

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento farmacotécnico de nanocápsulas multiparede contendo Ditosilato de lapatinib e complexadas com metal para funcionalização de superfície

TAÍSE CEOLIN

PORTO ALEGRE, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento farmacotécnico de nanocápsulas multiparede contendo ditosilato de lapatinib e complexadas com metal para funcionalização de superfície

Dissertação apresentada por **Táise Ceolin** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

PORTO ALEGRE, 2016

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 22.03.2016 pela banca examinadora constituída por:

Profa. Dr. Irene Cledes Kulkamp Guerreiro
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa Dr. Solange Cristina Garcia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof Dr. Tiago Veiras Collares
Universidade Federal de Pelotas

CIP - Catalogação na Publicação

CEOLIN, TAISE

Desenvolvimento farmacotécnico de nanocápsulas multiparede contendo Ditosilato de lapatinib e complexadas com metal para funcionalização de superfície / TAISE CEOLIN. -- 2016.
98 f.

Orientador: Adriana Raffin Pohlmann.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Nanocápsulas de núcleo lipídico. 2. Funcionalização de superfície. I. Pohlmann, Adriana Raffin, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Enedite e Dilmar e minhas irmãs, Daiane e Izaura, com todo meu amor e gratidão, por tudo que fizeram por mim ao longo de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amparar, iluminar e mostrar o caminho nas horas incertas, dando coragem nos momentos mais difíceis.

À Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann, pela orientação, ensinamentos transmitidos e ao exemplo de dedicação à pesquisa.

À Profa. Dra. Sílvia S. Guterres pelos ensinamentos científicos transmitidos.

Ao Programa e ao corpo docente de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS pela realização deste trabalho

Aos colegas e amigos do Laboratório K-204 do Instituto de Química pelos bons momentos de convivência, ajudas e troca de experiências: Camila Franco, Michelli Antonow, Natália Mendonça, Ana Carolina Asbahr, Selma Calgaroto, Rodrigo Cérc, Onésimo Giacomolli, Aline Alves e Paula Raddatz

Aos colegas e amigos do Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia pela troca de experiências, compreensão e pelo apoio nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Enedite e Dilmar e minhas irmãs Daiane e Izaura que souberam compreender todos os meus momentos de ausência. que juntos me educaram, orientaram, auxiliaram na formação dos meus princípios e caráter, que sempre estiveram ao meu lado e não mediram esforços para que eu chegasse até aqui.

Ao CNPq, CAPES e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo apoio financeiro e concessão da bolsa.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Tumores de mama podem ser categorizados pela expressão de diferentes receptores, como por exemplo o HER-2 (receptor de fator de crescimento epidérmico 2), sendo amplamente estudada a utilização do fármaco inibidor do receptor da tirosina-quinase, ditosilato de lapatinib. Nesse sentido, o trabalho está centrado no desenvolvimento farmacotécnico e caracterização físico-química de nanocápsulas multiparede revestidas com polissorbatato 80 e fosfatidilcolina (LIPOID S75®), seguidas de revestimento com quitosana, contendo ditosilato de lapatinib (25µg/mL e 50µg/mL). Estudos físico-químicos da fase orgânica e das nanocápsulas contendo LIPOID S75®, em diferentes concentrações, foram desenvolvidos através de medidas de viscosidade, tensão superficial e análise de calorimetria exploratória diferencial, correlacionando com o tamanho de partícula e interação da fosfatidilcolina no sistema. A partir disso, escolheu-se a maior concentração de LIPOID S75® testada, para desenvolver as nanocápsulas multiparede complexadas com metal e fenilalanina contendo ditosilato de lapatinib (Lap₂₅-P5-Q-Fe-Phe; Lap₅₀-P5-Q-Fe-Phe; Lap₂₅-P5-Q-Zn-Phe; Lap₅₀-P5-Q-Zn-Phe). As formulações contendo fármaco apresentaram distribuição unimodal de partículas na faixa nanométrica, (111 - 172 nm) e baixo índice de polidispersão. A faixa de potencial zeta obtida (+16 - +22 mV) indicou o revestimento da partícula pela quitosana. O ditosilato de lapatinib foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A fase móvel do método consistiu em acetonitrila:acetato de amônio 0,02M (70:30), vazão de 1,0 mL/min com detecção em 260 nm. As suspensões contendo 25 µg/mL e 50 µg/mL de fármaco apresentaram teor entre 93% e 91%, respectivamente. A eficiência de encapsulação (EE%) foi acima de 90%. O conjunto destes estudos demonstra que nanocápsulas desenvolvidas são potenciais candidatas para ensaios biológicos *in vitro*.

Palavras-Chave: Ditosilato de lapatinib, câncer de mama, nanocápsulas de núcleo lipídico, funcionalização de superfície.

ABSTRACT

Breast tumors may be categorized by the expression of different receptors such as HER-2 (growth factor epidermal receptor 2), The use of the inhibitor drug receptor tyrosine-kinase lapatinib ditosylate (Tyverb®, GlaxoSmithKline) has been widely studied. In this sense, the work is focused on pharmaceuticals development and physicochemical characterization of multiwall nanocapsules coated with polysorbate 80 and phosphatidylcholine (Lipoid S75®), followed by coating with chitosan containing lapatinib ditosylate (25 µg/mL and 50 µg/mL). Physicochemical studies of the organic phase and nanocapsules containing Lipoid S75® at different concentrations were developed by viscosity, surface tension analysis and differential scanning calorimetry, correlated with the particle size and interaction of phosphatidylcholine in the system. From this, we have chosen the highest concentration of lipoid S75® tested to develop complexed nanocapsules multiparedes with metal and phenylalanine containing lapatinib ditosylate (Lap25-P5-Phe-Phe-Q; Lap50-P5-Q -Fc-Phe; Lap25-P5-O-Zn-Phe; Lap50-P5-Zn-O-Phe). Formulations containing lapatinib ditosylate showed unimodal distribution of particles in the nanometer range (111-172 nm) and low polydispersity index. The obtained zeta potential range (+16 - +22 mV) indicated by the chitosan particle coating. The lapatinib ditosylate was quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC). The mobile phase consisted method in acetonitrile: 0.02M ammonium acetate (70:30), flow 1.0 mLmin⁻¹ with detection at 260 nm. The suspensions containing 25 µg mL⁻¹ and 50 µg mL⁻¹ showed drug content of between 93% and 91%, respectively. The encapsulation efficiency (EE%) was above 90%. Together these studies demonstrate that the nanocapsules are potential candidates for in vitro biological assays.

Keywords: Lapatinib ditosylate, breast cancer, lipid core nanocapsules, surface functionalization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Receptores família HER.	25
Figura 2 Estrutura química ditosilato de lapatinib.	28
Figura 3. Mecanismo de ação do Lapatinib	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Trifosfato de adenosina
C _{máx}	Concentração plasmática máxima
CMC	Concentração Micelar Crítica
CQs	Controle de qualidade
DLS	Dynamic light scattering
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
E.E	Eficiência de encapsulação
FDA	Agência Americana <i>Food and Drug Administration</i>
Fe	Ferro
FISH	Hibridização fluorescente <i>in situ</i>
GTP	Trifosfato de guanosina
HER1	Receptor do fator de crescimento epidermal
HER-2	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2
HER3	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 3
HER4	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 4
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IHQ	Imuno-histoquímica
LAT1	Transportador de Aminoácido-L
LD	Limite de detecção
LIPOID S75®	Lecitina de Soja
LQ	Limite de quantificação
LAP ₂₅ -P5-Q-Zn-Phe	Nanocápsulas multiparedes revestidas com quitosana contendo ditosilato de lapatinib (25 µg/mL) complexadas com zinco e funcionalizadas com fenilalanina.
LAP ₅₀ -P5-Q-Zn-Phe	Nanocápsulas multiparedes revestidas com quitosana contendo ditosilato de lapatinib (50 µg/mL) complexadas com zinco e funcionalizadas com fenilalanina.

LAP₂₅-P5-Q-Fe-Phe Nanocápsulas multiparedes revestidas com quitosana contendo ditosilato de lapatinib (25 µg/mL) complexadas com ferro e funcionalizadas com fenilalanina.

LAP₅₀-P5-Q-Fe-Phe Nanocápsulas multiparedes revestidas com quitosana contendo ditosilato de lapatinib (50 µg/mL) complexadas com ferro e funcionalizadas com fenilalanina.

MS	Monoestearato de sorbitano
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Para análise
PCL	Poli(ε-caprolactona)
PDI	Índice de polidispersão
PET	Tomografia computadorizada por emissão de pósitrons
Phe	Fenilalanina
PK	Proteína quinase
RE	Receptor hormonal de estrógeno
RP	<i>Phase reverse</i>
RP	Receptor hormonal de progesterona
SPAN	Índice de polidispersão
Span 60®	Monoestearato de sorbitano
TCC	Triglicerídeos do ácido Cáprico/Caprílico
Tg	Transição vítrea
UV	Ultravioleta
Zn	Zinco
ΔH	Variação de Entalpia

Lap₂₅-P5-Q-Zn-Phe: Nanocápsulas multiparedes revestidas com quitosana contendo ditosilato de lapatinib (25 µg/mL) complexadas com zinco e funcionalizadas com fenilalanina.

Lap₅₀-P5-Q-Zn-Phe: Nanocápsulas multiparedes revestidas com quitosana contendo ditosilato de lapatinib (50 µg/mL) complexadas com zinco e funcionalizadas com fenilalanina.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3 REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1 CÂNCER DE MAMA	23
3.2 RECEPTOR 2 DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO HUMANO (HER- 2).....	24
3.3 LAPATINIB	27
3.4 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	31

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma doença maligna, com tratamento complexo, requerendo uma abordagem multidisciplinar. A principal causa de morte está relacionada com as metástases oriundas do tumor primário, sendo importante o diagnóstico precoce da doença e a implementação de terapias adjuvantes (SCULLY *et al.*, 2012).

Nesse sentido, é importante identificar os marcadores tumorais que possam prever o comportamento do câncer de mama. Estudos demonstram que aproximadamente 15-20% de câncer de mama superexpressam o receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2), sendo associado a um pior prognóstico (KÜMLER, *et al.*, 2014; SLAMON *et al.*, 1987; SWAIN *et al.*, 2013; ALMEIDA, 2013; IMAMI *et al.*, 2012; MUNNINK, 2012). Pacientes HER-2 positivo, geralmente apresentam maior taxa de recorrência da doença quando comparado com pacientes HER -2 negativo. (XIAO *et al.* 2009;. LI *et al.*, 2013)

Atualmente, novas formas de diagnóstico e terapia de combate ao câncer vem sendo desenvolvidas, aumentando assim as chances de detecção em estágios iniciais da doença. Assim, a aplicação da nanotecnologia na medicina é uma nova perspectiva de diagnóstico e tratamento, devido a sua ampla utilização em diversos ramos, dentre elas a área oncológica (FREITAS, *et al.*, 2011; MOREIRA, 2013; SANNA, PALA, SECHI, 2014).

A evolução dos métodos de síntese e no entendimento das propriedades das nanopartículas tem possibilitado o desenvolvimento de sistemas de diagnósticos e de terapia do câncer. O foco atual das novas tecnologias é desenvolver formulações farmacêuticas ou transportadores de fármacos mais específicas, com entrega diretamente na célula cancerosa diminuindo os efeitos colaterais e potencializando a ação do princípio ativo. (HOLTZ, 2009; RIGGIO *et al.*, 2011).

Métodos terapêuticos em escala nanométrica, como as nanocápsulas poliméricas tem sido investigadas, sendo desenvolvidas nanocápsulas funcionalizadas, capazes de entregar agentes terapêuticos aos alvos moleculares específicos. A vetorização caracteriza-se pelo uso de ligantes da superfície das nanocápsulas permitindo interagir de maneira específica com as células tumorais (BETANCOURT *et al.*, 2009; MAKADIA, SIEGEL 2011; NICOLAS *et al.*, 2013;

RIGGIO *et al*, 2011; WANG, LANGER, FAROKHZAD, 2012; FRÉCHET, 2002; SANNA, PALA, SECHI, 2014).

Nesse sentido, diversos estudos estão sendo realizados para modificar a superfície de nanocápsulas, usando polímeros catiônicos como a quitosana, complexadas superficialmente com íons metálicos de ferro ou zinco capazes de interagir com fragmentos de anticorpo scFv anti-LDL (BENDER *et al*, 2014). Outros estudos avaliam a capacidade de conjugação das nanocápsulas com anticorpos monoclonais capazes de atingir o alvo específico, contribuindo no tratamento do câncer (COSTA, 2012; SCHRAMA, REISFELD, BECKER, 2006; CHAMES *et al*, 2009).

Para tratamento do câncer de mama com alta expressão de HER-2, utilizam-se, dentre as terapias, o fármaco ditosilato de lapatinib (Tyverb®, GlaxoSmithKline) em associação com outros fármacos anticancerígenos ou com anticorpos anti-HER-2. Estudos demonstram que a combinação do fármaco com anticorpo, intensifica a apoptose de células de câncer de mama e diminuem o desenvolvimento de resistência da célula cancerígena (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2013; MUNNINK, 2012; XIA, 2005; BLACKWELL, 2010).

Outras pesquisas avaliaram a nanoencapsulação do fármaco lapatinib em células tumorais e verificaram, *in vitro*, que o mesmo inibiu a proliferação de linhagem de câncer e induziu a apoptose (VERGARA *et al*, 2011; GAO *et al*, 2013).

Dentro desse contexto, nosso grupo de pesquisa desenvolveu nanopartículas poliméricas composta por um núcleo lipídico rodeado por uma camada de poliéster, em que o polissorbatato 80 e lecitina de soja (LIPOID S75®) foram adsorvidos para receber quitosana, um polissacarídeo, capaz de complexar íons metálicos de ferro e avaliou a capacidade de conjugar superficialmente fragmentos de anticorpos, a fim de reconhecer receptores biológicos específicos. O sistema denominado de nanocápsulas multiparede complexadas com metais (MCMN) possui íons muito reativos capaz de se conjugar rapidamente com diferentes ligantes (BENDER, 2014).

Com base no exposto, foi realizado o desenvolvimento farmacotécnico de nanocápsulas multiparede contendo ditosilato de lapatinib e complexadas com metal para funcionalização de superfície, visando futura aplicação no tratamento de câncer de mama HER-2 positivo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do estudo foi o desenvolvimento farmacotécnico de nanocápsulas multiparede contendo ditosilato de lapatinib complexadas com metal para funcionalização de superfície visando futura aplicação no tratamento de câncer de mama HER-2 positivo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do estudo consistiram em:

- a) Preparar soluções etanólicas de LIPOID S75® com diferentes concentrações e avaliar suas características físico-químicas quanto à viscosidade e tensão superficial.
- b) Preparar dispersões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com polissorbato 80 contendo diferentes concentrações de LIPOID S75® e avaliar suas características físico-químicas quanto à distribuição de tamanho, diâmetro médio, diâmetro médio hidrodinâmico, índice de polidispersão, mobilidade eletroforética (potencial zeta) e pH.
- c) Preparar formulações de nanocápsulas multiparedes contendo um fármaco antitumoral (ditosilato de lapatinib) complexadas com metais para funcionalização de superfície e avaliar suas características físico-químicas quanto ao pH, a mobilidade eletroforética, diâmetro médio, diâmetro médio hidrodinâmico e índice de polidispersão.
- d) Avaliar o teor de fármaco na formulação de nanocápsulas multiparedes, e sua eficiência de encapsulação por técnicas espectroscópicas, utilizando métodos eficientes de separação e quantificação (extração, centrifugação, ultrafiltração e cromatografia líquida).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer é um termo utilizado para designar um conjunto de mais de 100 doenças sendo caracterizado pelo crescimento descontrolado e disseminação de células anormais, em um fenômeno denominado metástase (INCA, 2014).

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo, com elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Em estágio avançado da doença, as chances de sobrevivência em cinco anos são baixas, variando de 10-40%. Quando precocemente diagnosticado e tratado, a taxa de sobrevivência é superior a 80%. Estima-se que a cada ano, surgem aproximadamente 25% de casos novos, sendo que a incidência aumenta progressivamente, especialmente após os 50 anos (INCA, 2014).

A doença é a principal causa de morte nos países desenvolvidos e a segunda causa de morte em países em desenvolvimento. A incidência mundial de câncer de mama vem aumentando com uma taxa anual de 3,1% (DESANTIS *et al.*, 2014). Dados apontam que em 1980, havia 641.000 casos e em 2010, passou para 1.643.000, sendo que dois terços ocorrem em mulheres acima de 50 anos. De acordo com estudos da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2012, 1,7 milhões de mulheres foram diagnosticadas e estima-se que os casos anuais de câncer aumentarão para 22 milhões nas próximas duas décadas, sendo que no Brasil poderão surgir 57.960 novos casos em 2016 (OMS, 2013; INCA, 2016; NOUNOU *et al.*, 2015).

O câncer de mama é altamente heterogêneo, apresentando variadas características biológicas e morfológicas, variando a resposta terapêutica. Os tratamentos são multidisciplinares e podem incluir cirurgia e terapia sistêmica como terapia hormonal, quimioterapia, imunoterapia, e terapia-alvo. A terapia tem trazido altos índices de sobrevivência em mulheres com tumores iniciais, no entanto, a toxicidade dos fármacos e os inúmeros efeitos colaterais, interferem na qualidade de vida das pacientes (WILLIAMS *et al.*, 2006; MATSEN; NEUMAYER, 2013).

Apesar dos avanços no tratamento, a recorrência da doença continua sendo um problema significativo devido ao mau prognóstico e potencial risco de metástase

(FINN, *et al*, 2011). Existe uma variedade de tratamentos para o câncer de mama, sendo que é necessário identificar e validar os fatores prognósticos e preditivos para aumentar os benefícios e reduzir os efeitos colaterais nas pacientes (RAKHA; ELLIS, 2011).

A doença apresenta marcadores específicos que auxiliam na resposta terapêutica durante o tratamento. Numerosos marcadores moleculares foram estudados nos últimos anos, sendo que os receptores hormonais de estrógeno (RE), de progesterona (RP) e o HER-2 (receptor do fator de crescimento epidérmico tipo 2) estão bem estabelecidos como fatores preditivos de resposta terapêutica (WALKER *et al.*, 2008; YERSAL; BARUTCA, 2014). A proteína HER-2 é um receptor transmembrana da tirosina quinase, que se encontra hiperativa em diversos tumores epiteliais, favorecendo a progressão tumoral (PEREZ *et al.*, 2014).

3.2 RECEPTOR 2 DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO HUMANO (HER-2).

A oncoproteína funcional é um dímero, sendo classificada como uma glicoproteína transmembrana de 185 KDa, contendo um domínio extracelular de ligação e um domínio de atividade intracelular de tirosina quinase (MAGUIRE, GREENE, 1989). A proteína HER-2, foi inicialmente identificada em um modelo de glioblastoma de rato, sendo que em humanos, o gene HER-2/neu, foi descoberto na década de 80 (KING.; KRAUS.; AARONSON, 1985; SCHECHTER *et al.*, 1984). HER-2 é membro de uma família de quatro receptores: HER1, HER2, HER3 e HER4, importantes mediadores do crescimento, sobrevivência, mobilidade, diferenciação e a adesão celular (COHEN *et al*, 1957; WLUDARSKI; BACCHI *et al.*, 2008).

O Gene HER-2, responsável pela produção da proteína HER-2, está localizado no cromossomo 17q. A amplificação do gene está relacionada a um mau prognóstico para diversos tipos de tumores sólidos (KÜMLER, *et al*, 2014; (SLAMON *et al.*, 1989). Estudos estruturais demonstram que HER-2 é constituído por um domínio de ligação extracelular, um segmento transmembrânico e um domínio intracelular de tirosina quinase, conforme Figura 1 (MENDELSON; BASELGA, 2003 ; YARDEN; SLIWKOWSKI, 2001; PRENZEL *et al.*, 1999).

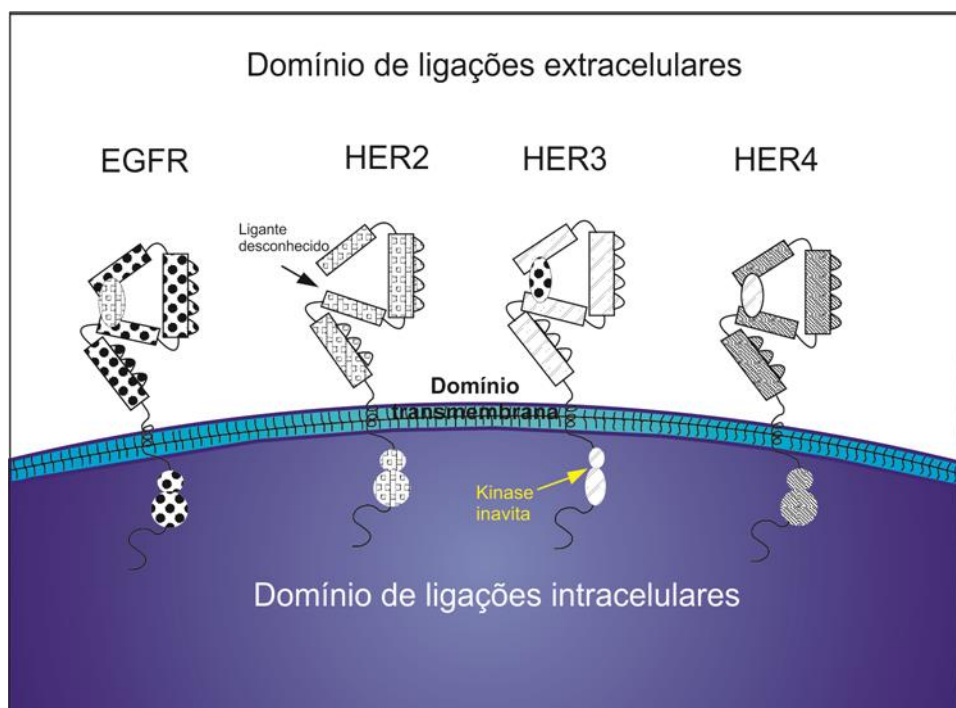


Figura 1. Receptores família HER.

Fonte: KÜMLER; TUXEN; NIELSEN, 2014

Normalmente, encontram-se duas cópias do gene HER-2 em cada célula, responsáveis por produzir a proteína na superfície celular. Contudo, se houver amplificação do gene HER-2, são enviados estímulos para que a célula se divida, multiplique e cresça mais rapidamente que uma célula normal (YAN *et al*, 2015). Os receptores dessa família existem sob a forma de monómeros sobre a superfície celular. Estes monômeros formam dímeros, que são estabilizados por ligação ao ligante, sendo que os peptídeos HER pode se associar em heterodímeros, gerando uma diversidade de receptores. HER-2, não possui ligante extracelular específico e é capaz de formar dímeros com os outros membros da família (HER1/HER2, HER2/HER3 ou HER2/HER4). A formação de heterodímeros com HER-2 aumenta a afinidade dos membros da família a seus respectivos ligantes e sua sinalização é mais potente, estimulando a transformação morfológica e o crescimento celular, seja em sua forma normal ou mutada (EARP *et al.*, 1995; SHAH; CHEN, 2011; YAN; *et al*, 2015)

Das várias técnicas existentes para a determinação do status do HER-2, as mais utilizadas são a imunohistoquímica (IHQ) e a hibridação fluorescente *in situ* (FISH). O primeiro avalia a expressão proteica do gene, e o segundo a sua amplificação. Geralmente a IHQ é a primeira técnica a ser realizada, sendo os

resultados denominados de Score 0 quando houver ausência de coloração da membrana citoplasmática das células neoplásicas. Quando as amostras apresentarem fraca ou moderada coloração em > 10% das células neoplásicas, são consideradas score 2+ e necessitam de confirmação por FISH e quando houver marcação intensa de toda a membrana em > 10% das células neoplásicas é considerada score 3+ (BILOUS *et al.*, 2003; PEREZ *et al.*, 2014).

Muitos estudos relacionaram o aumento da expressão de HER-2 com maior agressividade do tumor e maior resistência a alguns tipos de tratamento, havendo aumento da incidência de metástases e maior chance de mortalidade em estágio inicial. A sobre expressão do HER-2 no câncer de mama é um fator de risco para o desenvolvimento de metástases cerebrais, devido a natureza agressiva que apresenta (ROSS *et al.*, 2009; TOIKKANEN *et al.*, 1992; MUSS *et al.*, 1994; SALEEM *et al.*, 2015).

Estima-se que o genoma humano possua aproximadamente 2000 quinases (BRIDGES *et al.*, 2001) As proteínas quinases são enzimas responsáveis pela fosforilação de proteínas por meio da transferência de um grupo fosfato de ATP ou GTP, sendo capazes de desencadear várias respostas celulares como apoptose, proliferação celular, metabolismo do glicogênio, neurotransmissão e oncogênese. As proteínas tirosina quinases são divididas em tirosina quinases não-receptoras citoplasmáticas e tirosina quinases receptoras que são ativadas por um ligante extracelular. As quinases celulares são divididas naquelas que fosforilam proteínas em resíduos tirosina (tirosina-quinases) e aquelas que fosforilam proteínas em resíduos serina e treonina (serina / treonina-quinases) (TAYLOR.; KORNEV, 2011; IDRIS *et al.*, 2001).

As proteínas quinases são importantes no controle intracelular, regulação e transdução de sinais, sendo muitas vezes associada a diversas doenças, incluindo o câncer. O envolvimento de proteínas quinases no desenvolvimento de tumores malignos pode ocorrer através do rearranjo genômico ou desregulação da atividade quinase. Acredita-se que elas são alvos importantes para agentes terapêuticos, uma vez que muitos cânceres estão associados a mutações nos genes dessas proteínas (YARDEN; SLIWKOWSKI, 2001)

Receptores ligados à quinase possuem um domínio extracelular de ligação e se comunica ao domínio intracelular por uma hélice única transmembrana. Todas as proteínas quinases têm um domínio catalítico que contém uma fenda onde se liga

uma molécula de ATP. A inibição alostérica, que altera a conformação espacial destas enzimas, bloqueando os sítios de ligação do ATP, tem sido estudada no planejamento de fármacos (RANG & DALE 2007).

Dentre as terapias atualmente disponíveis para o câncer de mama, incluem os inibidores de tirosina quinases, como o ditosilato de lapatinib. Estudos clínicos demonstraram que a administração de ditosilato de lapatinib a pacientes com câncer de mama avançado resultou na inibição de sinalização HER-2 e indução de apoptose (GIAMPAGLIA *et al.*, 2010). Os efeitos adversos associados ao tratamento são menores quando comparado à quimioterapia tradicional devido a maior especificidade à célula tumoral (PAUL; TROVATO; THOMPSON, 2008; O'NEILL *et al.*, 2012).

3.3 LAPATINIB

Lapatinib, 4-anilinoquinazolina, é um inibidor do receptor da tirosina quinase direcionado para os receptores HER-1 e HER-2 (NELSON; DOLDER, 2006). Em 2007, foi aprovado, pela Agência Americana *Food and Drug Administration* (FDA), o medicamento *Tykerb*® (GlaxoSmithKline), cuja forma farmacêutica comprimido contém ditosilato de lapatinib mono-hidratado com nome químico 4-metilbenzenossulfonato de *N*-[3-cloro-4-[(3-fluorofenil)metoxi]fenil]-6-[5-[[[2-(metilsulfonil)etil]amino]metil]-2-furanil]-4-quinazolinamina. Na clínica, a dose recomendada para o tratamento de pacientes com câncer de mama avançado ou metastático é de 1250 mg (cinco comprimidos) uma vez por dia de forma contínua. Cada comprimido contém ditosilato de lapatinib (Figura 2), equivalente a 250 mg de Lapatinib (NELSON; DOLDER, 2007).

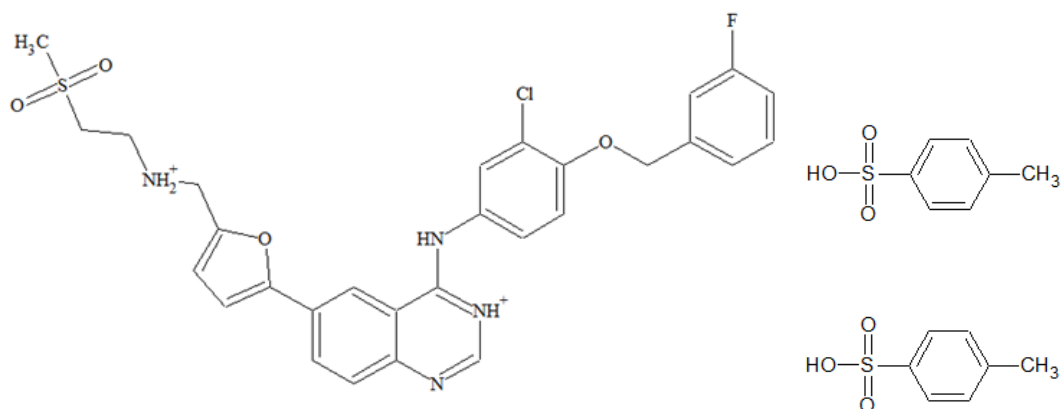


Figura 2 Estrutura química ditosilato de lapatinib.

Lapatinibe inibe de forma reversível a auto fosforilação dos receptores tirosina quinase. Isso impede que ocorra uma cascata de reações que favorece a transcrição de genes, sobrevivência e proliferação celular (Figura 3) (PAUL; TROVATO; THOMPSON, 2008).

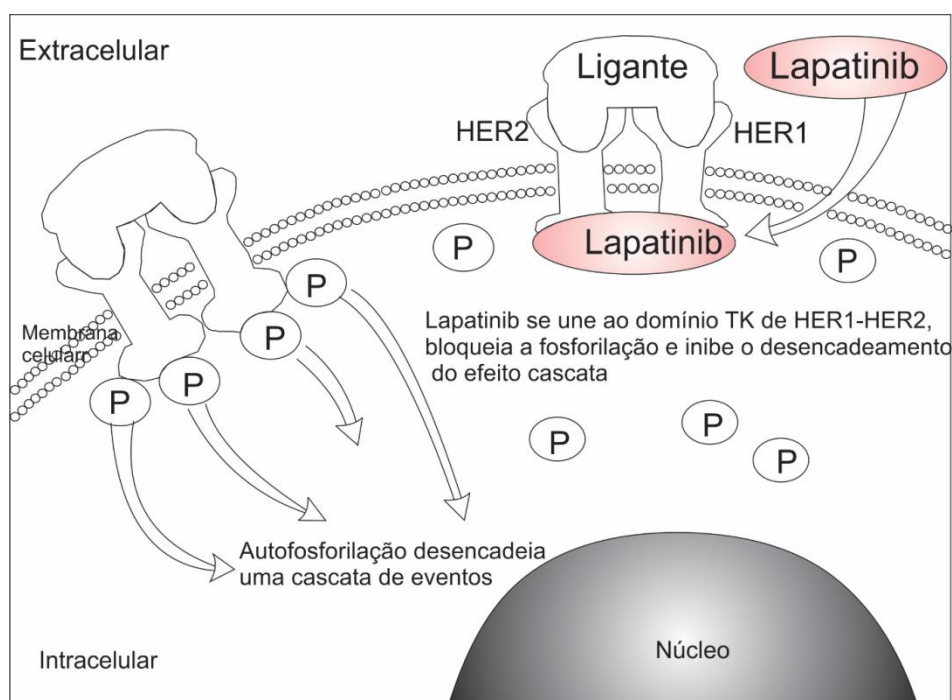


Figura 3. Mecanismo de ação do Lapatinib

Fonte: PAUL; TROVATO; THOMPSON 2008.

Lapatinib é indicado para o tratamento de câncer de mama metastático em combinação com o anticorpo trastuzumab em pacientes que possuem de câncer de

mama HER-2 avançado (KONECNY *et al*, 2006). Trastuzumab (Herceptin®, Genentech) é um anticorpo monoclonal recombinante que se liga ao domínio extracelular HER-2, tendo sido aprovado em 1998 para o tratamento de pacientes com câncer de mama (CHUMSRI, *et al* 2015; GARRETT *et al*, 2007).

Pesquisas indicam que lapatinib e trastuzumab apresentam mecanismos de ação complementares, intensificando a apoptose de células de câncer de mama e diminuindo a probabilidade das células neoplásicas desenvolverem resistência. Dessa forma, lapatinib induz estabilização e acumulação do receptor HER-2 inativo na membrana citoplasmática, potencializando os efeitos de trastuzumab (GORI *et al.*, 2012). No entanto cerca de 40% dos pacientes desenvolvem resistência ao tratamento com o anticorpo (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2013; MUNNINK, 2012; XIA, 2005; BLACKWELL, 2010).

A biodisponibilidade de lapatinib pode aumentar em até 60% quando administrado concomitantemente com os alimentos, sendo que a exposição sistêmica também é afetada pelo tempo entre a administração e a ingestão de alimentos. Estudos clínicos sugerem administrar lapatinib em condição em jejum, pelo menos 1 h antes das refeições (DEVRIESE *et al.*, 2014; KOCH *et al.*, 2009).

Além disso, a absorção oral do fármaco pode ser limitada pela baixa solubilidade. A biodisponibilidade absoluta após administração oral é desconhecida, sendo que o pico de concentração plasmática ($C_{máx}$) de Lapatinib é atingido aproximadamente 4 horas após administração (BURRIS *et al.*, 2005).

A principal via de eliminação é fecal, sendo que menos de 2% da dose oral administrada é excretada na urina. Lapatinib sofre metabolismo hepático pelas isoenzimas do citocromo P450 (CYP3A4 e CYP3A5). O fármaco é metabolizado pela 3A4 do P450, principalmente, para formar metabolitos reativos que estão associados a vários efeitos tóxicos de medicamentos. A excreção biliar também pode contribuir para a sua eliminação (CASTELLINO *et al.*, 2012).

Dentre os efeitos adversos observados, severa hepatotoxicidade seguida de morte foram relatados. Embora o mecanismo de hepatotoxicidade é desconhecido, pode ser associado com a formação de quinoneimina reativa que podem desencadear reações que levam à lesão hepática. Quinoneiminas são compostos que podem interagir covalentemente com proteínas hepáticas, causando disfunção celular ou ainda, desencadear resposta imunológica, resultando em hepatotoxicidade (MASUBUCH; HORIE, 2007; TENG *et al.*, 2010).

Corroborando com esses estudos, pesquisa em ratos avaliou as características bioquímicas e histopatológica dos animais a fim de avaliar a toxicidade hepática de lapatinib, sendo observado lesões no fígado e elevação significativa dos níveis de transaminases, especialmente ALT (DEMIRCI *et al.*, 2012).

Além de ter ação no tratamento do câncer de mama, estudos através de Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitrons (PET) demonstram que a molécula lapatinib é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (SALEEM *et al.*, 2015; MOY *et al.*, 2007; STEEG; CAMPHAUSEN; SMITH, 2011). O desenvolvimento de metástases cerebrais em pacientes com câncer de mama avançado é relativamente comum, atingindo aproximadamente 30-50% dos pacientes, sendo importante causa de morbidade e mortalidade. Sua incidência tem aumentado nos últimos anos com tempo médio de sobrevivência de dois meses. Em 10% das doentes, a excisão cirúrgica das metástases, seguida de radioterapia holocraniana, prolonga a sobrevivência para 1-2 anos (BACHELOT *et al.*, 2013; CAMPOS; LIMA; DIAS, 2012; GIL-GIL *et al.*, 2014).

No entanto, pesquisas em ratos imunocomprometidos com modelo humano de metástase cerebral revelou que a concentração do fármaco foi muito menor do que nas metástases presentes em outros tecidos, como por exemplo fígado, rim e pulmão. Dentre os tecidos estudados, o cérebro mostrou a menor distribuição de lapatinib, sugerindo que a exposição limitada, pode contribuir com a progressão da doença (GAO *et al.*, 2013; TASKAR, *et al.*, 2012).

Outra opção de tratamento é o uso combinado de lapatinib e capecitabina para tratamento do tumor cerebral. No entanto a capecitabina está relacionada com o aparecimento de doenças coronárias e grave cardiotoxicidade (PAPALDO *et al.*, 2010; KUCUKONER; GUMUSAY, 2014; LADJEMI *et al.*, 2010; ANG *et al.*, 2010; KOUNIS *et al.*, 2011).

A fraca solubilidade em água, a grave hepatotoxicidade e cardiotoxicidade de muitos compostos ativos, constitui um sério obstáculo à utilização comercial. A fim de contornar esses problemas, novas alternativas como o uso de nanocarreadores vem sendo pesquisadas (GAO *et al.*, 2013).

Vários nanocarreadores tem sido desenvolvidos para melhorar a eficácia terapêutica de fármacos anti-cancerígenos (NOUNOU *et al.*, 2015), proporcionando penetração melhorada pela barreira hematoencefálica (GAO *et al.*, 2013), melhora na

solubilidade (ZHANG *et al.*, 2014), aumento na eficiência terapêutica e diminuição de efeitos adversos (WAN *et al.*, 2015; BAEK *et al.*, 2015).

Nesse contexto, encontram-se as nanopartículas poliméricas, que estão sendo investigadas para tratamento do câncer como veículos terapêuticos capazes de direcionar de forma específica, fármacos antitumorais como o ditosilato de lapatinib (WANG, LANGER, FAROKHZAD, 2012).

3.4 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

É crescente o interesse por parte das indústrias no desenvolvimento de produtos com base nanotecnológica para aumentar eficácia e diminuir efeitos adversos. Na área farmacêutica, vem-se observando grande potencial de aplicação dos sistemas nanocarreadores, sendo crescente o número de pesquisas científicas nessa área. Pode-se dizer de forma ampla que os nanocarreadores são sistemas utilizados para direcionar fármacos especificamente para seu sítio de ação como por exemplo, tumores sólidos, possibilitando uma liberação controlada no sítio específico (NATARAJAN *et al.*, 2014).

Observa-se, a partir de uma análise da literatura, que existem diversas definições para nanotecnologia. Destacam-se iniciativas internacionais para normalizar o termo, tais como as empreendidas pela *International Organization Standardization (ISO)*, e pela *European Standardisation Committee*. Na União Europeia, o nanomaterial tem sido definido como sendo um material contendo partículas para os quais 50% ou mais das partículas, situa-se na faixa entre 1 e 100 nm. De acordo com a ISO TC 229 a nanotecnologia compreende processos em nanoescala, tipicamente, mas não exclusivamente, abaixo de 100 nanômetros, podendo ter tamanho maior, dependendo da ação pretendida. Esta particularidade é importante para as áreas médica e farmacêutica, sendo desejável nanopartículas com faixa de diâmetros médio de 200 nm, para estudos biológicos (ALBANES;; TANG; CHAN, 2012).

Nanopartículas poliméricas são classificadas como nanoesferas ou nanocápsulas (COUVREUR; DUBERNET; PUISIEUX, 1995; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). As nanoesferas são sistemas matriciais onde o fármaco pode estar incluso, retido ou adsorvido na matriz polimérica e não apresentam óleo

em sua composição. Por outro lado, as nanocápsulas diferenciam-se das nanoesferas pela presença de um constituinte oleoso, que está envolto por uma parede polimérica, podendo o fármaco estar dissolvido no núcleo lipídico, disperso ou adsorvido à parede polimérica.

Dentro deste contexto, as nanopartículas poliméricas vem sendo amplamente exploradas como sistemas carreadores de fármacos. Para as ciências farmacêuticas é interessante que essas estruturas sejam por si só, biologicamente ativas, ou que sejam capazes de veicular ativos farmacêuticos (KREUTER, 2007).

Na literatura, estão descritos alguns métodos de preparação de nanopartículas poliméricas, sendo que elas podem ser obtidas pelo método baseado na polimerização *in situ* de monômeros dispersos ou na precipitação de polímeros pré-formado (SOUTO *et al.*, 2012; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Dentre os polímeros biocompatíveis, biodegradáveis e atóxicos, utilizados na produção de nanopartículas poliméricas, encontra-se a poli (ϵ -caprolactona) (PCL). Considerado um bom candidato como polímero para o desenvolvimento de sistemas de veiculação de fármacos, esse poliéster é utilizado tanto para encapsular e entregar fármacos convencionais como macromoléculas biológicas, tais como proteínas e ácidos nucleicos (POURGHOLI; FARHAD, 2016; DASH; KONKIMALLA, 2012).

Nosso grupo de pesquisa desenvolveu nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC), compostas por um núcleo que contém uma mistura de substâncias como triglicerídeo cáprico/caprílico e monoestearato de sorbitano, rodeados por uma parede polimérica de PCL e estabilizados por tensoativo não-iônico de alto equilíbrio lipófilo-hidrófilo, o polissorbato 80 (VENTURINI *et al.*, 2011; JÄGER *et al.*, 2009). Com relação ao monoestearato de sorbitano, foi observado características distintas para as nanocápsulas poliméricas como maior rigidez (FIEL *et al.*, 2011) aumentando da estabilidade física (OURIQUE *et al.*, 2010) e proteção do fármaco da fotodegradação (WEISS-ANGELI *et al.*, 2012).

JORNADA e colaboradores (2012) demonstraram ser possível obter nanocápsulas de núcleo lipídico com controle no tamanho de partícula através do controle de variáveis do processo como regime de diluição da fase orgânica e sua viscosidade, podendo-se aumentar o teor de fármaco na formulação pelo aumento da fração volumétrica de coloide disperso em água, sem comprometer a sua estabilidade cinética.

Observa-se na literatura uma variedade de outros materiais utilizados no desenvolvimento das nanopartículas poliméricas, como é o caso do polímero catiônico quitosana e o tensoativo iônico, LIPOID S75® (RAMPINO *et al.*, 2013; SONVICO *et al.*, 2006). Nanopartículas podem ser constituídas de materiais inorgânicos, tendo destaque para ferro, ouro, prata e zinco (YANASARN; SLOAT; CUI, 2009; SHARMA *et al.*, 2015).

LIPOID S75® (lecitina de soja) é uma mistura contendo 70% de fosfatidilcolina, sendo que as impurezas presentes, como por exemplo o ácido fosfatídico (MOSQUEIRA *et al.*, 2000) conferem carga negativa a mistura. A fosfatidilcolina faz parte da estrutura das membranas biológicas de células, e também se encontra presente no plasma sanguíneo como constituinte de lipoproteínas. É biocompatível e biodegradável devido à natureza química de sua estrutura, contendo átomos de carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e fósforo, ligados na forma de cadeias hidrocarbônicas lineares saturadas e insaturadas, derivados de ácidos graxos, ésteres, amônio e fosfato (ANGELICO *et al.*, 2005).

Com frequência, a LIPOID S75® é usada em aplicações farmacêuticas como agentes emulsionantes devido sua ação detergente, dispersantes e estabilizantes para a formação de lipossomas e micelas. Por outro lado, a quitosana é um biopolímero biocompatível solúvel em meio aquoso acidificado, que apresenta em sua estrutura grupos hidroxila e grupos amino, cujo equilíbrio com seus ácidos conjugados lhe conferem característica poliacatiônica. Estas propriedades permitem que interaja com polímeros carregados negativamente, favorecendo a difusão de fármacos no meio biológico de interesse (SONVICO *et al.*, 2006; RINAUDO, 2006; CHOPRA; HAO; LI, 2012).

A literatura relata que as nanopartículas de LIPOID S75® e quitosana, obtidas através da auto-organização supramolecular entre LIPOID S75® carregada negativamente e quitosana carregada positivamente, são estabilizadas por mecanismo eletrostático. O objetivo de usar esses constituintes é melhorar as propriedades muco adesivas das mesmas (LIU, 2015). Nesse sentido, nanopartículas baseada na interação entre fosfolípidos carregados negativamente e quitosana tem sido propostas, demonstrando que essas estruturas promovem liberação controlada do fármaco, inibindo o crescimento das células tumorais (BARBIERI *et al.*, 2013).

Anteriormente, nosso grupo de pesquisa desenvolveu micropartículas contendo quitosana complexadas com metal (Fe^{3+} , Fe^{2+} e Zn^{2+}) para avaliar a capacidade de adsorção do fármaco ciprofloxacino na superfície de micropartículas (REYNAUD *et al.*, 2011). Considerando o par de elétrons livre do nitrogênio do grupo amino, a quitosana pode formar complexos com muitos íons metálicos (WANG *et al.*, 2005). Relatos na literatura sugerem que compostos catiônicos podem desencadear agregação plaquetária (OKAMOTO *et al.*, 2003). Em vista disso, nosso grupo de pesquisa desenvolveu nanocápsulas de núcleo lipídico estabilizadas com polissorbato 80 e LIPOID S75®, sendo revestidas com quitosana a fim de avaliar a biocompatibilidade frente os eritrócitos humanos (BENDER *et al.*, 2012). Não houve indícios de hemólise ou agregação plaquetária, indicando se tratar de um sistema hemocompatível, com potencial aplicação intravenosa. Assim, as nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com LIPOID S75®, quitosana e polissorbato 80 constituem-se um promissor sistema carreador e abre novas possibilidades de estudo.

Além do revestimento com quitosana, outra estratégia amplamente empregada é a conjugação de ligantes na superfície do nanocarreador. A funcionalização da superfície pode ocorrer através de ligação covalente, como por interação eletrostática ou por forças de Van der Waals (TORCHILIN, 2006). Segundo a literatura, dentre os tipos de nanopartículas mais comumente utilizados como plataformas terapêuticas conjugadas de anticorpos encontram-se as nanopartículas poliméricas e as nanopartículas metálicas (CARDOSO; PEÇA; ROQUE, 2012; LUO; CHANG; LIN, 2015). Nanopartículas poliméricas multifuncionais vem atraindo atenção por causa de sua capacidade de funcionalização de superfície, que pode ser modificada através da conjugação de moléculas (por exemplo, anticorpos, peptídeos e folato) que irão interagir especificamente no sítio biológico (SONG *et al.*, 2015; YU; PARK; JON, 2012)

Em relação ao desenvolvimento e caracterização de nanopartículas metálicas, várias aplicações são relatadas na literatura, como agente teranóstico no tratamento do câncer, ou ainda, no combate aos microrganismos, como bactérias, fungos e vírus, por atividade antimicrobiana intrínseca ou por fixação de anticorpos e fármacos (SALEM *et al.*, 2015; HAJIPOUR *et al.*, 2012; RAVINDRAN; CHANDRAN; KHAN, 2013; SHARMA *et al.*, 2015).

Nesse sentido, em um segundo momento, nosso grupo de pesquisa desenvolveu nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com polissorbato 80, LIPOID S75® e quitosana e, complexadas com íons ferro (Fe^{2+}) ou zinco (Zn^{2+}) para funcionalização de sua superfície com ligantes específicos (BENDER *et al.*, 2014). Esse sistema denominado como MCMN (*Metal Complex Multi-Wall Nanocapsules*) foi conjugado com o aminoácido fenilalanina, agente modelo para passivar a superfície, devido à elevada reatividade dos íons metálicos em formar conjugados. Posteriormente, nesse mesmo modelo nanoestrutural Bender e colaboradores (2014) estudaram a ligação do fragmento de anticorpo scFv anti-LDL(-). Após a conjugação do fragmento de anticorpo à nanoestrutura, foi realizado um ensaio de reconhecimento molecular *in vitro* e os dados indicam que o sítio ativo do fragmento de anticorpo foi mantido, após ligação ao complexo multiparede.

O desenvolvimento desse sistema, abre novas oportunidades de encapsulação de fármacos antitumorais e ligação de anticorpos para vetorização sítio específico. Além disso, em relação a fenilalanina, KHARYA e colaboradores, (2013) relataram a complexação do aminoácido fenilalanina em nanopartículas e sua permeação antitumoral pela barreira hematoencefálica, através da via de transporte de aminoácidos (LAT1). Novos estudos com nanopartículas contendo um fármaco antitumoral para tratamento de câncer de mama atuando simultaneamente em metástases cerebrais, podem ser planejados. Além disso, as nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com LIPOID S75®, quitosana e polissorbato 80 complexadas com íons ferro (Fe^{2+}) ou zinco (Zn^{2+}) poderiam ser funcionalizadas em sua superfície anticorpos específicos para tratamento de câncer de mama abrindo novas perspectivas de tratamento no futuro.

