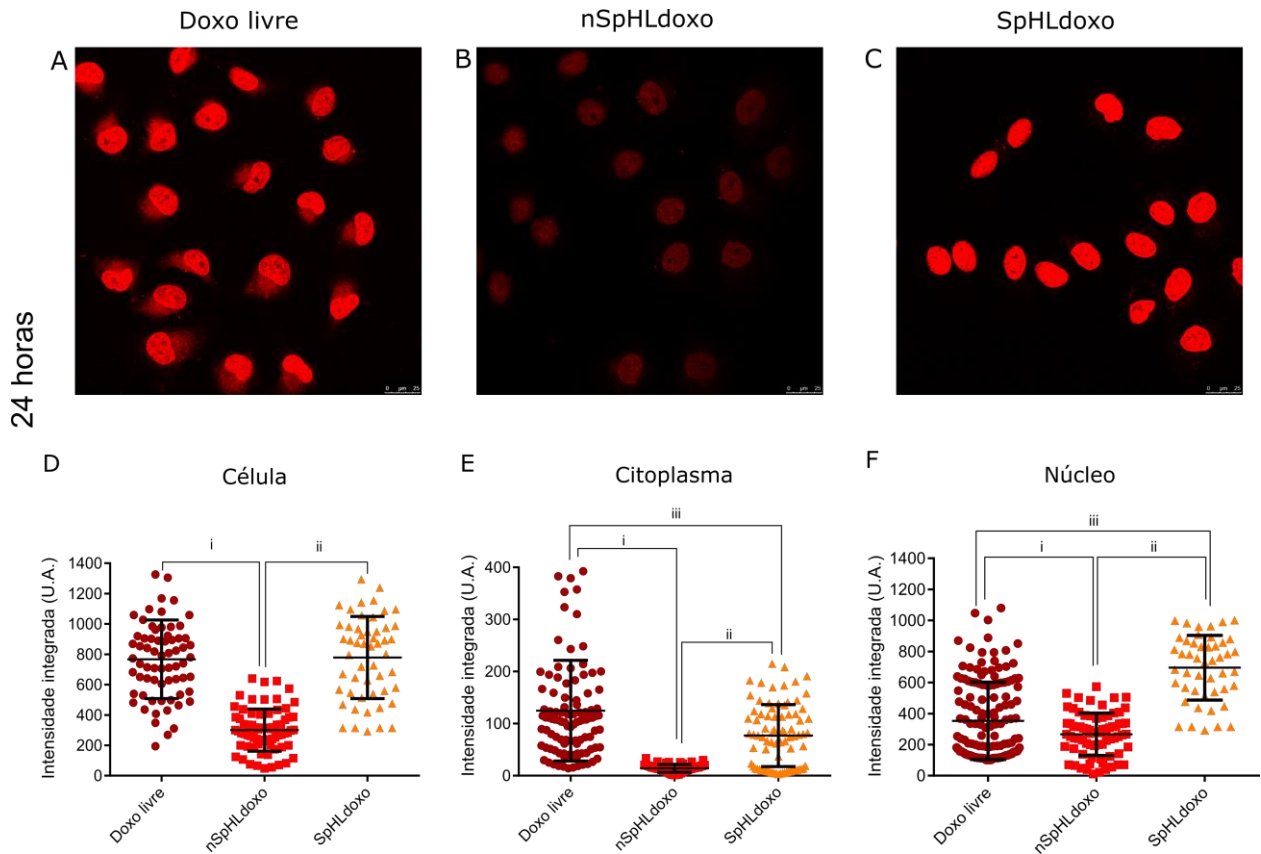


Figura 23. Intensidade de fluorescência da doxorubicina em células HeLa após tratamento com as formulações. As lâminas foram preparadas utilizando lamínulas em placas de 12 poços onde $4,0 \times 10^5$ células foram plaqueadas por poço. As células foram tratadas com o IC_{50} ($3,22 \mu M$) da doxorubicina livre. Após o período de 24 horas, o material foi fixado com PFA 4% e, subsequentemente, as imagens foram adquiridas por microscopia Confocal. Em vermelho está a marcação com doxorubicina. (A) Doxorubicina livre; (B) nSpHLdoxo; (C) SpHLdoxo; (D) intensidade integrada da doxorubicina na célula total, no citoplasma (E) e no núcleo (F). Nível de significância $p < 0,05$. Onde (i) mostra a diferença significativa entre doxo livre e nSpHLdoxo; (ii) diferença significativa entre SpHLdoxo e nSpHLdoxo; e (iii) diferença significativa entre doxo livre e SpHLdoxo.

Finalmente com esses resultados, sugere-se que o nSpHL causa um retardamento na distribuição de doxo na célula quando comparado com a doxo livre e o SpHLdoxo. A semelhança entre doxo livre e SpHLdoxo na distribuição de fluorescência da doxo favorece o uso de um lipossoma sensível ao pH para carrear uma concentração menor de doxorubicina com mesmo efeito do fármaco livre, mas com a vantagem de diminuir sua toxicidade. Em vista de analisar esse perfil de distribuição, realizou-se estudos de mecanismos de internalização celular, descritos a seguir.

4.3. DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE INTERNALIZAÇÃO POR ENDOCITOSE DAS FORMULAÇÕES

Após determinação do perfil e o tempo de internalização da doxorrubicina livre e das formulações lipossomais, investigou-se as principais vias de internalização e como elas influenciam o efeito biológico (*i.e.*, citotoxicidade) dos tratamentos. Porém, inicialmente, determinou-se as concentrações de inibidores que não apresentam toxicidade (de Jesus e Kapila 2014; Radaic et al. 2016).

As principais vias de internalização avaliadas no estudo foram endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolina e macropinocitose. Primeiramente, verificou-se a viabilidade de células HeLa em presença dos inibidores clorpromazina (2,5 μ M, 5 μ M e 10 μ M), inibidor de endocitose mediada por clatrina; filipina III (5 μ M, 10 μ M e 20 μ M), inibidor de endocitose mediada por caveolina; e wortmanina (50 nM, 100 nM e 150 nM), inibidor de macropinocitose. As concentrações utilizadas foram baseadas na literatura e em conhecimento prévio de nosso grupo (de Jesus e Kapila 2014; A Radaic e de Jesus 2018).

Os resultados apresentados na Figura 24, mostraram que com exceção do inibidor de wortmanina no tratamento de maior concentração (150 nM), que apresentou diferença significativa quando comparadas ao grupo controle, os demais inibidores não apresentaram citotoxicidade no período de 24 horas. Com base nesses resultados e na literatura, foram escolhidas as concentrações de clorpromazina 10 μ M, filipina III 20 μ M e wortmanina 100 nM, cuja a citotoxicidade em células HeLa não foram significantes.

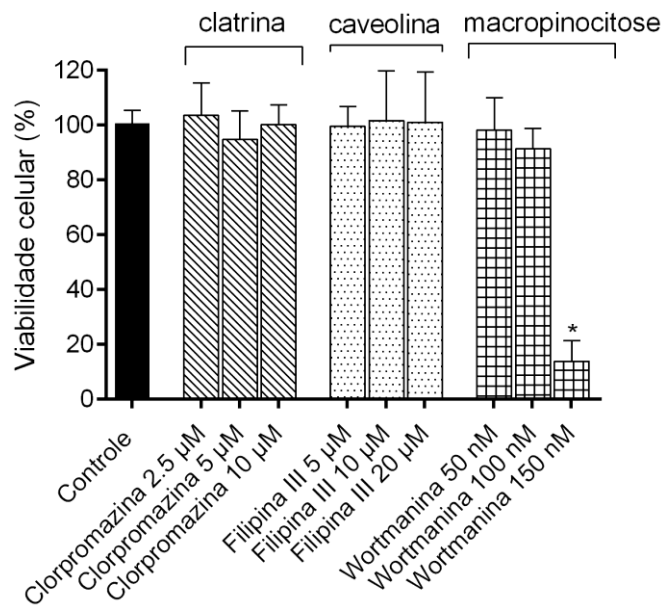


Figura 24. Viabilidade celular de células HeLa em presença de inibidores de endocitose: clorpromazina, filipina III e wortmanina. As células foram incubadas durante 6 horas em meio DMEM sem SFB, em estufa a 37°C e 5% de CO₂, e a viabilidade foi avaliada pelo ensaio de resazurina. O grupo controle sem inibidor foi considerado como 100% das células na viabilidade celular. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes (n=3). A análise estatística foi realizada utilizando-se teste One-Way ANOVA com pós teste de múltiplas análises de Bonferroni's. Nível de significância *p < 0,05.

Para realizar os estudos das vias de internalização da doxorubicina presente nas formulações, primeiramente avaliou-se a captação de doxorubicina em presença dos inibidores de endocitose, utilizando para quantificação de fluorescência por citometria de fluxo. A Figura 25 mostra os resultados da porcentagem de células que captaram doxorubicina em 4 horas, como determinado anteriormente (item 4.2.1.). Nenhum dos inibidores foi capaz de alterar significativamente a porcentagem de células que captou doxorubicina. Avaliou-se também se os inibidores de endocitose, que foram capazes de alterar a intensidade de sinal da doxorubicina intracelular (Figura 26), não sendo observadas diferenças significativas nesse parâmetro. Esses resultados eram de certa forma esperados para o fármaco livre, que pode depender das vias para internalizar, mas em sua maioria não depende de endocitose para adentrar as células. No entanto, as formulações lipossomais dependem da endocitose para serem internalizadas, dadas suas propriedades físico-químicas. Portanto, o que pode explicar esses resultados é um efeito compensatório que acontece quando uma via de endocitose é bloqueada, a célula

utiliza-se de outra via para continuar captando nutrientes do meio (de Jesus e Kapila 2014; Sahay, Alakhova, e Kabanov 2010).

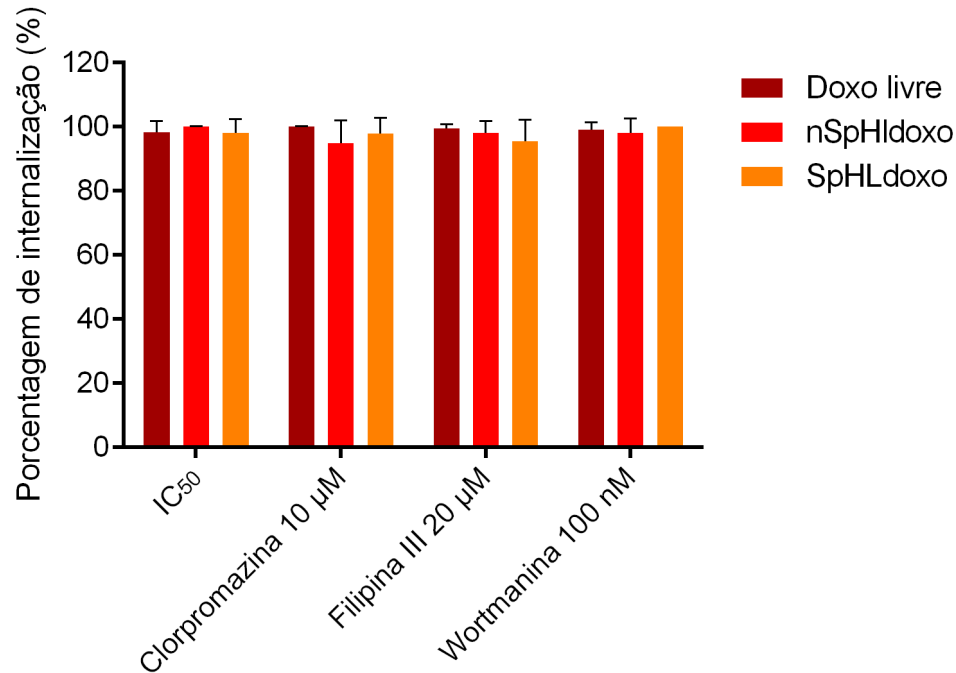


Figura 25. Porcentagem de Internalização da doxorubicina em células HeLa em presença de inibidores de endocitose. As células foram pré-tratadas com os inibidores (clorpromazina 10 µM, filipina III 20 µM e wortmanina 100 nM) durante 30 minutos e após esse período foram tratadas com as formulações de doxorubicina (Doxo livre, nSpHLdoxo e SpHLdoxo) por 4 horas, tripsinizados e acessados por citometria de fluxo. A internalização foi obtida pela multiplicação do número de células pela média de fluorescência (canal FLH2). Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes (n=3). A análise estatística foi realizada utilizando-se teste One-Way ANOVA com pós teste de múltiplas análises de Dunnet's. Nível de significância *p < 0,05.

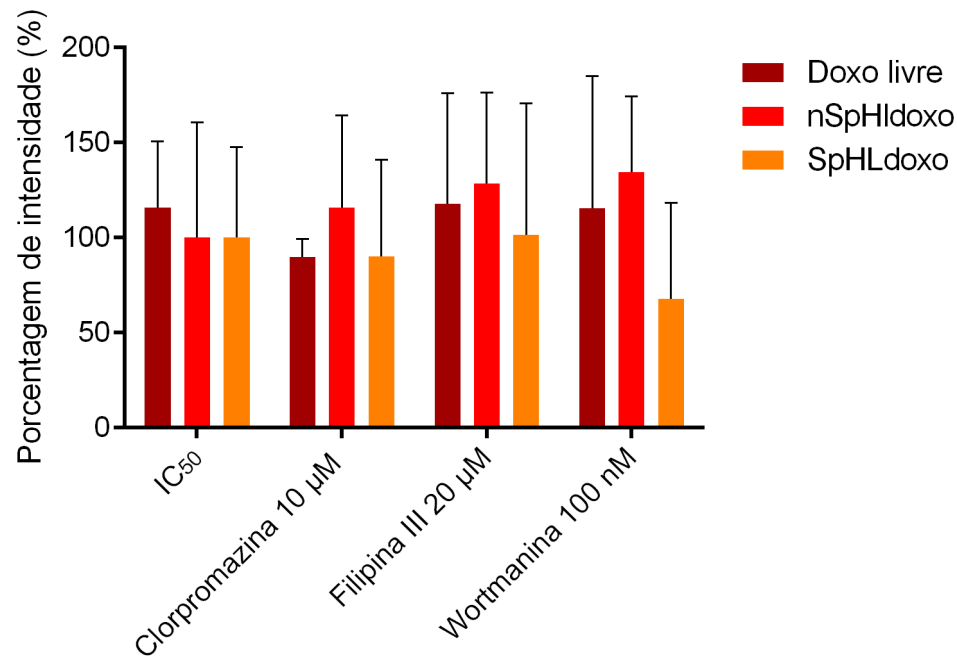


Figura 26. Porcentagem de Intensidade da doxorubicina em células HeLa em presença de inibidores de endocitose. As células foram pré-tratadas com os inibidores (clorpromazina 10 µM, filipina III 20 µM e wortmanina 100 nM) durante 30 minutos e após esse período foram tratadas com as formulações de doxorubicina (Doxo livre, nSpHLdoxo e SpHLdoxo) por 4 horas, tripsinizados e acessados por citometria de fluxo. A internalização foi obtida pela multiplicação do número de células pela média de fluorescência (canal FLH2). Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes (n=3). A análise estatística foi realizada utilizando-se teste One-Way ANOVA com pós teste de múltiplas análises de Dunnet's. Nível de significância *p < 0,05.

Finalmente avaliou-se a viabilidade das células tratadas em presença dos inibidores de endocitose utilizando método de resazurina. A Figura 27 A, mostra os tratamentos em presença de clorpromazina (inibidor da endocitose mediada por clatrina); Figura 27 B, tratamentos em presença de filipina III (inibidor da endocitose mediada por caveolina) e Figura 27 C, tratamentos em presença de wortmanina (inibidor da macropinocitose). Foram observadas algumas tendências como: aumento de viabilidade celular no tratamento usando SpHLdoxo na presença de filipina III 20 µM, e diminuição de viabilidade celular usando doxorubicina livre na presença de clorpromazina 10 µM e wortmanina 100 nM. Mas é interessante notar que nenhum dos inibidores, nas concentrações testadas, foram capazes de influenciar na viabilidade celular de maneira significativa. Uma possível explicação é de que quando uma via é inibida, outras acabam

compensando a internalização e o subsequente tráfego intracelular acabou não influenciando no efeito das formulações (de Jesus e Kapila 2014).

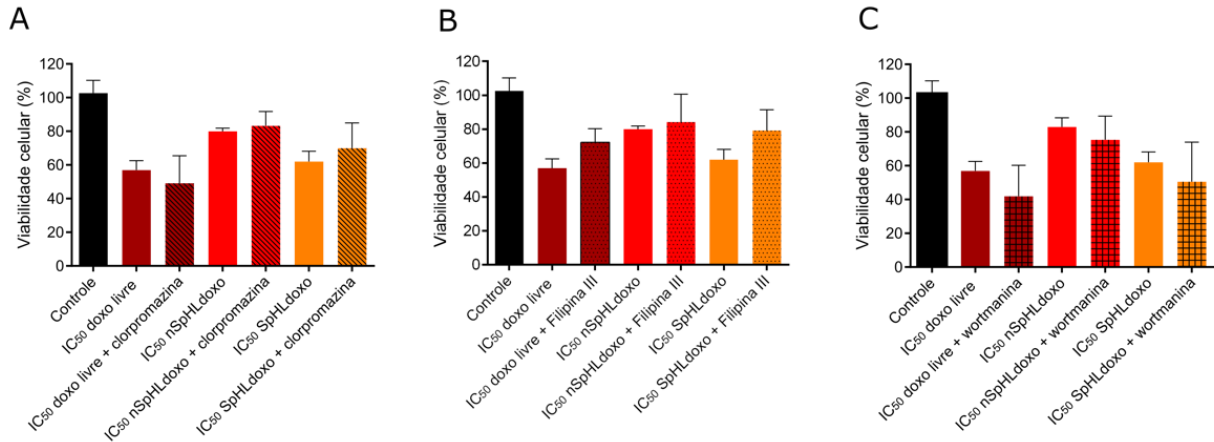


Figura 27. Viabilidade celular de células HeLa tratadas com as formulações sensíveis e não sensíveis ao pH contendo doxorubicina em presença de inibidores de endocitose. As células foram pré-tratadas com os inibidores (clorpromazina 10 μ M, filipina III 20 μ M e wortmanina 100 nM) durante 30 minutos e após esse período foram tratadas com as formulações de doxorubicina (Doxo livre, nSpHLdoxo e SpHLdoxo) por 6 horas, em meio DMEM sem SFB, em estufa a 37°C e 5% de CO₂, após o tempo de incubação os inibidores foram retirados e adicionou-se meio sem SFB até completar 24 horas. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de resazurina. O grupo controle sem inibidor foi considerado como 100% das células na viabilidade celular. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes (n=3). A análise estatística foi realizada utilizando-se teste One-Way ANOVA com pós teste de múltiplas análises de Bonferroni's. Nível de significância *p < 0,05.

4.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ACIDIFICAÇÃO ENDOSSOMAL NA CITOTOXICIDADE DAS FORMULAÇÕES

Após avaliação das vias de internalização da doxorubicina livre e carregada nas formulações lipossomais, passou-se então a investigar o papel da acidificação endossomal na liberação da doxorubicina.

Para isso, foram utilizados os inibidores de acidificação endossomal: cloroquina, bafilomicina e 3-metiladenina (3-MA), que têm mecanismos de ação conforme descrito a seguir.

A cloroquina é um agente lisossomotrópico que impede a acidificação endossômica, se acumula dentro em organelas ácidas, incluindo endossomos e lisossomos. Este acúmulo conduz à inibição de enzimas lisossomais que requerem um pH ácido, evitando a fusão de endossomos e lisossomos. Ela é comumente usada para estudar o papel da acidificação endossômica em processos celulares. Além disso, a

cloroquina inibe a autofagia, uma vez que aumenta o pH do lisossomo, o que leva à inibição tanto da fusão do autofagossomo com o lisossoma quanto da degradação da proteína lisossomal (Cheong et al. 2012; Steinman 1983).

A bafilomicina A1 é um inibidor conhecido da fase tardia da autofagia, que previne a maturação dos vacúolos autofágicos pela inibição da fusão entre autofagossomos e lisossomos, atuando também inibindo a H^+ ATPase vacuolar (V-ATPase) (Mauvezin et al. 2015; Yamamoto et al. 1998).

O 3-metiladenina (3-MA) é um inibidor de fosfatidilinositol 3-quinases (PI3K). O PI3K desempenha um papel importante em muitos processos biológicos, incluindo o controle da ativação do mTOR, um regulador chave da autofagia, ele inibe a autofagia bloqueando a formação de autofagossomos através da inibição da PI3K de classe III. (Cheong et al. 2012).

Portanto, os inibidores de acidificação apresentados previnem a acidificação do endossomo, fazendo com que haja o impedimento da sua fusão com o lisossomo, evitando que enzimas líticas presentes no interior dos lisossomos degradem o material internalizado (Ferreira et al. 2014; de Jesus e Kapila 2014). Acredita-se que isso possa ser benéfico para as formulações que seriam prontamente degradadas em ambiente mais ácidos, mas pode ser prejudicial para nanomateriais que dependem da acidificação para a liberação de seu conteúdo, ou para desempenhar sua função biológica, no caso o SpHLdoxo.

Para investigar o papel da acidificação sobre as formulações, primeiramente, validou-se os inibidores endossomais tendo como ponto de partida as concentrações encontradas na literatura, utilizou-se o LysoTracker[®] Red DND-99, uma sonda que contém um fluoróforo vermelho que possui alta fluorescência em meio ácido e é altamente seletivo para organelas ácidas, como endossomos tardios e lisossomos. Os pigmentos de LysoTracker[®] Red DND-99 identificam os granulos esféricos ácidos dentro das células, assim, ao utilizar os inibidores de acidificação endossomais nas concentrações indicadas é esperado que aconteça uma diminuição da intensidade de fluorescência da sonda confirmando a validação dos inibidores em células HeLa. Para esse estudo foram feitas imagens representativas da inibição da fluorescência da sonda pelos inibidores e para complementá-las, foi feita a quantificação da fluorescência

emitida pela sonda no Leitor Multidetecção Híbrido Cytation 5 (*BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA*).

Para todos os inibidores, cloroquina (Figura 28 imagem D, E e F; Figura 29 quantificação no gráfico), bafilomicina (Figura 30 imagem D, E e F e Figura 31 quantificação no gráfico) e 3-MA (Figura 32 imagem D, E e F e Figura 33 quantificação no gráfico), observamos que em 30 minutos houve uma diminuição pronunciada da intensidade de fluorescência da sonda em todas as concentrações quando comparado com as células sem tratamento (grupo controle). Após 4 horas, a cloroquina, a bafilomicina e o 3-MA apresentaram diferenças significativas quando comparado com o grupo controle. Sendo assim, foram determinados a dose resposta por tempo de tratamento, sugerindo quais as concentrações e os tempos que seriam eficientes para utilizar nos próximos experimentos.

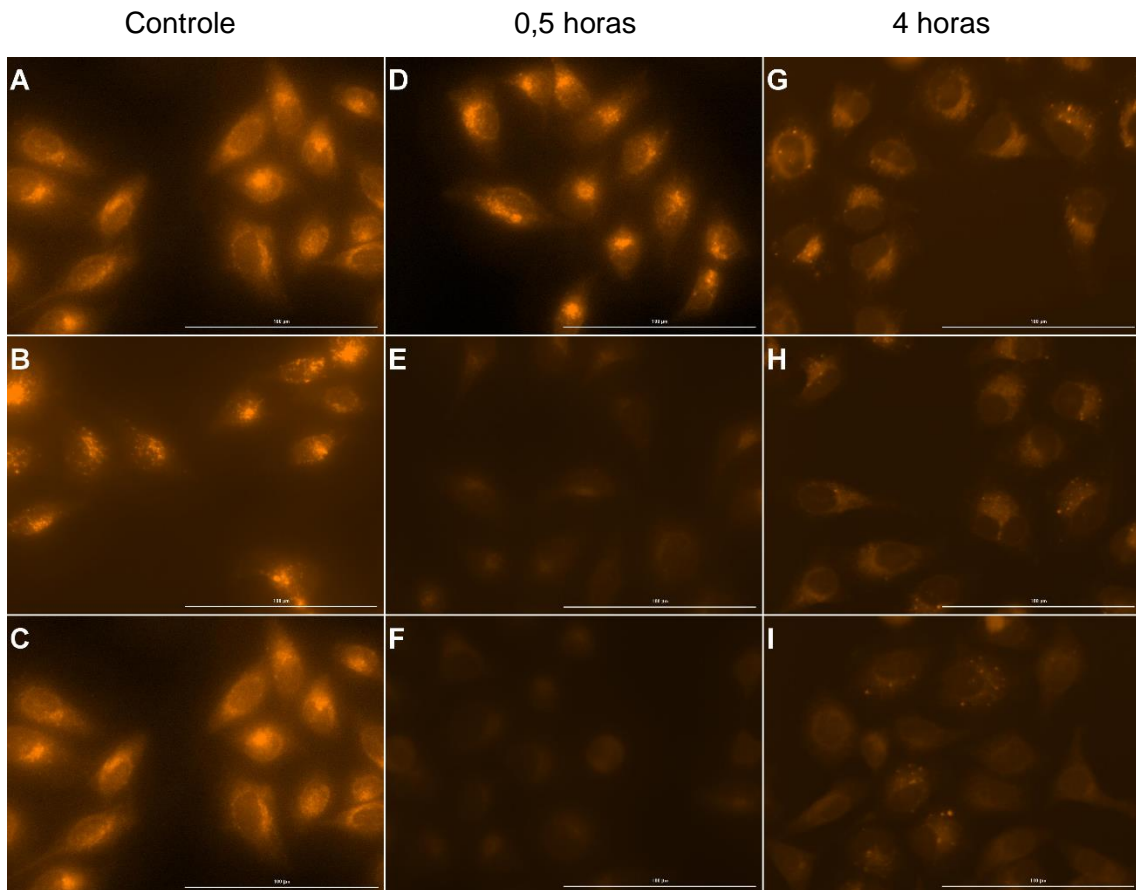


Figura 28. *Imagens da validação do inibidor de acidificação endossomal cloroquina em células HeLa. As células foram tratadas com LysoTracker® Red DND-99 durante 30 minutos, depois foi adicionado o inibidor cloroquina, nas concentrações de 10 μM, 20 μM e 50 μM. As células foram incubadas em meio DMEM sem SFB e sem antibiótico, em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 0,5 e 4 horas de tratamento com o inibidor, as fotos foram adquiridas no Leitor Multidetecção Híbrido Cytation 5 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) (escala 100 μm). A, B, C - grupo controle; D - cloroquina 10 μM, E - cloroquina 20 μM, F - cloroquina 50 μM após 0,5 hora da adição do inibidor; G - cloroquina 10 μM, H - cloroquina 20 μM, I - cloroquina 50 μM, após 4 horas da adição do inibidor.*

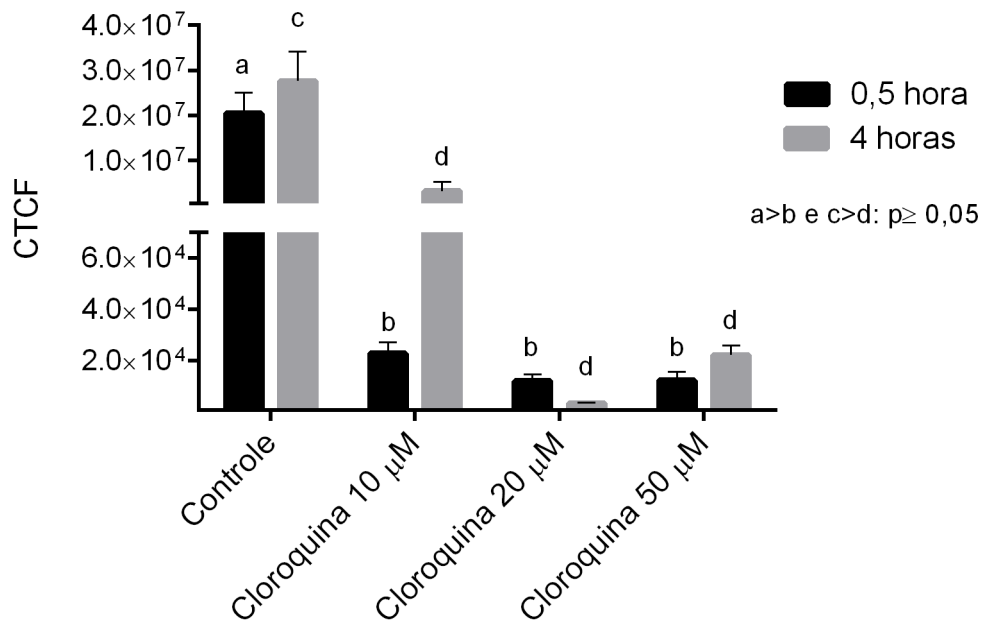


Figura 29. Validação do inibidor de acidificação endossomal cloroquina em células HeLa após 0,5 hora e 4 horas. As células foram tratadas com LysoTracker® Red DND-99 durante 30 minutos, depois foi adicionado cloroquina nas concentrações de 10 μM , 20 μM e 50 μM . As células foram incubadas em meio DMEM sem SFB, em estufa a 37°C e 5% CO_2 . Após 0,5 hora e 4 horas de tratamento com o inibidor, analisou-se a fluorescência no Leitor Multidetecção Híbrido Cytation 5 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). O CTCF (corrected total cell fluorescence) foi calculado como descrito da metodologia e os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes ($n=3$). A análise estatística foi realizada utilizando o teste Two-Way ANOVA e de comparação múltipla pelo Tukey Test. Nível de significância $p < 0,05$, onde $a > b$ e $c > d$.

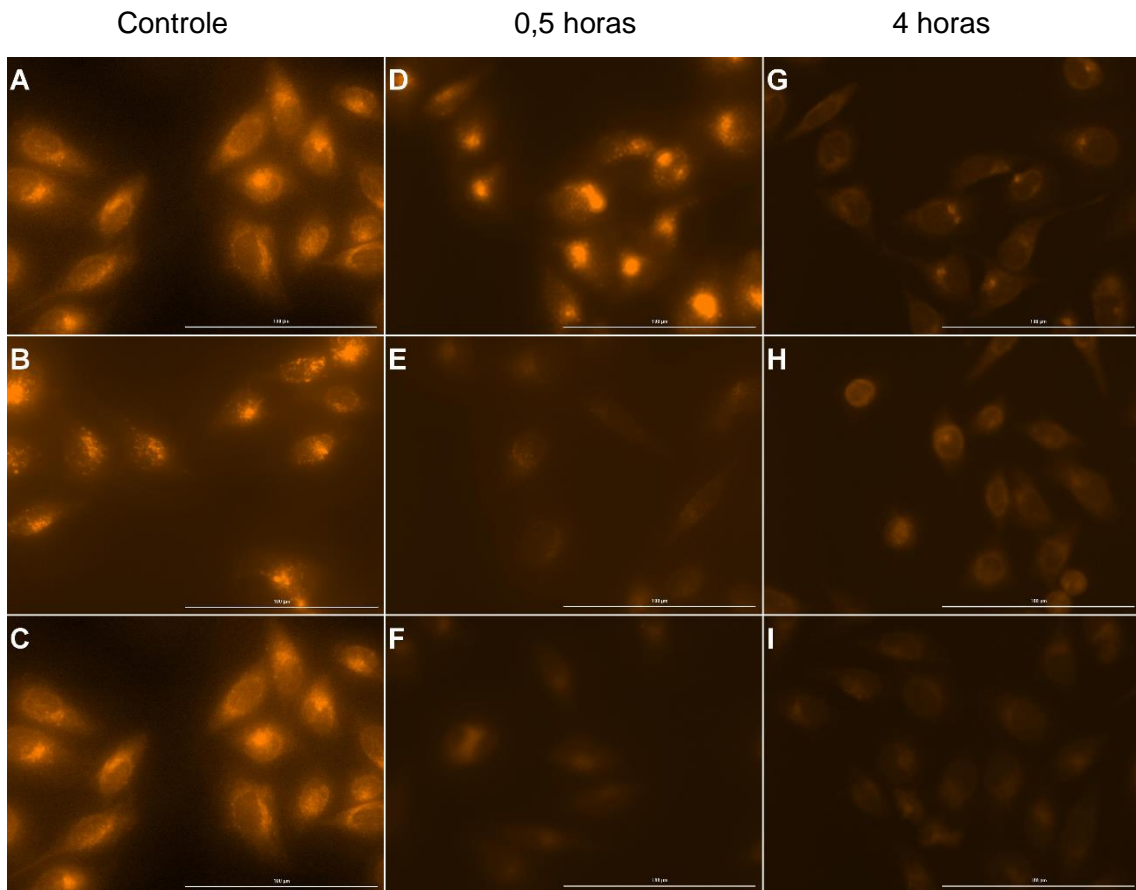


Figura 30. *Imagens da validação do inibidor de acidificação endossomal bafilomicina em células HeLa. As células foram tratadas com LysoTracker® Red DND-99 durante 30 minutos, depois foi adicionado o inibidor bafilomicina, nas concentrações de 0,1 µM, 0,5 µM e 1 µM. As células foram incubadas em meio DMEM sem SFB, em estufa a 37°C e 5% CO₂. Após 0,5 e 4 horas de tratamentos com o inibidor, as fotos foram adquiridas no Cytation 5 (escala 100 µm). A, B, C - grupo controle; D – bafilomicina 0,1 µM, E – bafilomicina 0,5 µM, F – bafilomicina 1 µM após 0,5 horas da adição do inibidor; G – bafilomicina 0,1 µM, H – bafilomicina 0,5 µM, I – bafilomicina 1 µM, após 4 horas da adição do inibidor.*

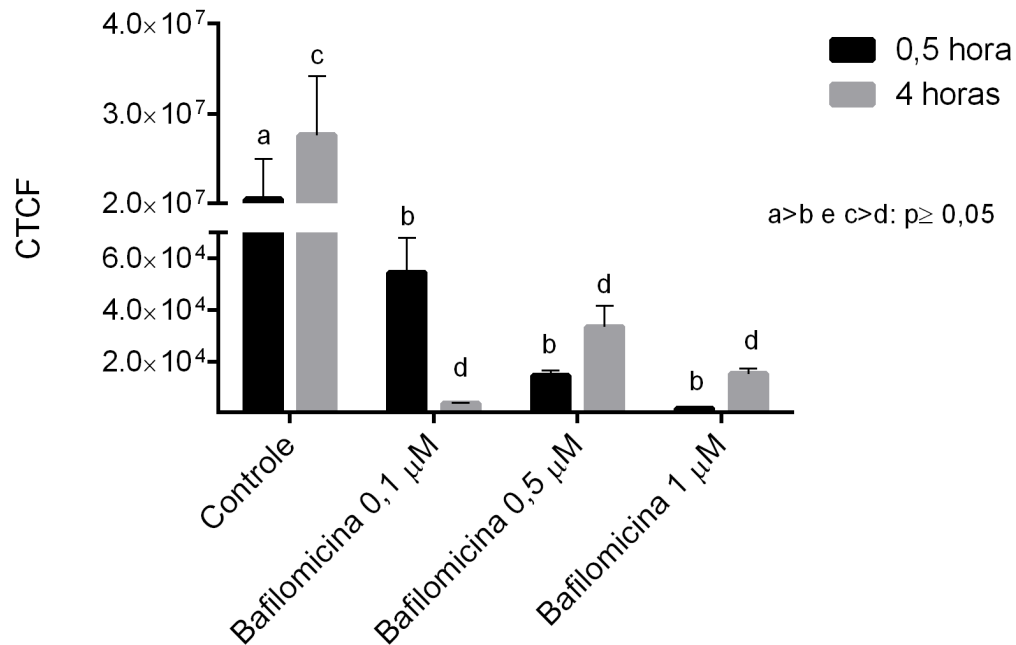


Figura 31. Validação do inibidor de acidificação endossomal bafilomicina em células HeLa após 0,5 hora e 4 horas. As células foram tratadas com LysoTracker® Red DND-99 durante 30 minutos, depois foi adicionado bafilomicina nas concentrações de 0,1 μM, 0,5 μM e 1 μM. As células foram incubadas em meio DMEM sem SFB, em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 0,5 hora e 4 horas de tratamento com o inibidor, analisou-se a fluorescência no Leitor Multidetecção Híbrido Cytation 5 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). O CTCF (corrected total cell fluorescence) foi calculado como descrito da metodologia e os resultados são expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes (n=3). A análise estatística foi realizada utilizando o teste Two-Way ANOVA e de comparação múltipla pelo Tukey Test. Nível de significância $p < 0,05$, onde $a > b$ e $c > d$.

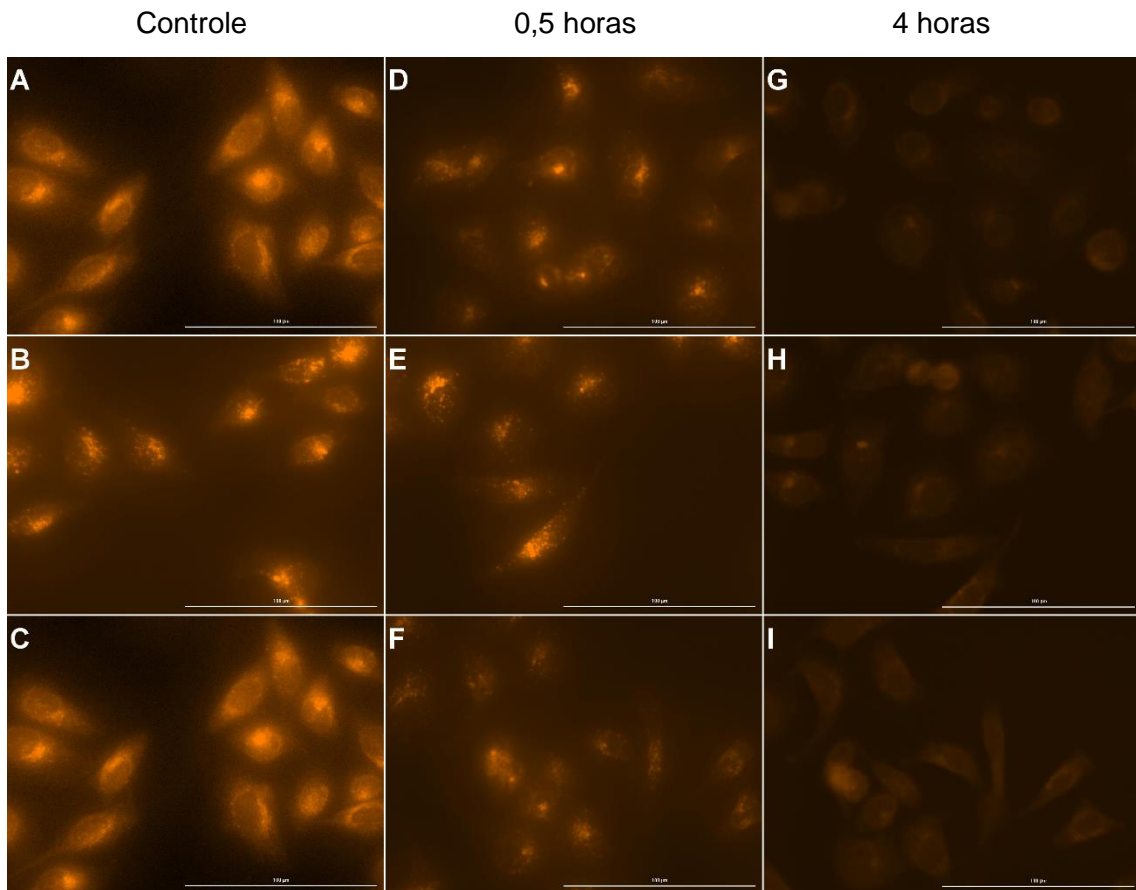


Figura 32. *Imagens da validação do inibidor de acidificação endossomal 3-Metiladenina (3-MA) em células HeLa. As células foram tratadas com LysoTracker® Red DND-99 durante 30 minutos, depois foi adicionado o inibidor 3-MA, nas concentrações de 2,5 mM, 5 mM e 10 mM. As células foram incubadas em meio DMEM sem SFB, em estufa a 37°C e 5% CO₂. Após 0,5 e 4 horas de tratamentos com o inibidor, as fotos foram adquiridas no Leitor Multidetecção Híbrido Cytation 5 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) (escala 100 μm). A, B, C - grupo controle; D – 3-MA 2,5 mM, E – 3-MA 5 mM, F – 3-MA 10 mM após 0,5 horas da adição do inibidor; G – 3-MA 2,5 mM, H – 3-MA 5 mM, I – 3-MA 10 mM, após 4 horas da adição do inibidor.*

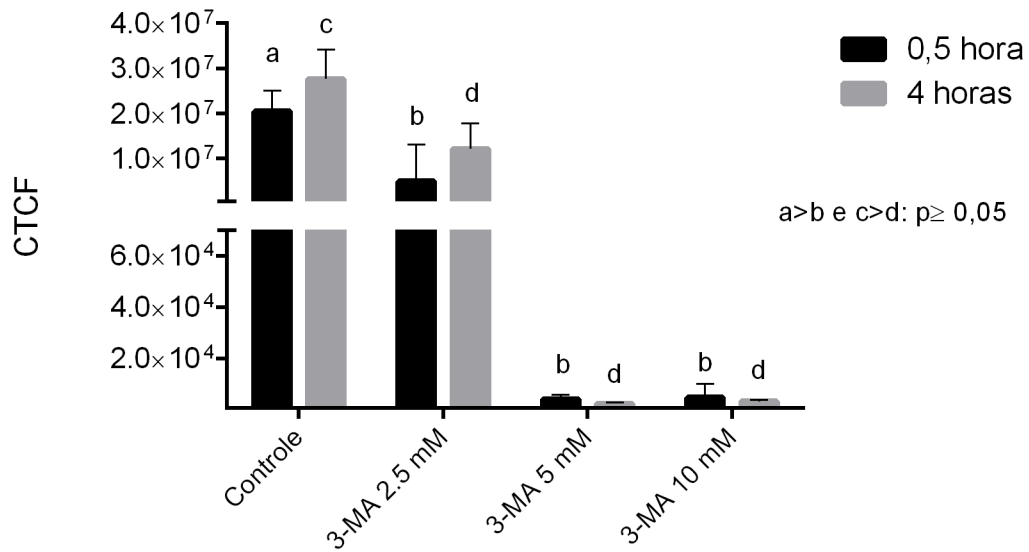


Figura 33. Validação do inibidor de acidificação endossomal 3-MA em células HeLa após 0,5 hora e 4 horas. As células foram tratadas com LysoTracker® Red DND-99 durante 30 minutos, depois foi adicionado 3-MA nas concentrações de 2,5 mM, 5 mM e 10 mM. As células foram incubadas em meio DMEM sem SFB, em estufa a 37°C e 5% CO₂. Após 0,5 hora e 4 horas de tratamento com o inibidor, analisou-se a fluorescência no Leitor Multidetecção Híbrido Cytation 5 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). O CTCF (corrected total cell fluorescence) foi calculado como descrito da metodologia e os resultados são expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes (n=3). A análise estatística foi realizada utilizando o teste Two-Way ANOVA e de comparação múltipla pelo Tukey Test. Nível de significância $p < 0,05$, onde $a > b$ e $c > d$.

Antes de utilizar os inibidores validados nas células tratadas com as formulações se fez necessário avaliar a viabilidade celular na presença destes, já que as concentrações utilizadas não podem apresentar efeitos tóxicos significativos, pois nessa condição não seria possível distinguir se o efeito observado ocorre devido à inibição da acidificação ou se é consequência da toxicidade do inibidor. Determinou-se a toxicidade das concentrações dos inibidores através da viabilidade celular com o método de resazurina (Figura 34). Foi observado que a cloroquina e a bafilomicina não alteraram a viabilidade em nenhuma concentração testada, já o 3-MA apresentou toxicidade nas concentrações de 5 e 10 mM. Portanto, utilizando os resultados da inibição da acidificação lisossomal e da viabilidade em presença dos inibidores determinamos que seria plausível usar cloroquina 20 µM, bafilomicina 0,5 µM e 3-MA 2,5 mM.

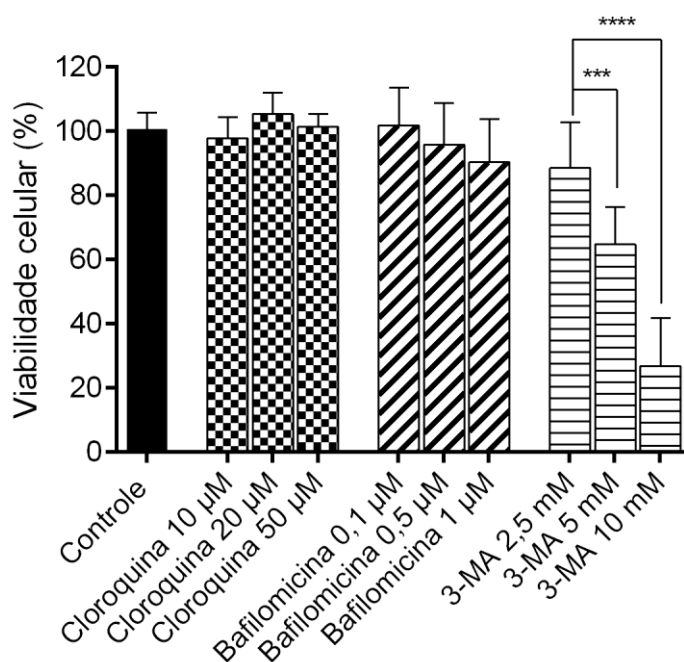


Figura 34. Viabilidade celular de células HeLa em presença dos inibidores de acidificação endossomal. Cloroquina, nas concentrações de 10 µM, 20 µM e 50 µM; bafilomicina, nas concentrações de 0,1 µM, 0,5 µM e 1 µM e 3-MA, nas concentrações de 2,5 mM, 5 mM e 10 mM. As células foram incubadas durante 6 horas em meio DMEM sem SFB, em estufa a 37°C e 5% de CO₂, e a viabilidade foi avaliada pelo ensaio com resazurina. O grupo controle sem inibidor foi considerado como 100% das células na viabilidade celular. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão de dois experimentos independentes (n=3). A análise estatística foi realizada utilizando-se teste One-Way ANOVA com pós teste de múltiplas análises de Bonferroni's. Nível de significância *p < 0,05.

Por fim, avaliou-se a viabilidade celular de células HeLa tratadas com doxorrubicina e as formulações lipossomais em presença dos inibidores de acidificação. Na Figura 35 pode-se observar que não houve diferença significativa na viabilidade celular na presença dos inibidores de acidificação endossomal bafilomicina e 3-MA, porém com o inibidor cloroquina (20 µM) houve uma redução na viabilidade celular com o tratamento de SpHLdoxo comparado ao grupo sem inibidor, possivelmente tenha potencializado o efeito da doxorrubicina quando esta foi entregue pelo lipossoma. Acredita-se que os inibidores de acidificação endossomal, possuem propriedades lisossomotrópicas e capacidade de inibição da autofagia, e são agentes promissores para serem usados em combinação com fármacos antineoplásico, sendo assim, os inibidores de acidificação endossomal potencializam o efeito da doxorrubicina (Liu et al. 2017), por isso observamos um aumento na citotoxicidade do fármaco. Não sendo possível justificar

a possível ação da viabilidade celular em presença dos inibidores de acidificação endossomal em 4 horas.

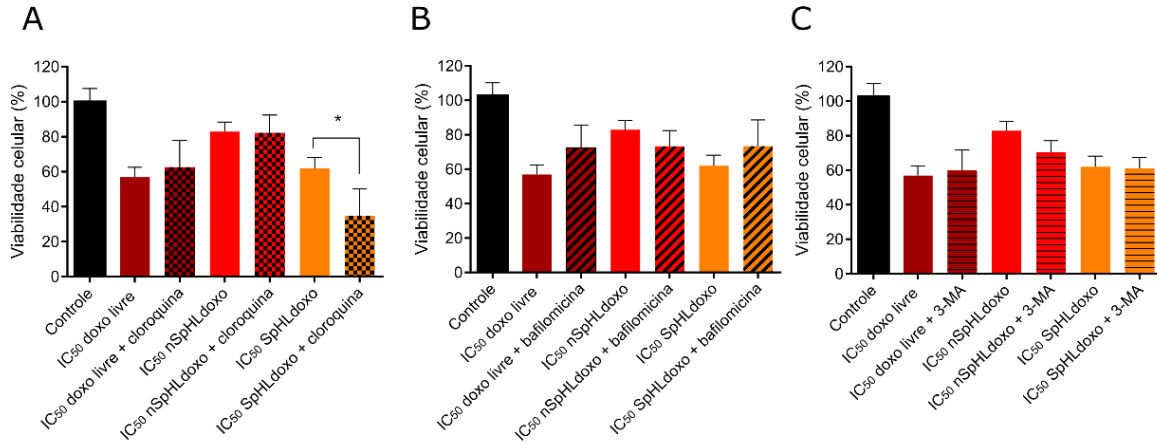


Figura 35. Viabilidade celular de células HeLa em presença de inibidores de acidificação endossomal (A) cloroquina 20 µM, (B) bafilomicina 0,5 µM e (C) 3-MA 2,5 mM. As células foram incubadas durante 4 h em meio DMEM sem SFB, em estufa a 37°C e 5% de CO₂, após o tempo de incubação os inibidores foram retirados e adicionou-se meio sem SFB, até completar 24 horas. Após 24 horas a viabilidade foi avaliada pelo ensaio de resazurina. O grupo controle sem inibidor foi considerado como 100% das células na viabilidade celular. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes (n=3). A análise estatística foi realizada utilizando-se teste One-Way ANOVA com pós teste de múltiplas análises de Bonferroni's. Nível de significância *p < 0,05.

4.5. AVALIAÇÃO DA APOPTOSE EM CÉLULAS HELa TRATADAS COM AS FORMULAÇÕES

Como descrito, a doxorubicina livre é capaz de induzir apoptose em células tumorais, incluindo HeLa (Huang et al. 2018). Com a finalidade de observar o mecanismo de apoptose das células tratadas com as formulações, foi realizada a imunomarcagem da proteína caspase-3 clivada, visto que, a ativação da caspase-3 é um dos passos importantes na execução da apoptose (Claire Pfeffer e Amareshwar Singh 2018).

Realizou-se um experimento (Figura 40, Figura 41, Figura 42 em anexo), o qual as células foram tratadas com os respectivos IC₅₀ de cada formulação (Tabela 4), onde pode-se observar que em 6 horas no tratamento de doxorubicina livre e com lipossoma não sensível ao pH houve uma marcação mais evidente de caspase-3 quando comparado com SpHLdoxo, já no tempo de 12 horas o nSpHL apresenta quase o mesmo perfil que a doxo livre. No tratamento com SpHLdoxo em 24 horas, observa-se uma

diminuição da marcação da caspase-3 no nSpHLdoxo em comparação aos outros tratamentos. Sendo evidente que para todos os tratamentos com as formulações contendo doxorubicina, a caspase-3 é ativada, indicando que o mecanismo de apoptose foi disparado, resultado já esperado, pois é descrito na literatura que a doxorubicina induz apoptose em células HeLa (Chen et al. 2012).

Os resultados impulsionaram uma dúvida, se a marcação de caspase-3 observada no tratamento nSpHLdoxo seria decorrente da utilização de uma maior concentração de doxorubicina como IC_{50} no experimento quando comparada aos outros tratamentos, ou se realmente o nSpHLdoxo seria mais eficaz no disparo da apoptose. Para isso, padronizou-se por realizar experimentos na mesma concentração de IC_{50} da doxorubicina livre (3,22 μ M).

Nas Figura 36, Figura 37 e Figura 38, mostram imagens representativas da célula HeLa com marcação em vermelho da doxorubicina e em verde da proteína caspase-3 clivada. Nos experimentos cujo o equivalente molar foi padronizado na mesma concentração que doxorubicina livre, observou-se (Figura 36) que houve disparo no mecanismo de apoptose em todos os tratamentos no período de 6 horas, porém com diferença significativa de intensidade entre eles, tendo a doxo livre uma intensidade maior seguida de nSpHLdoxo e SpHLdoxo. No período de 12 horas (Figura 37), houve um aumento na intensidade da caspase-3 apenas nos tratamentos doxo livre e SpHLdoxo e uma manutenção no nSpHLdoxo equivalente a 6 horas. Já no período de 24 (Figura 38) horas a intensidade de caspase-3 foi reduzida em todos os tratamentos, sendo essa redução proporcional na doxo livre e no SpHLdoxo. Resultados que comprovam que a apoptose ocorre devido a doxorubicina e que o lipossoma sensível ao pH apresenta uma equivalência de ativação da caspase-3 quando comparado ao fármaco livre.

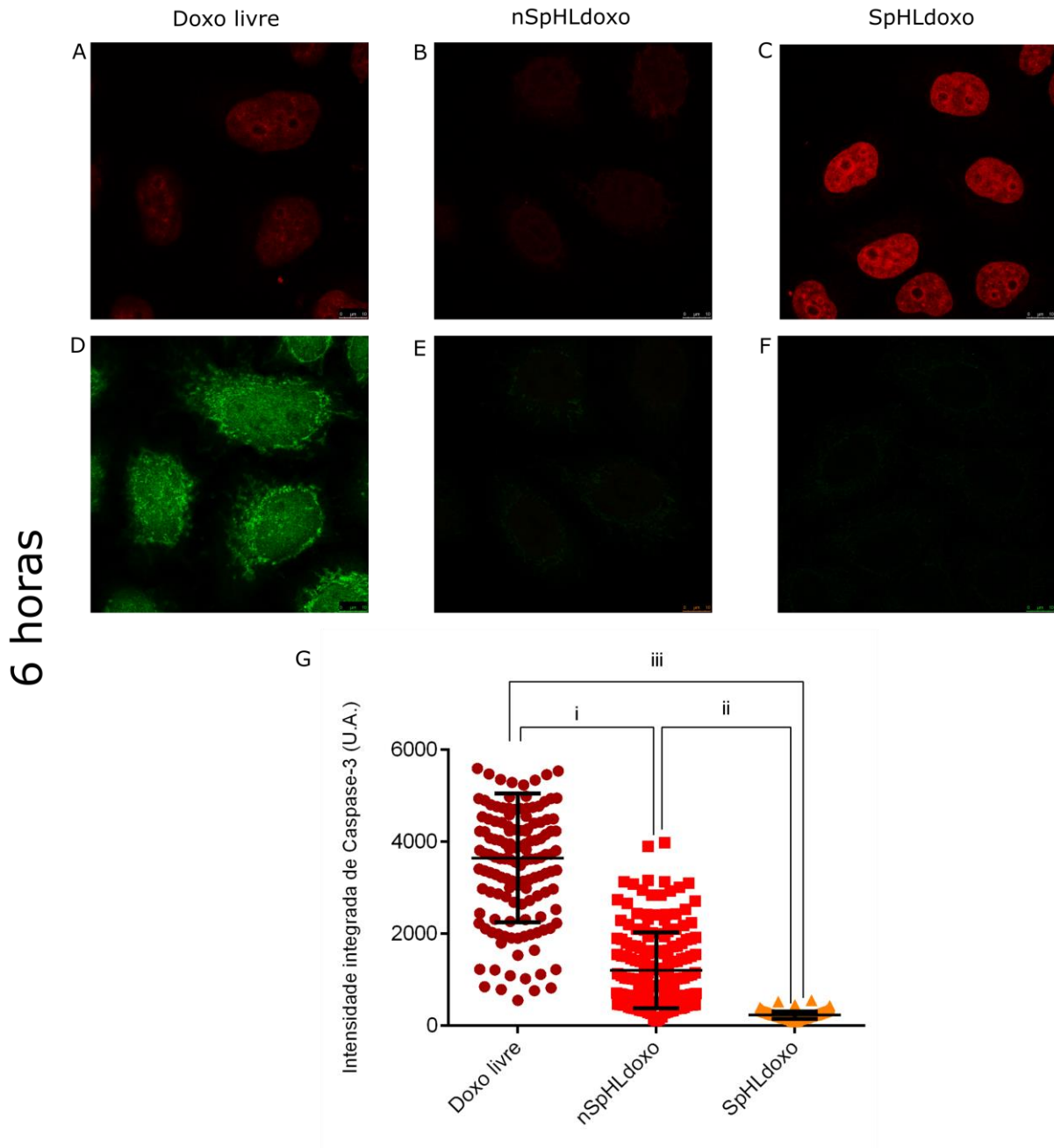


Figura 36. Marcação de imunocitoquímica da proteína caspase-3 clivada em células HeLa, após tratamento com as formulações. As lâminas para imunomarcagem foram preparadas utilizando lamínulas em placas de 12 poços onde $4,0 \times 10^5$ células foram plaqueadas por poço, as células foram tratadas com doxorubicina livre, nSpHLdoxo, SpHLdoxo, com a concentração de $3,22 \mu\text{M}$ (IC_{50} da doxorubicina livre), após o período de 6 horas o material foi fixado com PFA 4% e, subsequentemente, marcado com anticorpo primário para caspase-3 clivada e secundário Alexa 647. Imagens representativas da célula HeLa com marcação em vermelho doxorrubina e em verde da caspase 3; A – IC_{50} da doxorubicina livre; B- IC_{50} do nSpHLdoxo; C - IC_{50} do SpHLdoxo; e D – Gráfico da intensidade integrada de caspase-3 a partir dos tratamentos com as formulações. Nível de significância $p < 0,05$. Onde (i) diferença significativa entre doxo livre e nSpHLdoxo; (ii) diferença significativa entre SpHLdoxo e nSpHLdoxo; e (iii) diferença significativa entre doxo livre e SpHLdoxo.

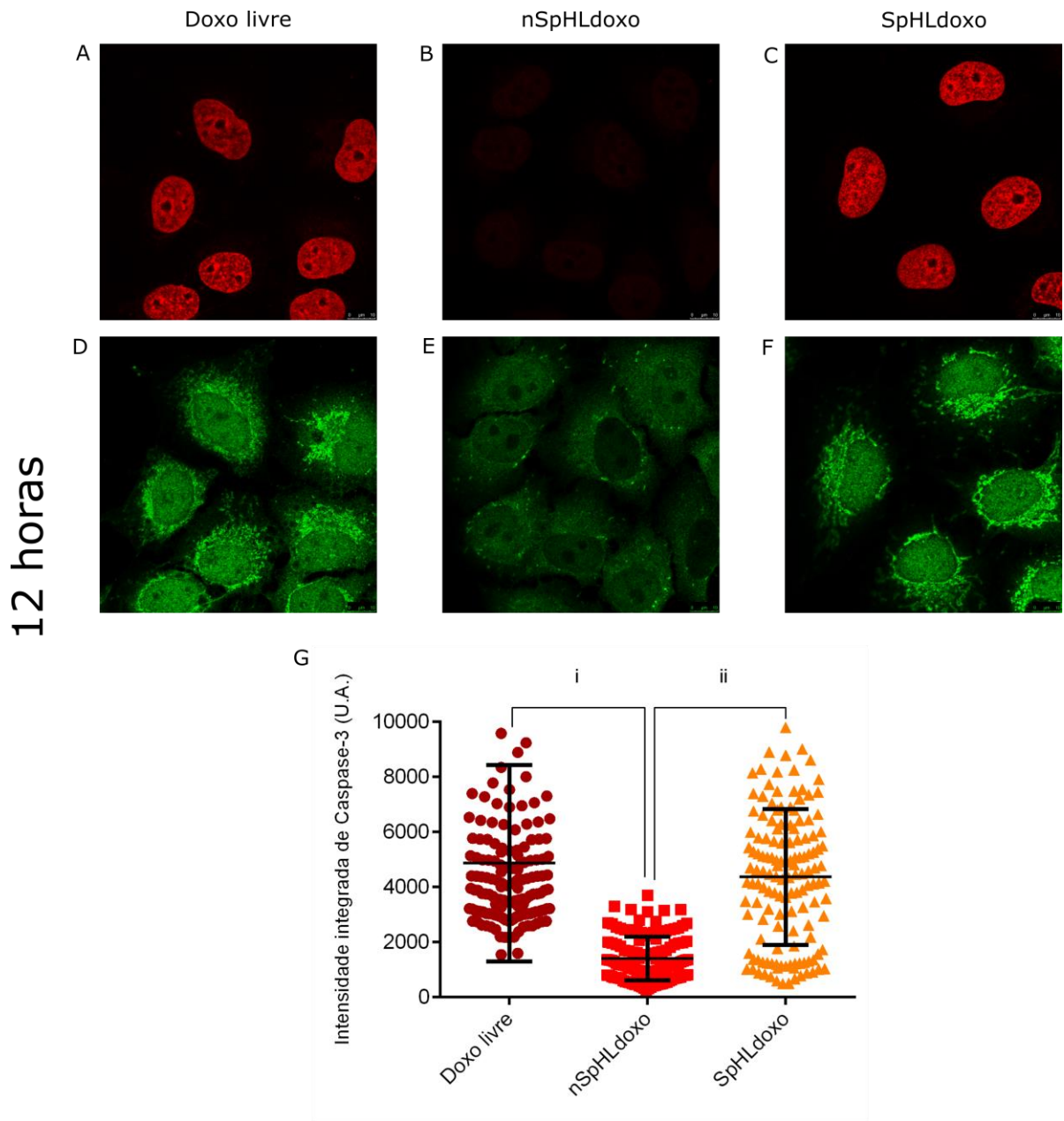


Figura 37. Marcação de imunocitoquímica da proteína caspase-3 clivada em células HeLa, após tratamento com as formulações. As lâminas para imunomarcção foram preparadas utilizando lamínulas em placas de 12 poços onde $4,0 \times 10^5$ células foram plaqueadas por poço, as células foram tratadas com doxorubicina livre, nSpHLdoxo, SpHLdoxo, com a concentração de $3,22 \mu\text{M}$ (IC_{50} da doxorubicina livre), após o período de 12 horas o material foi fixado com PFA 4% e, subsequentemente, marcado com anticorpo primário para caspase-3 clivada e secundário Alexa 647. Imagens representativas da célula HeLa com marcação em vermelho doxorrubicina e em verde da caspase 3; A – IC_{50} da doxorubicina livre; B- IC_{50} do nSpHLdoxo; C - IC_{50} do SpHLdoxo; e D – Gráfico da intensidade integrada de caspase-3 a partir dos tratamentos com as formulações. Nível de significância $p < 0,05$. Onde (i) diferença significativa entre doxo livre e nSpHLdoxo; (ii) diferença significativa entre SpHLdoxo e nSpHLdoxo; e (iii) diferença significativa entre doxo livre e SpHLdoxo.

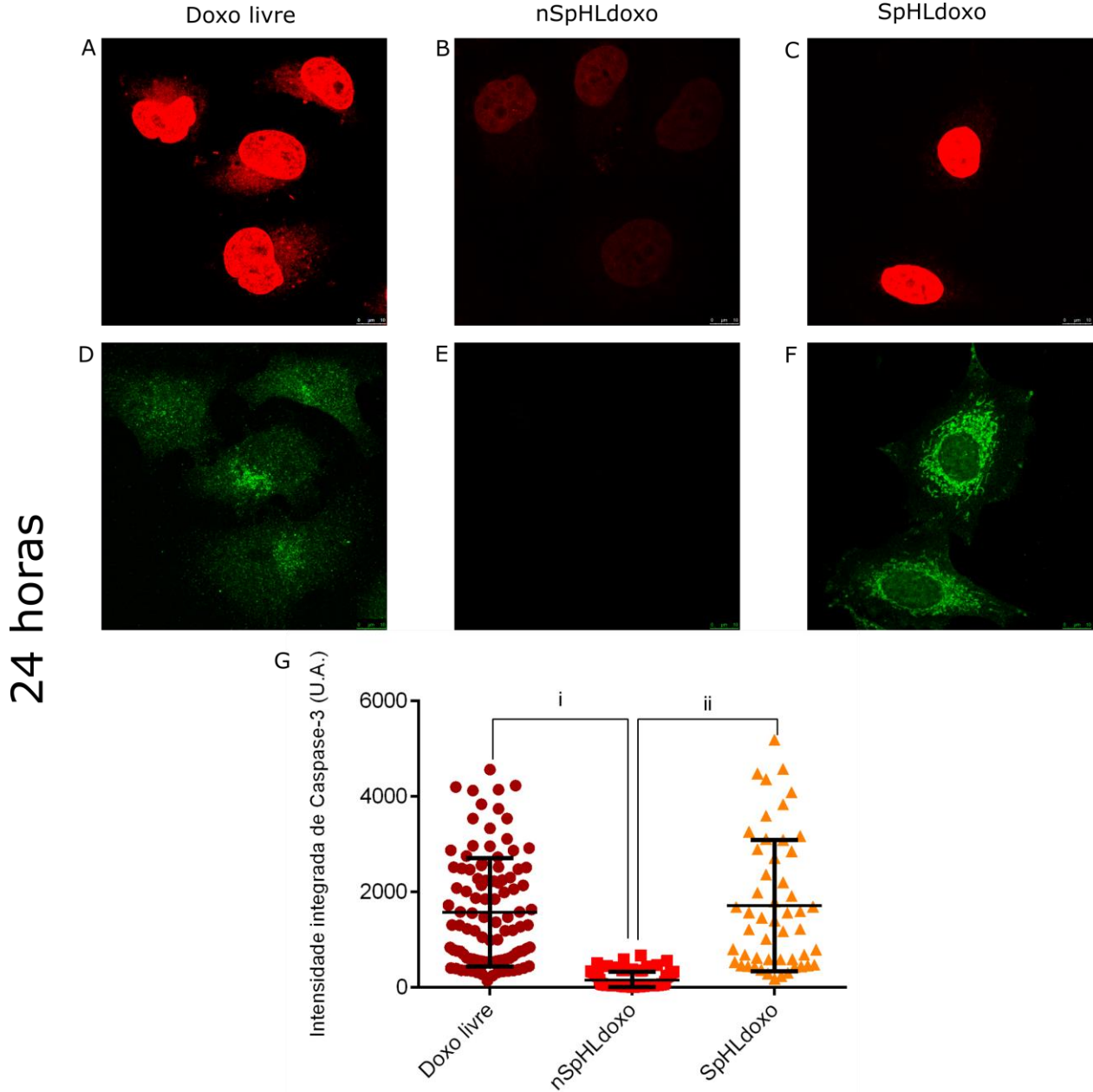


Figura 38. Marcação de imunocitoquímica da proteína caspase-3 clivada em células HeLa, após tratamento com as formulações. As lâminas para imunomarcção foram preparadas utilizando lamínulas em placas de 12 poços onde $4,0 \times 10^5$ células foram plaqueadas por poço, as células foram tratadas com doxorubicina livre, nSpHLdoxo, SpHLdoxo, com a concentração de $3,22 \mu\text{M}$ (IC_{50} da doxorubicina livre), após o período de 24 horas o material foi fixado com PFA 4% e, subsequentemente, marcado com anticorpo primário para caspase-3 clivada e secundário Alexa 647. Imagens representativas da célula HeLa com marcação em vermelho doxorubicina e em verde da caspase 3; A – IC_{50} da doxorubicina livre; B- IC_{50} do nSpHLdoxo; C - IC_{50} do SpHLdoxo; e D – Gráfico da intensidade integrada de caspase-3 a partir dos tratamentos com as formulações. Nível de significância $p < 0,05$. Onde (i) diferença significativa entre doxo livre e nSpHLdoxo; (ii) diferença significativa entre SpHLdoxo e nSpHLdoxo; e (iii) diferença significativa entre doxo livre e SpHLdoxo.

5. CONCLUSÃO

No presente estudo, pode-se concluir que a internalização das formulações doxo livre e SpHLdoxo foram internalizadas em menos tempo do que a nSpHLdoxo, entretanto a intensidade do sinal do fármaco livre foi maior, seguida da formulação SpHLdoxo, que por sua vez apresentou maior intensidade que a formulação nSpHLdoxo e através do ensaio de endocitose constatou-se que não há uma via específica de internalização para as formulações, pois utilizando os inibidores de endocitose não foi possível observar a diminuição da internalização da doxorubicina.

Outro ponto importante observado, foi que o tratamento com o nSpHLdoxo apresenta níveis menores de liberação de doxorubicina no núcleo. Já a formulação SpHLdoxo, apresentou uma liberação comparável aos de doxorubicina livre. Tendo vista, a hipótese de que o pH intracelular poderia ser um fator determinante para liberação da doxorubicina dos SpHLdoxo, o ensaio de acidificação endossomal foi realizado e pode-se concluir que o mesmo não influencia na liberação da doxorubicina intracelular pelos lipossomas, não sendo um fator determinante para sua eficácia tumoral.

A formulação SpHLdoxo apresentou um maior efeito tóxico frente as células HeLa que o nSpHLdoxo no período de 24 horas, e um IC₅₀ similar a doxo livre, determinando assim sua eficácia e citotoxicidade nas células tumorais. Com a marcação da proteína caspase-3 clivada, foi possível verificar que houve uma maior incidência de apoptose no tratamento com SpHLdoxo em relação a doxo livre e nSpHLdoxo, sugerindo que quanto maior a liberação do fármaco para sua entrega ao núcleo, maior é o disparo da apoptose e mais eficaz a ação do medicamento em células HeLa.

Esse estudo também ressalta técnicas padronizadas que podem ser ferramentas eficazes para avaliar o comportamento intracelular de sistemas de *drug delivery*, como lipossomas, reduzindo assim, o número de formulações que possivelmente não apresentariam nenhuma eficácia *in vivo*, evitando serem testadas e o uso desnecessário de animais.

Por fim, a aplicação da nanotecnologia em sistemas carreadores de fármacos tem apresentado diversificada melhoria na farmacocinética de compostos, diminuição na toxicidade e de efeitos adversos, devido a isso, lipossomas são uma estratégia interessante para aumentar a concentração de fármaco no tecido de interesse. Portanto,

os dados *in vitro* sugerem que o SpHL, pode ser uma alternativa promissora para efetiva entrega de fármacos, possuindo uma eficiência nos sistemas da liberação, apresentando um tratamento mais eficaz e menos tóxico ao organismo, ou seja, com menos efeitos adversos, pois utiliza-se uma menor concentração do fármaco quando se compara com o nSpHL e uma concentração similar ao fármaco livre, o que confirmou os estudo *in vivo*, no qual o SpHLdoxo demonstrou uma melhor absorção do fármaco no tumor quando comparados com o nSpHL. Além disso, esse estudo pode ser um ponto de partida para o desenvolvimento de novas formulações eficientes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akhter, Md. Habban et al. 2018. “Nanocarriers in Advanced Drug Targeting: Setting Novel Paradigm in Cancer Therapeutics”. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 46(5): 873–84.
- Allen, Theresa M., e Pieter R. Cullis. 2013. “Liposomal Drug Delivery Systems: From Concept to Clinical Applications”. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65(1): 36–48.
- Angius, Fabrizio, e Alice Floris. 2015. “Liposomes and MTT Cell Viability Assay: An Incompatible Affair”. *Toxicology in Vitro* 29(2): 314–19.
- Barenholz, Yechezkel (Chezy). 2012. “Doxil® — The First FDA-Approved Nano-Drug: Lessons Learned”. *Journal of Controlled Release* 160(2): 117–34.
- Beddoes, Charlotte M., C. Patrick Case, e Wuge H. Briscoe. 2015. “Understanding Nanoparticle Cellular Entry: A Physicochemical Perspective”. *Advances in Colloid and Interface Science* 218: 48–68.
- Bertrand, Nicolas et al. 2014. “Cancer Nanotechnology: The Impact of Passive and Active Targeting in the Era of Modern Cancer Biology”. *Advanced Drug Delivery Reviews* 66: 2–25.
- Brown, J. Martin, e Laura D. Attardi. 2005. “The Role of Apoptosis in Cancer Development and Treatment Response”. *Nature Reviews Cancer* 5(3): 231–37.
- Carpenter, Anne E et al. 2006. “CellProfiler: Image Analysis Software for Identifying and Quantifying Cell Phenotypes”. *Genome Biology*: 11.
- Chen, Nai-Tzu et al. 2012. “Probing the Dynamics of Doxorubicin-DNA Intercalation during the Initial Activation of Apoptosis by Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM)” org. Maria A. Deli. *PLoS ONE* 7(9): e44947.
- Cheong, Heesun, Chao Lu, Tullia Lindsten, e Craig B Thompson. 2012. “Therapeutic Targets in Cancer Cell Metabolism and Autophagy”. *Nature Biotechnology* 30(7): 671–78.
- Chung, Clement. 2018. “Restoring the Switch for Cancer Cell Death: Targeting the Apoptosis Signaling Pathway”. *American Journal of Health-System Pharmacy* 75(13): 945–52.
- Claire Pfeffer, e Amareshwar Singh. 2018. “Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy”. *International Journal of Molecular Sciences* 19(2): 448.
- Ferreira, L. A. B. et al. 2014. “Endocitose e tráfego intracelular de nanomateriais”. *Acta Farmacêutica Portuguesa* 3(2): 149–166.

- . 2015. “Citotoxicidade, endocitose e processamento celular de nanopartículas biossintéticas de prata em macrófagos peritoneais”.
- Fichter, Katye M., Nilesh P. Ingle, Patrick M. McLendon, e Theresa M. Reineke. 2013. “Polymeric Nucleic Acid Vehicles Exploit Active Interorganellar Trafficking Mechanisms”. *ACS Nano* 7(1): 347–64.
- Fox, Joanna L, e Marion MacFarlane. 2016. “Targeting Cell Death Signalling in Cancer: Minimising ‘Collateral Damage’”. *British Journal of Cancer* 115(1): 5–11.
- Galluzzi, Lorenzo et al. 2018. “Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018”. *Cell Death & Differentiation* 25(3): 486–541.
- Ghobrial, I. M., T. E. Witzig, e A. A. Adjei. 2005. “Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy”. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 55(3): 178–94.
- Gilgenkrantz, S. 2014. “[Sixty years of HeLa cell cultures].” *Histoire des sciences médicales* 48(1): 139–44.
- Heinrich, A.-K. et al. 2016. “Improved Tumor-Specific Drug Accumulation by Polymer Therapeutics with PH-Sensitive Drug Release Overcomes Chemotherapy Resistance”. *Molecular Cancer Therapeutics* 15(5): 998–1007.
- Huang, Zixin et al. 2018. “Notch Signaling Pathway Mediates Doxorubicin-Driven Apoptosis in Cancers”. *Cancer Management and Research* Volume 10: 1439–48.
- Ichim, Gabriel, e Stephen W. G. Tait. 2016. “A Fate Worse than Death: Apoptosis as an Oncogenic Process”. *Nature Reviews Cancer* 16(8): 539–48.
- Ivask, Angela et al. 2018. “Methodologies and Approaches for the Analysis of Cell-Nanoparticle Interactions: Analysis of Cell-Nanoparticle Interactions”. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 10(3): e1486.
- Jabir, Nasimudeen R. et al. 2018. “An Overview on the Current Status of Cancer Nanomedicines”. *Current Medical Research and Opinion* 34(5): 911–21.
- de Jesus, Marcelo Bispo, e Yvonne L. Kapila. 2014. “Cellular Mechanisms in Nanomaterial Internalization, Intracellular Trafficking, and Toxicity”. In *Nanotoxicology*, orgs. Nelson Durán, Silvia S. Guterres, e Oswaldo L. Alves. New York, NY: Springer New York, 201–27. http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-8993-1_9 (24 de janeiro de 2018).
- Kraft, John C., Jennifer P. Freeling, Ziyao. Wang, e Rodney J.Y. Ho. 2014. “Emerging Research and Clinical Development Trends of Liposome and Lipid Nanoparticle Drug Delivery Systems”. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 103(1): 29–52.

- Liu, Zongyu et al. 2017. "Pharmacokinetics of a Liposomal Formulation of Doxorubicin in Rats". *Saudi Pharmaceutical Journal* 25(4): 531–36.
- Lombardo, Domenico et al. 2016. "Soft Interaction in Liposome Nanocarriers for Therapeutic Drug Delivery". *Nanomaterials* 6(7): 125.
- Lucey, Brendan P., Walter A. Nelson-Rees, e Grover M. Hutchins. 2009. "Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination". *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 133(9): 1463–67.
- Maeda, Hiroshi, Hideaki Nakamura, e Jun Fang. 2013. "The EPR Effect for Macromolecular Drug Delivery to Solid Tumors: Improvement of Tumor Uptake, Lowering of Systemic Toxicity, and Distinct Tumor Imaging in Vivo". *Advanced Drug Delivery Reviews* 65(1): 71–79.
- Manohar, Sunny et al. 2013. "Synthesis, Antimalarial Activity and Cytotoxic Potential of New Monocarbonyl Analogues of Curcumin". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 23(1): 112–16.
- Matsumura, Yasuhiro, e Hiroshi Maeda. "A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs". : 7.
- Mauvezin, Caroline, Péter Nagy, Gábor Juhász, e Thomas P. Neufeld. 2015. "Autophagosome–Lysosome Fusion Is Independent of V-ATPase-Mediated Acidification". *Nature Communications* 6(1). <http://www.nature.com/articles/ncomms8007> (25 de julho de 2019).
- McGowan, John V et al. 2017. "Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity". *Cardiovascular Drugs and Therapy* 31(1): 63–75.
- Miyazaki, Maiko et al. 2018. "Hyaluronic Acid-Based PH-Sensitive Polymer-Modified Liposomes for Cell-Specific Intracellular Drug Delivery Systems". *Bioconjugate Chemistry* 29(1): 44–55.
- Mohan, Praveena, e Natalya Rapoport. 2010. "Doxorubicin as a Molecular Nanotheranostic Agent: Effect of Doxorubicin Encapsulation in Micelles or Nanoemulsions on the Ultrasound-Mediated Intracellular Delivery and Nuclear Trafficking". *Molecular Pharmaceutics* 7(6): 1959–73.
- Nikoletopoulou, Vassiliki, Maria Markaki, Konstantinos Palikaras, e Nektarios Tavernarakis. 2013. "Crosstalk between Apoptosis, Necrosis and Autophagy". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833(12): 3448–59.
- de Oliveira Silva, Juliana et al. 2018. "Toxicological Study of a New Doxorubicin-Loaded PH-Sensitive Liposome: A Preclinical Approach". *Toxicology and Applied Pharmacology* 352: 162–69.

- Olusanya, Temidayo et al. 2018. "Liposomal Drug Delivery Systems and Anticancer Drugs". *Molecules* 23(4): 907.
- Pan, Cai-Yuan, Liang Qiu, e Chun-Yan Hong. 2015. "Doxorubicin-Loaded Aromatic Imine-Contained Amphiphilic Branched Star Polymer Micelles: Synthesis, Self-Assembly, and Drug Delivery". *International Journal of Nanomedicine*: 3623.
- Pandey, Himanshu et al. 2016. "Liposome and Their Applications in Cancer Therapy". *Brazilian Archives of Biology and Technology* 59(0). http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132016000100303&lng=en&tlng=en (13 de julho de 2018).
- Pugazhendhi, Arivalagan et al. 2018. "Toxicity of Doxorubicin (Dox) to Different Experimental Organ Systems". *Life Sciences* 200: 26–30.
- Radaic, A, e M B de Jesus. 2018. "Solid Lipid Nanoparticles Release DNA upon Endosomal Acidification in Human Embryonic Kidney Cells". *Nanotechnology* 29(31): 315102.
- Radaic, Allan et al. 2016. "Como estudar interações entre nanopartículas e sistemas biológicos". *Química Nova*. http://quimicanova.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=6504&nomeArquivo=RV20160241.pdf (24 de janeiro de 2018).
- Sahay, Gaurav, Daria Y. Alakhova, e Alexander V. Kabanov. 2010. "Endocytosis of Nanomedicines". *Journal of Controlled Release* 145(3): 182–95.
- Santos, Luís C. et al. 2019. "Mitochondrial Origins of Fractional Control in Regulated Cell Death". *Nature Communications* 10(1). <http://www.nature.com/articles/s41467-019-09275-x> (1º de abril de 2019).
- Schindelin, Johannes et al. 2012. "Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis". *Nature Methods* 9(7): 676–82.
- Silva, Juliana O. et al. 2016. "PH-Sensitive, Long-Circulating Liposomes as an Alternative Tool to Deliver Doxorubicin into Tumors: A Feasibility Animal Study". *Molecular Imaging and Biology* 18(6): 898–904.
- Song, Yan-feng et al. 2015. "Dual Subcellular Compartment Delivery of Doxorubicin to Overcome Drug Resistant and Enhance Antitumor Activity". *Scientific Reports* 5(1). <http://www.nature.com/articles/srep16125> (3 de abril de 2019).
- Steinman, R. M. 1983. "Endocytosis and the Recycling of Plasma Membrane". *The Journal of Cell Biology* 96(1): 1–27.
- Su, Hong et al. 2018. "Potential Applications and Human Biosafety of Nanomaterials Used in Nanomedicine: Potential Applications and Human Biosafety of Nanomaterials". *Journal of Applied Toxicology* 38(1): 3–24.

- Tila, Dena, Saeed Ghasemi, Seyedeh Narjes Yazdani-Arazi, e Saeed Ghanbarzadeh. 2015. "Functional Liposomes in the Cancer-Targeted Drug Delivery". *Journal of Biomaterials Applications* 30(1): 3–16.
- Torchilin, Vladimir. 2011. "Tumor Delivery of Macromolecular Drugs Based on the EPR Effect". *Advanced Drug Delivery Reviews* 63(3): 131–35.
- Vieira, Débora Braga, e Lionel Fernel Gamarra. 2016. "Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment". *Einstein (São Paulo)* 14(1): 99–103.
- Vijay, Kariyappa et al. 2018. "Low-Dose Doxorubicin with Carotenoids Selectively Alters Redox Status and Upregulates Oxidative Stress-Mediated Apoptosis in Breast Cancer Cells". *Food and Chemical Toxicology* 118: 675–90.
- Yamamoto, Akitsugu, Yoshihiro Tagawa, Tamotsu Yoshimori, e Yoshinori Moriyama. "Bafilomycin A1 Prevents Maturation of Autophagic Vacuoles by Inhibiting Fusion of Autophagosomes and Lysosomes in Rat Hepatoma Cell Line", . : 10.
- Yameen, Basit et al. 2014. "Insight into Nanoparticle Cellular Uptake and Intracellular Targeting". *Journal of Controlled Release* 190: 485–99.

7. ANEXOS

7.1. ACÚMULO NUCLEAR DA DOXORRUBICINA EM CÉLULAS HELA

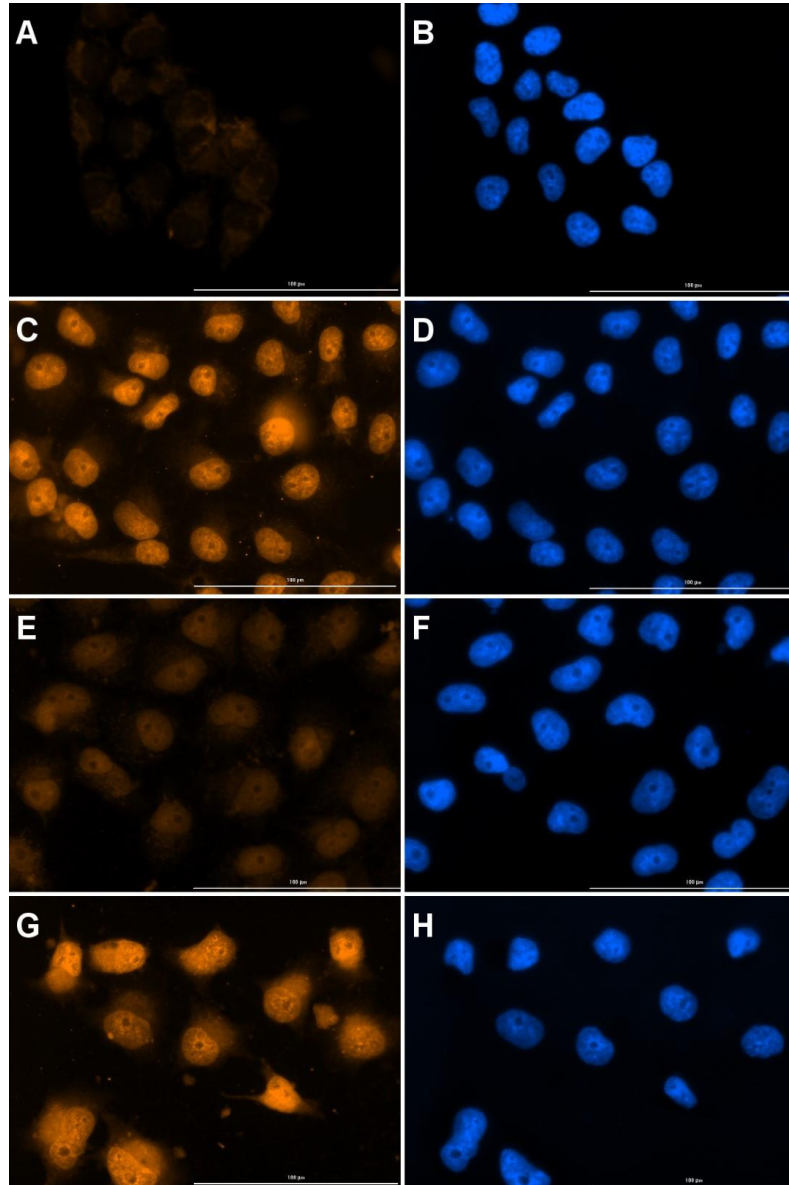


Figura 39. *Imagens representativas do acúmulo nuclear da doxorubicina em células HeLa. As lâminas foram preparadas utilizando lamínulas em placas de 12 poços onde $4,0 \times 10^5$ células foram plaqueadas por poço, as células foram tratadas a partir dos IC_{50} da solução de doxorubicina livre, nSpHLdoxo, SpHLdoxo e um grupo controle não tratado, após 24 h o material foi fixado com PFA 4%. A fluorescência da doxorubicina foi observada no canal RFP. Barra de escala: 100 µm. Linhas: A e B – grupo controle; C e D – IC_{50} no tratamento de Doxo livre; E e F - IC_{50} no tratamento nSpHLdoxo; G e H - IC_{50} no tratamento SpHLdoxo. Colunas: 1- Doxorubicina (RFP - vermelho); 2 – Hoechst 33342 (DAPI -azul).*

7.2. MARCAÇÃO DE IMUNOCITOQUÍMICA DA PROTEÍNA CASPASE-3 CLIVADA EM CÉLULAS HELA EM TEMPOS

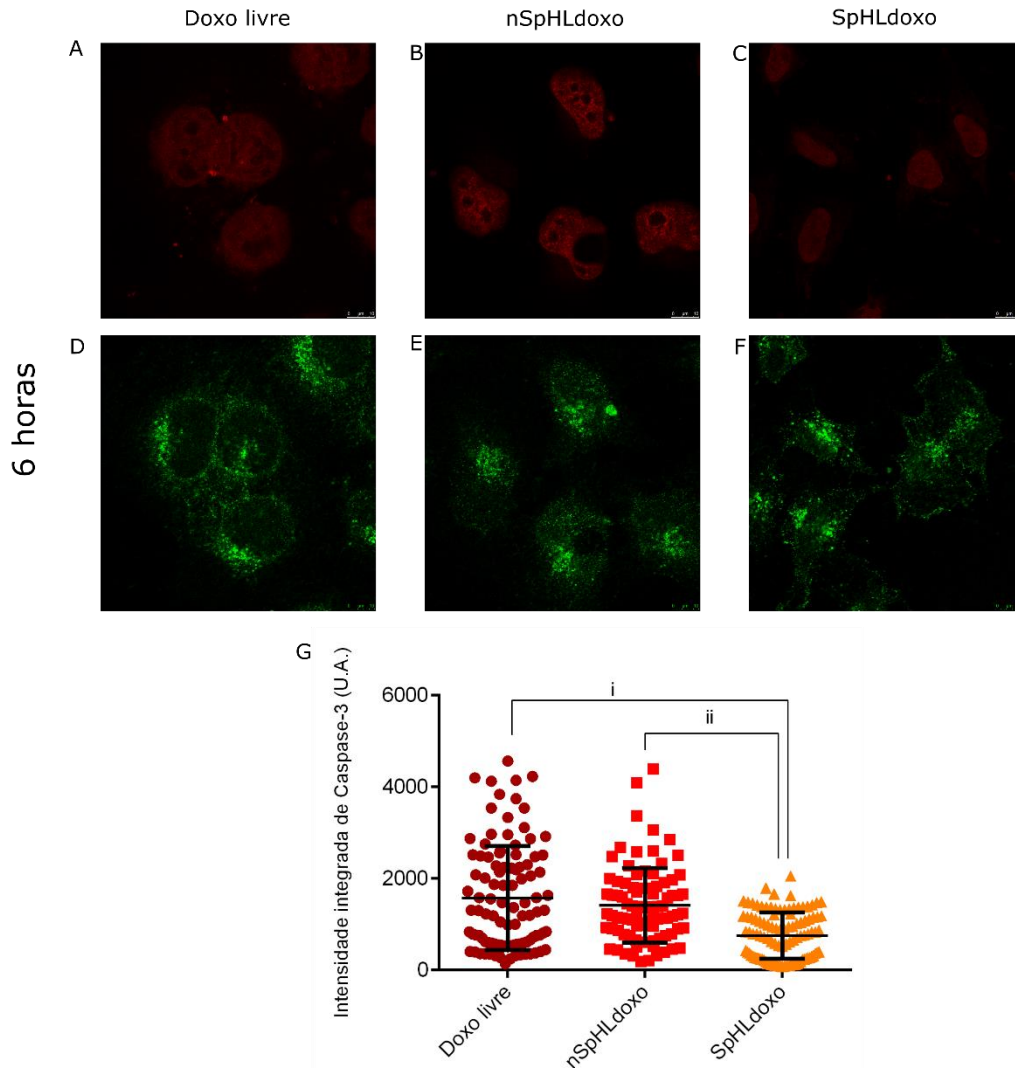


Figura 40. Marcação de imunocitoquímica da proteína caspase-3 clivada em células HeLa, após tratamento com o IC_{50} de cada formulação. As lâminas para imunomarcção foram preparadas utilizando lamínulas em placas de 12 poços onde $4,0 \times 10^5$ células foram plaqueadas por poço, as células foram tratadas a partir dos IC_{50} de sua respectiva formulação (doxorubicina livre, nSpHLdoxo, SpHLdoxo), após o período de 6 horas, o material foi fixado com PFA 4% e, subseqüentemente, marcado com anticorpo primário para caspase-3 clivada e secundário Alexa 647. Imagens representativas da célula HeLa com marcação em vermelho doxorubicina e em verde da caspase 3; A – IC_{50} da doxorubicina livre; B- IC_{50} do nSpHLdoxo; C - IC_{50} do SpHLdoxo; e D – Gráfico da intensidade integrada de caspase-3 a partir dos tratamentos com as formulações. Nível de significância $p < 0,05$. Onde (i) diferença significativa entre doxo livre e nSpHLdoxo; (ii) diferença significativa entre SpHLdoxo e nSpHLdoxo; e (iii) diferença significativa entre doxo livre e SpHLdoxo.

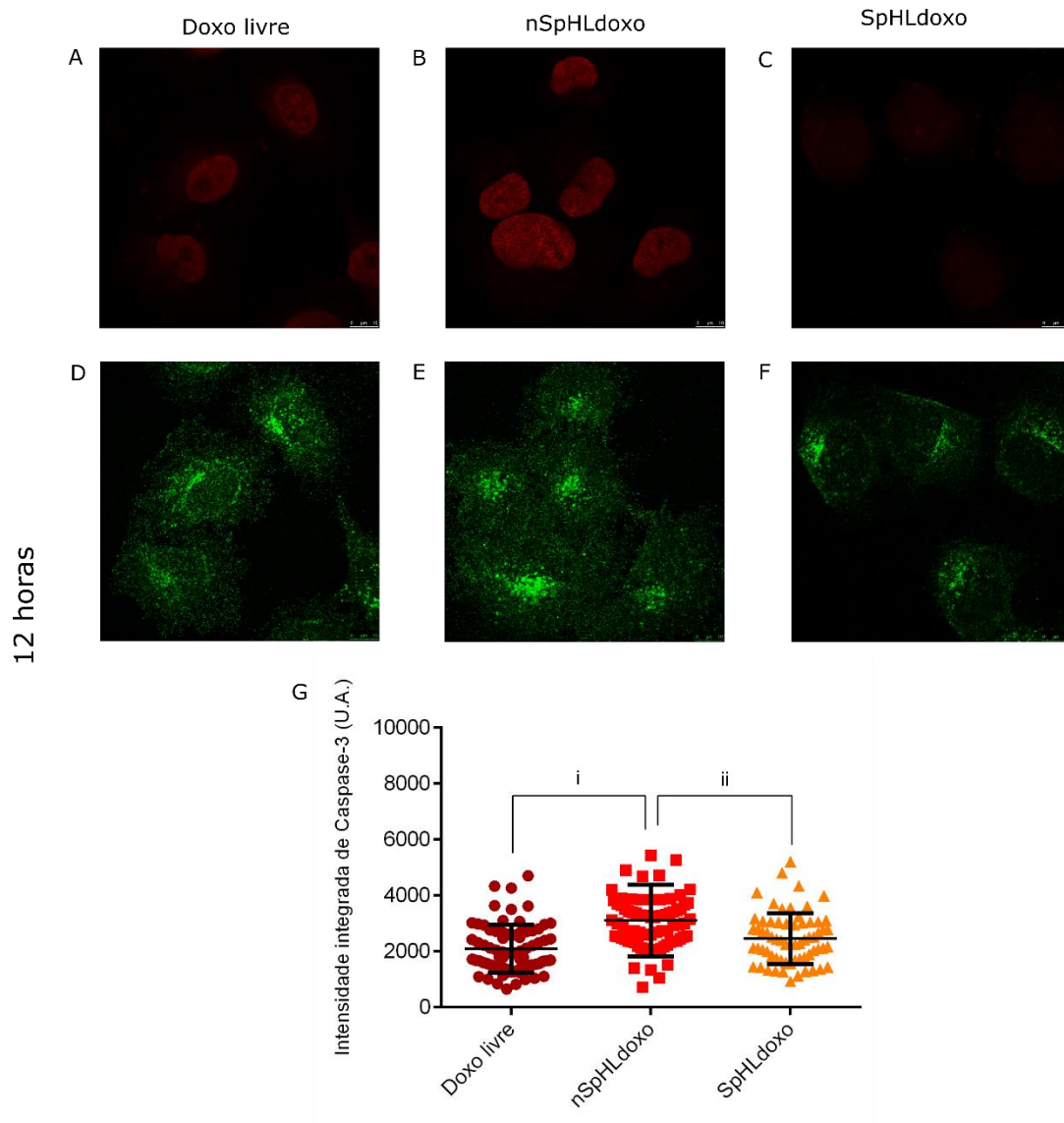


Figura 41. Marcação de imunocitoquímica da proteína caspase 3 clivada em células HeLa, após tratamento com o IC_{50} de cada formulação. As lâminas para imunomarcação foram preparadas utilizando lamínulas em placas de 12 poços onde $4,0 \times 10^5$ células foram plaqueadas por poço, as células foram tratadas a partir dos IC_{50} de sua respectiva formulação (doxorubicina livre, nSpHLdoxo, SpHLdoxo), após o período de 12 horas, o material foi fixado com PFA 4% e, subsequentemente, marcado com anticorpo primário para caspase-3 clivada e secundário Alexa 647. Imagens representativas da célula HeLa com marcação em vermelho doxorubicina e em verde da caspase 3; A – IC_{50} da doxorubicina livre; B- IC_{50} do nSpHLdoxo; C - IC_{50} do SpHLdoxo; e D – Gráfico da intensidade integrada de caspase-3 a partir dos tratamentos com as formulações. Nível de significância $p < 0,05$. Onde (i) diferença significativa entre doxo livre e nSpHLdoxo; (ii) diferença significativa entre SpHLdoxo e nSpHLdoxo; e (iii) diferença significativa entre doxo livre e SpHLdoxo.

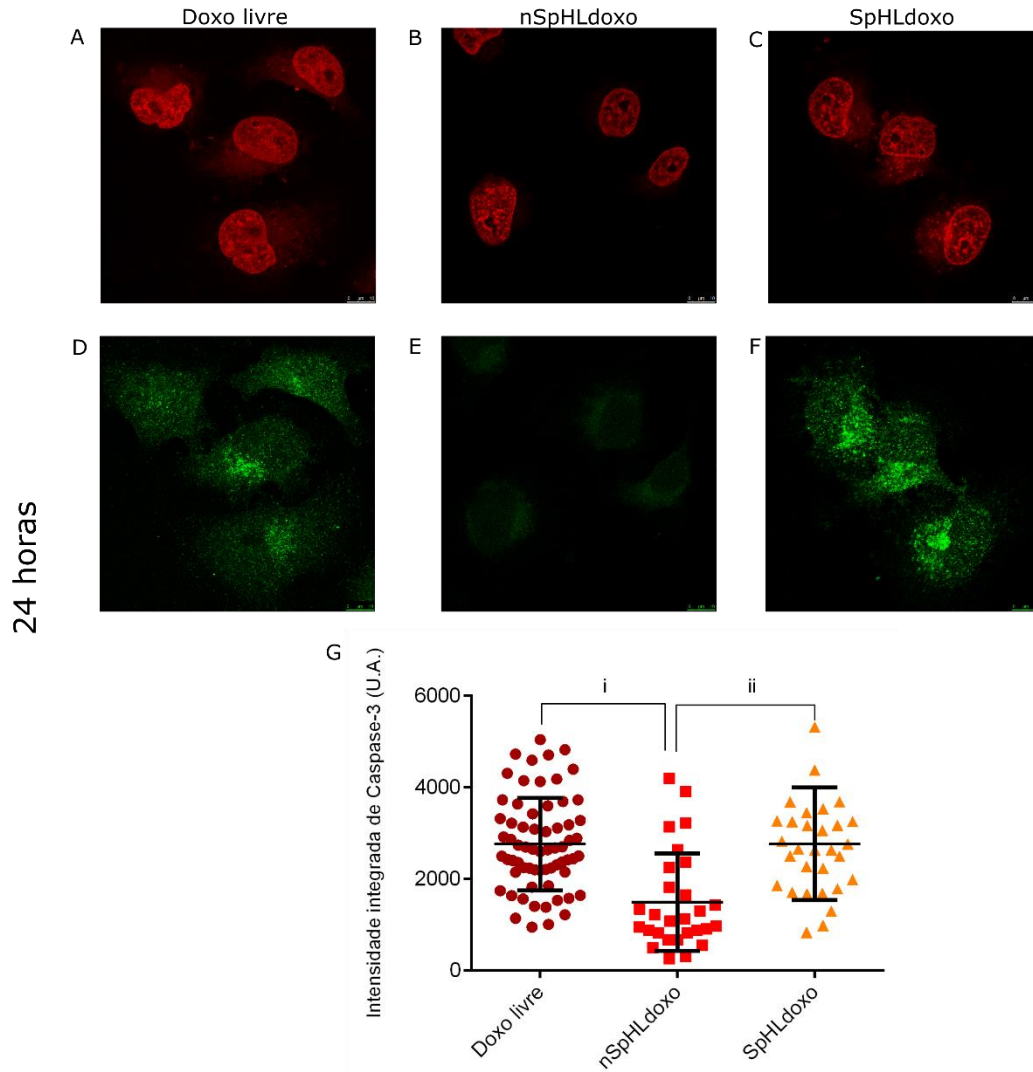


Figura 42. Marcação de imunocitoquímica da proteína caspase 3 clivada em células HeLa, após tratamento com o IC_{50} de cada formulação. As lâminas para imunomarcagem foram preparadas utilizando lamínulas em placas de 12 poços onde $4,0 \times 10^5$ células foram plaqueadas por poço, as células foram tratadas a partir dos IC_{50} de sua respectiva formulação (doxorubicina livre, nSpHLdoxo, SpHLdoxo), após o período de 24 horas, o material foi fixado com PFA 4% e, subsequentemente, marcado com anticorpo primário para caspase-3 clivada e secundário Alexa 647. Imagens representativas da célula HeLa com marcação em vermelho doxorubicina e em verde da caspase 3; A – IC_{50} da doxorubicina livre; B- IC_{50} do nSpHLdoxo; C - IC_{50} do SpHLdoxo; e D – Gráfico da intensidade integrada de Caspase-3 a partir dos tratamentos com as formulações. Nível de significância $p < 0,05$. Onde (i) diferença significativa entre doxo livre e nSpHLdoxo; (ii) diferença significativa entre SpHLdoxo e nSpHLdoxo; e (iii) diferença significativa entre doxo livre e SpHLdoxo.

7.3. DECLARAÇÃO DE BIOÉTICA E BIOSSEGURANÇA



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao **§5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15**, referente a Bioética, Biossegurança e acesso ao Patrimônio Genético, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada "**DETERMINAÇÃO DOS MECANISMOS MOLECULARES DA LIBERAÇÃO INTRACELULAR DE DOXORRUBICINA CARREADA EM LIPOSSOMAS SENSÍVEIS E NÃO SENSÍVEIS AO pH**", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre:

- pesquisa envolvendo seres humanos
- animais
- temas afetos a Biossegurança
- acesso a patrimônio genético.

Se você deixou de assinalar alguma das opções acima deverá enviar (via SIGA) o documento do respectivo Comitê para a Secretaria..

Assinatura: 
Nome do(a) aluno(a): Samara Bonesso dos Reis

Assinatura: 
Nome do(a) orientador(a): Marcelo Bispo de Jesus


Data: 17/10/2018

7.4. DECLARAÇÃO DE AUTORIA E CO-AUTORIA

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **DETERMINAÇÃO DOS MECANISMOS MOLECULARES DA LIBERAÇÃO INTRACELULAR DE DOXORRUBICINA CARREADA EM LIPOSSOMAS SENSÍVEIS E NÃO SENSÍVEIS AO pH**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 14 de outubro de 2019

Assinatura: 
Nome do(a) autor(a): **Samara Bonesso dos Reis**
RG n.º 43.696.569-0

Assinatura: 
Nome do(a) orientador(a): **Marcelo Bispo de Jesus**
RG n.º 32.591.974-4