

Susana Cristina Cristo Cecílio

# Caracterização Físico-química e Biológica de Nanopartículas para o Tratamento de Leucemias

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, orientada pelo Professor Doutor João Nuno Moreira e  
apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra com o intuito de adquirir o Grau de Mestre em Biotecnologia Farmacêutica. Este projeto foi desenvolvido no Centro de Neurociências e Biologia Celular, no grupo de Vectores e Terapia Génica, sob a Orientação do Professor Doutor João Nuno Moreira (Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra).

# Agradecimentos

Após a concretização deste projeto, gostaria de agradecer a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a sua realização.

Em primeiro lugar, um agradecimento muito especial ao Professor Doutor João Nuno Moreira por me ter proporcionado a realização deste projeto de dissertação que contribuiu para a minha aprendizagem, autonomia e enriquecimento profissional e pessoal, assim como pela orientação ao longo de todo o percurso de execução da tese. À Dr.<sup>a</sup> Marta Isabel Pereira pelo acompanhamento nalgumas etapas do trabalho, disponibilidade e dedicação na revisão da tese. Ao professor Doutor Artur Paiva pelo seu contributo para a realização de ensaios. Obrigada!

A todos os meus colegas do grupo de Vetores e Terapia Génica do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra, nomeadamente ao Nuno Fonseca, Ângela Valério-Fernandes, Rui Lopes e Ana Gregório por toda a disponibilidade e todo o apoio prestado sempre que necessitei. Obrigada pela vossa ajuda e colaboração!

À Sarah Pagliaro pelo apoio prestado no início deste projecto, à Rute Araújo e à Joana Balça Silva pelos momentos de boa disposição e à Ana Filipa Cruz por todo o acompanhamento e ajuda quando necessários, bem como pelos momentos de descontração e amizade! À Vanessa Monteiro por toda a dedicação, simpatia, carinho e encorajamento desde sempre e, sobretudo, por todos os momentos de grande amizade. Muito obrigada por tudo!

Às pessoas da Sala de Mestrados, um grande obrigada pelos momentos de convívio e companheirismo. Aos mais próximos, em particular à Ana Teresa e ao Luís, um obrigada especial!

À Margarida, Cátia, Nicole, Sara e Filipe um grande obrigada pelo apoio e grande amizade ao longo de todos estes anos, por maior que tenha sido a distância!

Aos meus pais e à minha irmã, um especial agradecimento por todo o apoio e força incondicional dados em todos os momentos, por toda a confiança depositada em mim ao

longo deste percurso e por estarem mais do que presentes em todas as situações da minha vida. A vocês tudo devo!

Ainda um enorme agradecimento ao Nuno, por todo o carinho, compreensão, apoio e encorajamento de forma também incondicional ao longo de toda esta etapa, apesar de toda a distância.

Obrigada a todos!

# Tabela de Conteúdo

Agradecimentos .....	i
Tabela de Conteúdo .....	iii
Lista de Abreviaturas .....	v
Lista de Tabelas.....	vii
Resumo .....	ix
Abstract .....	l
<b>I. Introdução .....</b>	<b>3</b>
1.1. Cancro - Evolução e Progressão.....	4
1.2. Hematopoiese .....	6
1.3. Neoplasias Hematológicas .....	7
1.3.1. Leucemias.....	8
1.3.1.1. Leucemia Linfoblástica Aguda.....	9
1.3.1.2. Leucemia Mielóide Crónica .....	9
1.3.1.3. Leucemia Mieloblástica Aguda: LMA-M5 ou Leucemia Monocítica Aguda .....	12
1.3.2. Tratamento .....	13
1.4. Novas estratégias terapêuticas lipossômicas: nanopartículas de base lipídica .....	14
1.4.1. Lipossomas sensíveis ao pH .....	17
1.4.2. Lipossomas com doxorubicina .....	19
1.4.3. Recetor Nucleolina .....	20
1.5. Objetivos .....	22
<b>2. Materiais e Métodos.....</b>	<b>23</b>
2.1. Materiais.....	24
2.1.1. Materiais .....	24
2.1.2. Culturas Celulares.....	24
2.2. Métodos.....	24

2.2.1. Preparação de lipossomas .....	24
2.2.1.1. Ativação dos peptídeos .....	24
2.2.1.2. Preparação de lipossomas pelo método de Injeção de Etanol e pós-inserção	25
2.3. Caracterização de Lipossomas .....	26
2.3.1. Tamanho, Índice de Polidispersão e Eficiência de encapsulação.....	26
2.3.2. Estudos de Imunocitoquímica.....	26
2.3.3. Estudos de entrega intracelular por citometria de fluxo .....	27
2.3.4. Estudos de Viabilidade Celular .....	28
2.3.5. Estudos de Citotoxicidade .....	28
2.3.6. Análise Estatística .....	29
<b>3. Resultados e Discussão.....</b>	<b>30</b>
3.1. Caracterização das propriedades físico-químicas das nanopartículas.....	31
3.2. Estudos de Imunocitoquímica nas linhas celulares de leucemia.....	33
3.3. Estudos de associação celular por citometria de fluxo.....	34
3.3.1. Estudos de associação celular de diferentes subpopulações .....	38
3.4. Estudos de análise do impacto da nanopartícula na viabilidade celular .....	39
3.5. Estudos de citotoxicidade celular utilizando as formulações lipossômicas com doxorubicina encapsulada.....	41
3.5.1. Linha celular CCRF-CEM.....	41
3.5.2. Linha celular K562.....	44
3.5.3. Linha celular THP-I .....	45
<b>4. Conclusões e Perspetivas Futuras .....</b>	<b>49</b>
<b>Referências .....</b>	<b>52</b>

## Lista de Abreviaturas

2-IT	2-iminotiolano
7-AAD	7-aminoactinomicina
<i>ABL</i>	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina Difosfato
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfatase
BCR	<i>Breakpoint cluster region protein</i>
BCR-ABL1	<i>Breakpoint cluster region-Abelson</i>
BP	Progenitor de células B
CDP	Progenitor comum de células dendríticas
CEH	Células Estaminais Hematopoiéticas
CHEMS	Hemissuccinato de Colesterol
CHOL	Colesterol
CLP	Progenitor comum para a linhagem linfóide
CMP	Progenitor comum para a linhagem mielóide
DAB	Composto colorimétrico 3,3'-Diaminobenzidina
DOPE	Dioleoilfosfatidiletanolamina
DSPC	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DSPE-PEG (2000)	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino (polietileno glicol) -2000]
DSPE-PEG-MAL	1,2-distearoil-sn-Glicero-3-Fosfoetanolamina-N-[Maleimida (Polietilenoglicol) 2000]
DXR	Doxorrubicina
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ETP	Percursor tímico precoce
F3	Ligando específico
FBS	Soro Fetal Bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FL2	Canal de intensidade de fluorescência em citometria de fluxo
GMP	Progenitor monócito granulócito

HBS	HEPES <i>buffered saline</i>
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietilo)-piperazina-N'-2-etanesulfónico
HSC	Células estaminais hematopoiéticas
IC <sub>50</sub>	Concentração necessária para inibir 50% da viabilidade celular
IC <sub>90</sub>	Concentração necessária para inibir 90% da viabilidade celular
<i>K-RAS</i>	<i>Kirsten rat sarcoma oncogene</i>
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LLC	Leucemia Linfóide Crónica
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crónica
LSAB	Método estreptavidina biotina
MDP	Progenitor de células dendríticas e de macrófagos
MEP	Progenitor etritróide megacariócito
MES	Ácido 2-N-morfolino etanosulfónico
MLP	Progenitor mielóide/linfóide
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NP	Progenitor de células <i>Natural Killer</i>
NS	Ligando não específico
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PEG	Poli(etileno glicol)
Ph	Cromossoma Philadelphia
PDI	Índice de Polidispersão
R1	Células não viáveis
R2	Células viáveis
RhoD	(L- $\alpha$ -fosfatidiletanolamina-N-(lissamina rodamina B sulfonil) (Sal de Amónio))
RhoD-PE	Derivado lipídico de (L- $\alpha$ -fosfatidiletanolamina-N-(lissamina rodamina B sulfonil) (Sal de Amónio))
SL_NS	Lipossomas PEGuilados não específicos (com ligando NS inespecífico)
SL_NT	Lipossomas PEGuilados não direcionados
SL_T	Lipossomas PEGuilados específicos (com ligando F3 específico)
UNT	Células não sujeitas a incubação com as partículas lipídicas
UNT_NP	Células não sujeitas a protocolo



## **Lista de Tabelas**

**Tabela I** - Formulações lipossômicas comercialmente disponíveis

## **Lista de Figuras**

**Figura 1.1.** Hierarquia hematopoiética.

**Figura 1.2.** Leucemia Linfoblástica Aguda.

**Figura 1.3.** Leucemia Mielóide Crônica.

**Figura 1.4.** Formação do cromossoma Philadelphia (Ph).

**Figura 1.5.** Lipossomas com PEG (polietilenoglicol) incorporado na sua superfície.

**Figura 1.6.** Terapia direcionada para o tratamento do cancro.

**Figura 1.7.** Comportamento fusogénico do conjunto CHEMS/DOPE.

**Figura 2.1.** Reação entre anticorpo-antígeno visualizado em imunocitoquímica.

**Figura 3.1.** Caracterização físico-química das nanopartículas direcionadas e não direcionadas com o agente quimioterapêutico encapsulado.

**Figura 3.2.** Observação da expressão do recetor nucleolina nos três tipos de linhas celulares, por imunocitoquímica.

**Figura 3.3.** Estudos de associação celular normalizados de diferentes linhas celulares leucémicas e de melanoma sujeitas a diferentes tempos de incubações e temperaturas, com diferentes formulações.

**Figura 3.3.1.** Estudos de associação celular das subpopulações observadas nas linhas celulares de leucemia.

**Figura 3.4.** Estudo de viabilidade celular utilizando 7-aminoactinomicinaD (7-AAD) como marcador nuclear de necrose celular.

**Figura 3.5.1.** Estudos de citotoxicidade dos lipossomas desenvolvidos contendo doxorubicina encapsulada na linha celular CCRF-CEM.

**Figura 3.5.2.** Estudos de Citotoxicidade dos lipossomas contendo doxorubicina encapsulada na linha celular K562.

**Figura 3.5.3.** Estudos de Citotoxicidade dos lipossomas contendo doxorubicina encapsulada na linha celular THP-1.

## Resumo

O cancro é uma das causas mais comuns de mortalidade no mundo.

Parte da grande mortalidade associada ao cancro reside no facto de que a eficácia dos tratamentos correntes na prática clínica, como a quimioterapia, radioterapia, cirurgia, terapia hormonal e imunoterapia, ou a sua combinação, são ainda limitados e estão associados a elevadas taxas de resistência. Para além disso, estes tratamentos induzem uma elevada taxa de efeitos colaterais significativos devido à sua ação em células saudáveis. Como tal, de forma a ultrapassar tais problemas, esforços atuais têm sido focados no desenvolvimento de novas plataformas de entrega de fármacos, como é o caso de terapias direcionadas, que permitem aumentar o efeito do fármaco nas células cancerígenas, poupando os tecidos saudáveis.

Estas novas terapias dirigidas a um alvo, como os nanossistemas, permitem um tratamento mais específico no sítio alvo enquanto permitem transportar, simultaneamente, dosagens mais elevadas do agente anti-cancerígeno, com redução significativa dos efeitos secundários comparativamente ao tratamento convencional. Para além disso, partículas lipídicas, nomeadamente os lipossomas, são suficientemente biocompatíveis e estáveis no sangue, tornando-os num sistema de entrega altamente atrativo.

Neste contexto, nanopartículas PEGuiladas de base lipídica com um ligando específico (peptídeo F3) incorporado à superfície foram desenvolvidas com o propósito de encapsular e promover a entrega da doxorubicina - um agente citostático que atua como fármaco de primeira linha no tratamento de muitos cancros - em linhas celulares de leucemia representando diferentes linhagens: leucemia linfoblástica aguda (CCRF-CEM), leucemia mielóide crónica (K562) e células de leucemia mieloblástica (monocítica) aguda (THP-1).

Desta forma, com o intuito de se compreender os mecanismos inerentes à formulação desenvolvida, analisaram-se as características da nanopartícula, incluindo o tamanho da partícula lipídica e a sua homogeneidade, bem como a eficiência de encapsulação do fármaco. Foram ainda realizados estudos quanto à especificidade do ligando F3 para o recetor nucleolina que se encontra sobreexpresso nas células do cancro, à internalização da nanopartícula, entrega celular e atividade citotóxica. A expressão do recetor nucleolina foi confirmada por imunocitoquímica, indicando o potencial clínico desta abordagem terapêutica.

Verificou-se que a internalização da nanopartícula aumentou com a presença do ligando F3 nalgumas das linhas utilizadas nos estudos. Contudo, apesar da internalização do lipossoma ter aumentado, a taxa de morte celular induzida pela doxorubicina contida na partícula funcionalizada foi semelhante à taxa de morte causada pelas partículas lipossômicas sem ligando à superfície ou com um ligando inespecífico.

Em suma, conclui-se que o desenvolvimento destas partículas vetorizadas não representa uma eficácia superior quando incubadas em células tumorais desta natureza, comparativamente às partículas usadas como controlo, embora possam, contudo, reduzir efeitos secundários inerentes aos tratamentos convencionais.

## Abstract

Cancer is one of the most common causes of death worldwide.

Part of the high mortality associated with cancer resides in the fact that the effectiveness of current treatments such as chemotherapy, radiation, surgery, hormone therapy and immunotherapy, or their combination, is still limited and is associated with a high rate of resistance. Moreover, these treatments induce high rates of significant side effects due to their action on healthy cells. Therefore, to overcome these problems, current efforts focus on the development of novel drug delivery platforms, such as targeted therapies, than can increase the effect of the drug on cancer cells, while sparing healthy tissue. These novel targeted therapies include nanosystems, which allow a more specific *in situ* treatment while simultaneously carrying higher dosages of anticancer drugs, with a significant reduction in side effects, compared to conventional treatment. In addition, lipidic particles, including liposomes, are sufficiently biocompatible and stable in the blood to be an attractive delivery system.

In this context, lipid-based PEGylated nanoparticles functionalized with a specific ligand (F3 peptide) on the surface have been developed for the encapsulation and delivery of doxorubicin - a cytostatic agent used as the first line treatment of many cancers - to leukemia cell lines representing different lineages: acute lymphoblastic leukemia (CCRF-CEM), chronic myeloid leukemia (K562) and acute myeloblastic (monocytic) leukemia (THP-1).

Thus, in order to understand the mechanisms inherent to the developed formulation, we analysed the characteristics of the developed formulation, including the size of the lipidic particle and its homogeneity, as well as the drug encapsulation efficiency. We studied the specificity of the F3 ligand for the nucleolin receptor that is overexpressed on cancer cells, the internalization of the nanoparticle, its cell delivery and its cytotoxic activity. The expression of the nucleolin receptor in the different cell lines was confirmed by immunocytochemistry, indicating the potential clinical advantage of this therapeutic approach.

We found that the internalization of this nanoparticle was increased by the presence of the F3 ligand in some of the studied cell lines. However, although the internalization of the liposome was increased, the rate of cell death induced by doxorubicin contained in these

specific particles was similar to the death rate caused by liposomal particles without a surface ligand or with a non-specific ligand.

In summary, it is concluded that the development of these particles does not have a higher efficacy when administered in this kind of cancer cells, compared with the particles used as control. However, they may reduce side effects inherent to the conventional treatments.



# I. Introdução

## I. Introdução

### I.1. Cancro - Evolução e Progressão

O cancro é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo e uma das doenças de maior incidência na sociedade atual, com mais de 10 milhões de novos casos por ano (Diao *et al.*, 2011, Hu *et al.*, 2012, Peer *et al.*, 2007). Nas últimas décadas, têm sido descritos grandes avanços científicos na compreensão das bases moleculares do cancro e no seu diagnóstico e tratamento (Martinez *et al.*, 2003).

As doenças oncológicas são a principal causa de morte nos países economicamente desenvolvidos, e a segunda causa de morte nos países em desenvolvimento (American Cancer Society 2011). Estima-se que ocorreram cerca de 14,1 milhões de novos casos de cancro e 8,2 milhões de mortes, a nível mundial em 2012, de acordo com a World Health Organization (Ferlay *et al.*, 2012). Devido ao envelhecimento e crescimento da população e a uma progressiva adoção de hábitos de risco de desenvolvimento da doença, a incidência mundial de cancro tem vindo a aumentar (Donaldson, 2004).

O cancro caracteriza-se por ser um distúrbio hiperproliferativo, no qual se verifica um crescimento e proliferação descontrolados de células anómalas, induzidos por fatores externos (como radiações e exposição a compostos químicos) e/ou por fatores internos (como o perfil genético e epigenético, mutações e microambiente imunológico), fatores esses que podem atuar em conjunto ou em sequência, promovendo e iniciando a tumorigénese (Kumar *et al.*, 2010, Martinez *et al.*, 2003, Subramaniam *et al.*, 2010). A elevada capacidade de crescimento e divisão celular, a invasão dos tecidos adjacentes e possíveis metastizações para outros órgãos são características que estão associadas ao comportamento das células cancerígenas (Coleman *et al.*, 2006, Weinberg, 1994, Weinberg, 1988). Atualmente, sabe-se que o cancro está claramente associado a um aumento do número de células devido a alterações nos mecanismos de regulação e proliferação celular, bem como a uma diminuição da taxa de morte celular programada ou apoptose das células (Dai *et al.*, 2009b).

Todos os cancros envolvem uma disfunção genética (American Cancer Society 2011). Milhares de mutações pontuais, translocações, amplificações e deleções contribuem para o desenvolvimento do cancro (Cairns *et al.*, 2011). A desregulação de genes pode induzir a sua sobreexpressão bem como a sua supressão, o que proporciona a diminuição da apoptose e o aumento da proliferação e invasão celular (Coleman & Tsongalis, 2006). A ativação de



oncogenes (genes que contribuem para um aumento da proliferação celular e redução da apoptose) e a inativação de genes supressores tumorais (genes que, direta ou indiretamente, regulam o crescimento das células) são exemplos de mecanismos de alteração de genes essenciais nos processos de regulação celular (Crans *et al.*, 2001, Vanneman *et al.*, 2012). Um dos casos representativos de mutação em oncogenes é a ativação do oncogene *RAS*, o qual é responsável pela proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (Fernandez-Medarde *et al.*, 2011). Mutações de ganho de função neste gene condicionam um aumento exagerado da taxa proliferativa das células (Fernandez-Medarde & Santos, 2011).

A acumulação de diversas mutações proporciona uma vantagem competitiva das células tumorais comparativamente às outras restantes, induzindo um crescimento clonal daquelas e, conseqüentemente, um processo de tumorigênese (Polyak, 2007).

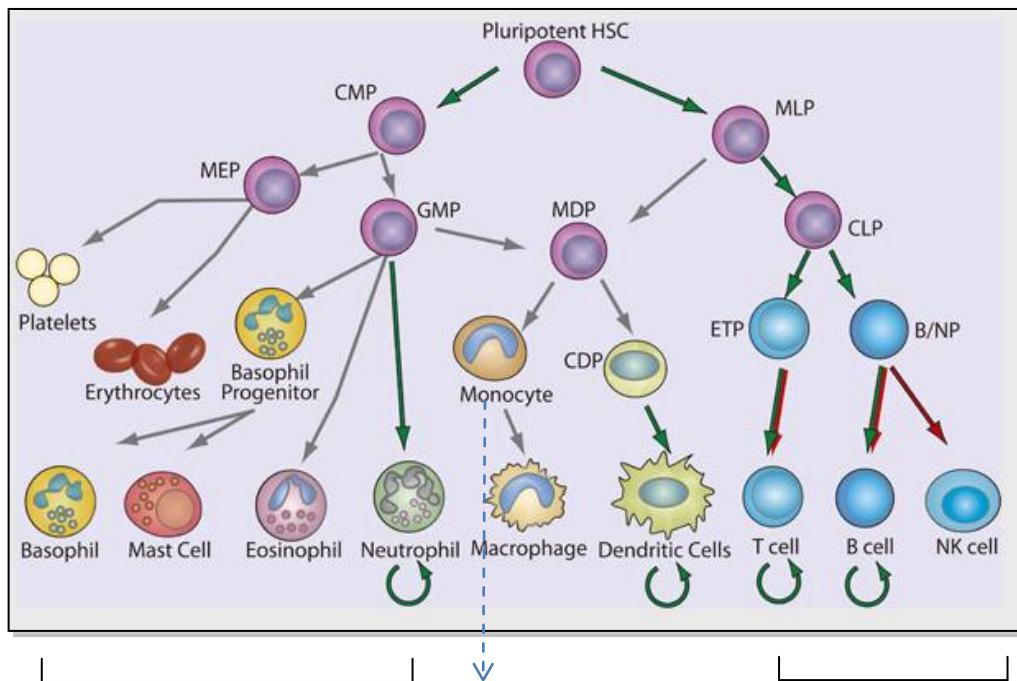
Segundo Hanahan and Weinberg (2011), o cancro manifesta-se através de 6 alterações essenciais na fisiologia celular, responsáveis pelo seu comportamento desregulado: auto-suficiência em relação a sinais de crescimento, insensibilidade a inibidores proliferativos e de crescimento, capacidade de contornar a morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, sustentação do tumor por indução da angiogênese (no caso de tumores sólidos) e, por último, evasão e metastização tecidual (Hanahan *et al.*, 2000, Hanahan *et al.*, 2011). A perda da resposta apoptótica devido às alterações na maquinaria celular tem um papel crucial na resistência das células tumorais a uma ampla variedade de terapias anti-cancerígenas correntes (Dai *et al.*, 2009a).

Apesar dos recentes avanços científicos na área da oncologia, as características moleculares da maioria dos cancros ainda não estão claramente estabelecidas e, até ao momento, não existem marcadores validados para uma deteção precoce e, fundamentalmente, uma terapia dirigida (Nass *et al.*, 2007). Desta forma, a identificação de fatores que contribuem para o desenvolvimento do cancro e a elucidação de mecanismos de ação tornam-se importantes e essenciais na medida em que não só permitem explicar as características fenotípicas exibidas pelas células cancerígenas mas também proporcionam alvos para o desenvolvimento de agentes terapêuticos com vista a uma maior eficácia de tratamento (Martinez *et al.*, 2003, Polyak, 2007).

## 1.2. Hematopoiese

A hematopoiese é um processo complexo e altamente regulado na medula óssea, caracterizado por uma renovação contínua de células sanguíneas a partir de um número reduzido de células estaminais precursoras pluripotentes, de acordo com as necessidades do organismo (Guarnerio *et al.*, 2014, Jung *et al.*, 2014, Kiel *et al.*, 2008). Estas células estaminais hematopoiéticas (CEH) definem-se pelo seu elevado potencial proliferativo, elevada capacidade de auto-renovação e multipotência para gerar todas as diferentes linhagens hematopoiéticas linfóides e mielóides (Belov *et al.*, 2001, Roshal *et al.*, 2013). Moléculas sinalizadoras e fatores de crescimento coordenados induzem as células estaminais a manterem o seu estado indiferenciado ou, pelo contrário, a diferenciarem-se (Hoffbrand *et al.*, 2006). As CEH produzem progenitores imaturos que, gradual e progressivamente, através de uma série de eventos de proliferação e diferenciação, originam as diferentes linhagens (Crans & Sakamoto, 2001) (Figura 1.1). Nos adultos, as CEH são responsáveis por gerar  $1 \times 10^9$  glóbulos vermelhos e  $1 \times 10^8$  de glóbulos brancos por hora no sangue (Wang *et al.*, 2011).

Fatores de transcrição são essenciais na regulação do crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular no sistema hematopoiético. Alterações nos mecanismos que controlam todas estas funções, como uma falha no controlo do mecanismo de produção ou da morte celular programada das células hemáticas, podem originar neoplasias hematológicas, onde se incluem as leucemias (Crans & Sakamoto, 2001, Pokharel, 2012).



**Figura 1.1.** Hierarquia hematopoiética.

As células estaminais hematopoiéticas estão na origem da hierarquia, sendo responsáveis pela produção de células do sangue maduras; CEH: células estaminais hematopoiéticas; CMP: progenitor comum para a linhagem mieloide; MLP: progenitor mieloide/linfóide; MEP: progenitor eritróide/megacariócito; GMP: progenitor monócito/granulócito; MDP: progenitor de células dendríticas e de macrófagos; CDP: progenitor comum de células dendríticas; CLP: progenitor comum para a linhagem linfóide; ETP: precursor tímico precoce; B/NP: progenitor de células B e de células Natural Killer. Adaptado de (Hayden *et al.*, 2011).

### 1.3. Neoplasias Hematológicas

Os inúmeros estádios de diferenciação hematopoiética podem dar origem a diferentes tipos de cancro, biológica e clinicamente distintos, devido ao diferente fenótipo da célula envolvida e às diversas alterações genéticas que adquirem (Nass & Moses, 2007).

Nas últimas décadas, o conhecimento biológico acerca destas doenças tem sido crescente, permitindo uma classificação mais sofisticada que incorpora não só as características morfológicas “tradicionais” e já conhecidas, como também características imunofenotípicas, genéticas e clínicas (Nass & Moses, 2007).

### 1.3.1. Leucemias

O termo leucemia (do grego: *leukos* branco, *aima* sangue) foi descrito pela primeira vez por Rudolf Virchow (Geary, 2000, Reckzeh *et al.*, 2010).

A leucemia é uma doença maligna e progressiva caracterizada por uma proliferação clonal e excessiva, com bloqueio maturativo e disfunção celular, de células das linhas mielóide ou linfóide, ou dos seus precursores, na medula óssea e/ou sangue (Crans & Sakamoto, 2001). Estima-se que em 2012 ocorreram 151 317 mortes em indivíduos do sexo masculino e cerca de 114 144 mortes relativamente ao sexo feminino a nível mundial devido a estas patologias (Ferlay *et al.*, 2012) que atingem todas as faixas etárias, com um pico de incidência no idoso e outro nas crianças e adolescentes com idades inferiores a 15 anos (American Cancer Society 2011). Apesar da alta taxa de mortalidade, as leucemias representam uma pequena fração (<5%) de todos os cancros no Homem (Howlader *et al.*, 2013).

Os diferentes tipos de leucemia são classificados de acordo com a célula envolvida e o tempo de evolução, condicionado pela taxa de crescimento celular (Crans & Sakamoto, 2001). Esta classificação permite agrupá-las em 4 grandes tipos, de acordo com a linhagem afetada (Leucemia Linfóide e Leucemia Mielóide) e a fase de bloqueio maturativo e índice proliferativo (Leucemia Aguda e Leucemia Crónica) (Hamerschlak, 2008, Saha *et al.*, 1998).

A maioria das leucemias é diagnosticada no idoso, sendo as mais comuns a Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) e as Leucemias Mieloblásticas Agudas (LMA) (American Cancer Society 2014). Na idade pediátrica predominam as Leucemias Linfoblásticas Agudas (LLA) (Shah *et al.*, 2013).

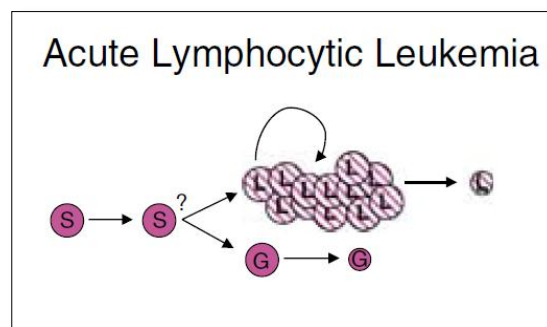
Nas leucemias agudas, a célula neoplásica é uma célula imatura em estadios precoces da diferenciação hematopoiética, designada blasto, que se tornam independentes relativamente aos mecanismos de controlo da hematopoiese e, como tal, permanecem indefinidamente em divisão (Pokharel, 2012). A continuada proliferação de blastos, sem capacidade de diferenciação em células hematopoiéticas maduras, resulta na acumulação de células imaturas disfuncionais, substituindo os elementos normais da medula e levando à progressiva depleção de células maduras no sangue (Morais *et al.*, 2014). Como consequência, podem ocorrer infeções por falta de glóbulos brancos maduros funcionais, anemia por falta de glóbulos vermelhos, e hemorragias por falta de plaquetas (Pokharel, 2012).

Nas leucemias crônicas a célula neoplásica já tem características de maturação, com menor capacidade proliferativa sendo, contudo, funcionalmente anômala (Pokharel, 2012).

### 1.3.1.1. Leucemia Linfoblástica Aguda

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) (Figura 1.2.) é o tipo de leucemia mais comum nas crianças, sendo rara em adultos (Marnitz *et al.*, 2014).

A terapêutica da LLA passa pela utilização de protocolos quimioterápicos com a utilização síncrona e/ou sequencial de vários fármacos, incluindo antraciclina como a doxorubicina. Em casos selecionados, podem ser utilizados inibidores de tirosina cinase e anticorpos monoclonais, podendo ainda haver indicação para o transplante alogénico de medula óssea ou de progenitores hematopoiéticos de sangue periférico (Hamerschlak, 2008, Inaba *et al.*, 2013).



**Figura 1.2.** Leucemia Linfoblástica Aguda. As células hematopoiéticas estaminais (CHE) produzem precursores de granulócitos (G) e de linfócitos (L) que irão gerar células diferenciadas. Modificações genéticas e/ou epigenéticas nas células estaminais (S) ou nos precursores de linfócitos (L) (células listradas) induzem uma acumulação neoplásica das células devido a uma hiperproliferação e decréscimo da apoptose. Adaptado de (Buzzeo *et al.* 2007).

### 1.3.1.2. Leucemia Mielóide Crônica

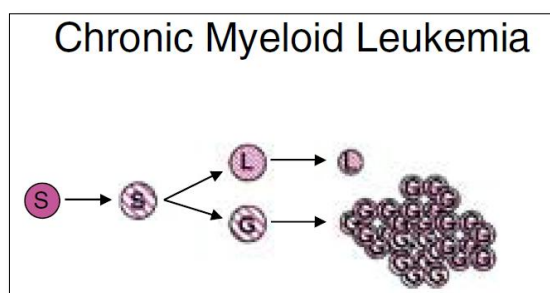
A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma neoplasia maligna mieloproliferativa clonal e progressiva, na qual se observa uma produção excessiva de glóbulos brancos maduros e seus progenitores intermédios (Doepfner *et al.*, 2007, Radich, 2010). Na grande maioria dos casos, a causa envolve uma translocação que origina o cromossoma Philadelphia

(Cortes *et al.*, 1996, Deininger *et al.*, 2000, Savage *et al.*, 2002), que será desenvolvido mais adiante.

A célula neoplásica da LMC desenvolve-se a partir de células estaminais hematopoiéticas multipotentes primitivas (Buzzeo *et al.*, 2007) (Figura 1.3.). Verifica-se, ainda, um aumento da população de células estaminais causado, possivelmente, pela redução na diferenciação ou apoptose, com aumento de auto-renovação celular (Goldman *et al.*, 2003). O aumento da taxa de proliferação reflete a insensibilidade dos progenitores celulares hematopoiéticos aos reguladores negativos da proliferação, contribuindo para a inibição da maturação normal das células e para a uma vantagem proliferativa das células leucémicas (Goldman & Melo, 2003, Gordon, 1999).

Em consequência da expansão medular de progenitores em estádios intermédios, células progenitoras de todas as linhagens surgem na circulação em número elevado, um fenómeno denominado mielémia (Gordon 1999).

A LMC caracteriza-se por apresentar três fases distintas: 1. A fase crónica, em que há a característica expansão clonal massiva de células mielóides, acima descrita; 2. A fase acelerada, caracterizada pela perda progressiva da capacidade de diferenciação dos clones leucémicos, com aumento do índice proliferativo e do número de progenitores mais imaturos (blastos); 3. A crise blástica, em que a preponderância de blastos origina um comportamento sobreponível ao de uma leucemia aguda (Druker *et al.*, 2001, Hamerschlak, 2008, Hirji *et al.*, 2013).



**Figura 1.3.** Leucemia Mielóide Crónica. Modificações genéticas e/ou epigenéticas (células listradas) nas células estaminais (S) ou nas células progenitoras de granulócitos (G) induzem uma acumulação de células neoplásicas devido a uma proliferação excessiva e a um simultâneo decréscimo da apoptose. Adaptado de (Buzzeo *et al.* 2007).

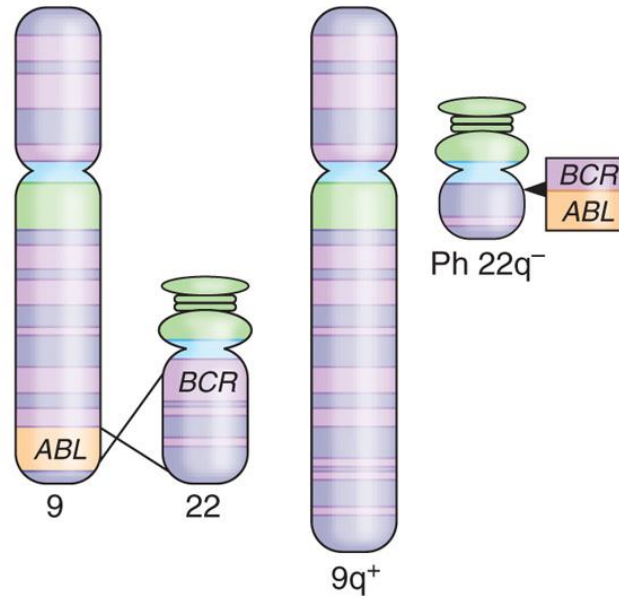
O tratamento passa pela quimioterapia e/ou irradiação intensiva e, para uma minoria de doentes, pelo transplante de medula óssea alogénica (Clarkson *et al.*, 2003).

### - Biologia da neoplasia: Cromossoma Philadelphia

A ativação dos fatores de transcrição que controlam a diferenciação hematopoiética e a ativação constitutiva de componentes de recetores de tirosina cinase são as duas principais alterações genéticas responsáveis pelo desenvolvimento da LMC (Clarkson *et al.*, 2003).

A proteína *abl* funciona como tirosina cinase, transferindo um grupo fosfato proveniente da molécula ATP para resíduos tirosina de outros substratos (Zhu *et al.*, 2014). Esta enzima inicia uma cascata de eventos e vias de sinalização intracelulares incluindo vias de proliferação e sobrevivência celular (Bellodi *et al.*, 2009).

Uma das translocações presentes em cerca de 95% das LMC e nalgumas LLA (cerca de 20-25%) ocorre entre os cromossomas 9 e 22 (Hirayama *et al.*, 2008, Izraeli *et al.*, 2014, Radich, 2010, Rowley, 1973). Parte do proto-oncogene *ABL* é removida do cromossoma 9, sendo inserido no cromossoma 22, adjacente ao gene *BCR*. Da mesma forma, parte do cromossoma 22 é removida distalmente ao ponto de quebra e translocada para o cromossoma 9. Esta translocação origina um gene quimérico *BCR-ABL* e consequente diminuição do tamanho do cromossoma 22, originando um derivado do 22 designado cromossoma Philadelphia (Druker *et al.*, 2001, el-Shami *et al.*, 2008, Karimiani *et al.*, 2013) (Figura 1.4.). A proteína de fusão *bcr-abl* codificada pelo gene quimérico tem a actividade de tirosina-cinase da *ABL* mas encontra-se constitucionalmente ativada, originando perturbações no ciclo celular, diminuição da apoptose e aumento da divisão e proliferação celular que conferem uma vantagem proliferativa sobre os elementos hematopoiéticos não-mutados, e subjazem ao desenvolvimento da LMC (Aloisi *et al.*, 2006, Buzzeo *et al.*, 2007, Deininger *et al.*, 2000). Basta uma única célula estaminal hematopoiética pluripotente adquirir o cromossoma Philadelphia e, com isso, uma vantagem proliferativa para proporcionar a formação gradual de clones Ph-positivos que substituem os elementos hematopoiéticos normais (Goldman & Melo, 2003).



**Figure 1.4.** Formação do cromossoma Philadelphia (Ph). Translocação entre os cromossomas 9 e 22, levando à formação do cromossoma Philadelphia (Ph) e posterior ação do oncogene *BCR-ABL* na patogénese da CML (Lydon, 2009).

Os inibidores da tirosina-cinase *BCR-ABL* são o tratamento indicado para a LMC (Savage & Antman, 2002). O imatinib, o primeiro fármaco da classe com aprovação para uso humano, é um inibidor seletivo da tirosina-cinase *BCR-ABL*, utilizado como terapêutica de primeira linha na LMC (Buzzeo *et al.*, 2007, Hamerschlak, 2008, Mendonca *et al.*, 2010). Contudo, têm sido descritas cada vez mais mutações que conferem resistência a este fármaco (Baselga, 2006, Nass & Moses, 2007).

### 1.3.1.3. Leucemia Mieloblástica Aguda: LMA-M5 ou Leucemia Monocítica Aguda

A Leucemia Monocítica Aguda (LMC), ou Leucemia Mieloblástica Aguda tipo M5, é um subtipo de LMA definido pelo grupo FAB (Tallman *et al.*, 2004). Neste subtipo, as células de linhagem monocíticas ou monoblástica/monocítica apresentam-se em elevada percentagem no sangue periférico, excedendo os  $5 \times 10^3/L$  (Belov *et al.*, 2001, da Fonseca *et al.*, 2003, Tallman *et al.*, 2004), e associa-se frequentemente a translocações cromossómicas como a translocação 11q23 (Ferrara *et al.*, 2013, Tallman *et al.*, 2004).



### 1.3.2. Tratamento

Quimioterapia, radioterapia, excisão cirúrgica, imunoterapia, terapia hormonal e transplante alogénico de células estaminais são os tratamentos possíveis para a maior parte dos tipos de leucemia (Goldman & Melo, 2003). No caso específico da LMC, como previamente descrito, já foram desenvolvidos fármacos dirigidos, como o imatinib, às anomalias genéticas que a caracterizam (Radich, 2010, Savage & Antman, 2002).

Contudo, o tratamento representa um desafio difícil devido à elevada taxa de recaídas e complicações associados ao mesmo (Doepfner *et al.*, 2007).

A quimioterapia é um dos tratamentos mais utilizados no tratamento do cancro (Diao *et al.*, 2011) e visa a eliminação de células que possuem uma taxa de crescimento mais acelerada, como é o caso das células cancerígenas, não sendo, contudo, específica para estas últimas (Brannon-Peppas *et al.*, 2004). A resistência à quimioterapia, que passa pela múltipla resistência intrínseca a fármacos e a eficácia limitada de estratégias de tratamento convencionais no tratamento das leucemias, quer pela incapacidade de fornecer concentrações terapêuticas do fármaco no tecido-alvo, quer por efeitos secundários severos sobre os órgãos e tecidos normais, gera um considerável interesse e necessidade no desenvolvimento de novas terapêuticas com melhor especificidade celular, dirigida ao alvo molecular subjacente à leucemogénese (Doepfner *et al.*, 2007, Gomes-da-Silva *et al.*, 2012b, Governator, 2011, Hamerschlak, 2008, Morais *et al.*, 2014, Soundararajan *et al.*, 2009).

O verdadeiro desafio atual centra-se no desenvolvimento de uma medicina “precisa” e dirigida para os diferentes subtipos de leucemia, com redução dos efeitos secundários (Napper *et al.*, 2013, Savage & Antman, 2002).

O desenvolvimento de novas plataformas em nanoescala oferece um grande potencial nos avanços no tratamento de doentes com cancro (Cuenca *et al.*, 2006). Estudos anteriores utilizando lipossomas sensíveis ao pH em células de neoplasias hematológicas obtiveram resultados promissores. Estudos liderados por Ishida *et al.* (2001) em linhas celulares de linfoma B comprovaram o aumento da citotoxicidade da doxorubicina encapsulada, *in vitro* (Ishida *et al.*, 2001). Também Fonseca *et al.* (2005) demonstraram existir uma facilidade de associação celular entre uma partícula sensível ao pH e a membrana celular de células T leucémicas humanas (Fonseca *et al.*, 2005).

Assim, o direcionamento de fármacos para alvos específicos presentes apenas nos órgãos, tecidos ou células afetadas pela doença, inclusive em combinação com a

quimioterapia convencional, tem vindo a ser proposto como uma estratégia promissora para o aumento da eficácia dos tratamentos correntes, resultando no aumento da sobrevivência e da qualidade de vida do doente (Andresen *et al.*, 2005, Dai *et al.*, 2009a, Vanneman & Dranoff, 2012).

#### **1.4. Novas estratégias terapêuticas lipossômicas: nanopartículas de base lipídica**

A utilização de dosagens tradicionais de agentes anticancerígenos apresenta alguma limitação devido a barreiras com que os fármacos se deparam antes de atingirem o tecido-alvo; uma delas é o grande volume de distribuição após a administração intravenosa (Celano *et al.*, 2004). Esta situação desencadeia uma elevada toxicidade nos tecidos saudáveis, acompanhada de efeitos adversos e de um baixo índice terapêutico ( $[\text{dose letal do fármaco para } 50\% \text{ da população (LD50)}]/[\text{dose efetiva mínima para } 50\% \text{ da população (ED50)}]$ ) (To *et al.*, 2003).

Os sistemas de entrega não baseados em vírus têm vindo a ser estudados como uma alternativa atrativa, tendo como principais vantagens a reduzida imunogenicidade, facilidade de manuseamento, controlo das suas propriedades e caracterização estrutural e molecular (Allen, 1998, Ambegia *et al.*, 2005, Fonseca *et al.*, 2005, He *et al.*, 2013, Mokhtarieh *et al.*, 2012). Nas últimas décadas, têm-se alcançado grandes avanços no desenvolvimento de sistemas de libertação de agentes terapêuticos através de vetores lipossômicos, os quais têm vindo a ser aplicados em diversos campos, desde a quimioterapia à terapia genética (Fenske *et al.*, 2005, Simoes *et al.*, 2004).

Devido à sua elevada estabilidade no sangue e à sua composição fosfolipídica, que lhes permite serem biocompatíveis e biodegradáveis, os lipossomas são sistemas de entrega promissores e adequados a uma variedade de aplicações em áreas como a terapia celular ou terapia do cancro (Fonseca *et al.*, 2014, Immordino *et al.*, 2006). Estas nanopartículas de base lipídica têm sido o método de entrega de quimioterapia mais estudado, permitindo ultrapassar limitações quanto à biodistribuição sistémica do fármaco livre, solubilidade de agentes quimioterapêuticos hidrofóbicos e sua toxicidade (Gomes-da-Silva *et al.*, 2012a, Gomes-da-Silva *et al.*, 2012b, Pathak *et al.*, 2014).

Os requisitos para uma estabilidade e internalização vantajosa destas formulações lipídicas na célula-alvo, com vista a uma aplicação clínica, incluem ainda um pequeno tamanho da partícula, uma elevada eficiência de encapsulação, e uma farmacocinética e biodistribuição

favoráveis (Andresen *et al.*, 2005, Brannon-Peppas &Blanchette, 2004, Klimuk *et al.*, 2000, Monck *et al.*, 2000). A encapsulação de diversas moléculas de tamanho reduzido pelos lipossomas (< 200 nm) tem demonstrado eficácia em humanos em ensaios clínicos de Fase I e II (Pathak *et al.*, 2014). Ainda um aumento da associação celular com uma acumulação do fármaco no tumor entre 50 a 100 vezes superior ao agente terapêutico livre tem sido verificado com a utilização destas nanotecnologias (Jeffs *et al.*, 2005).

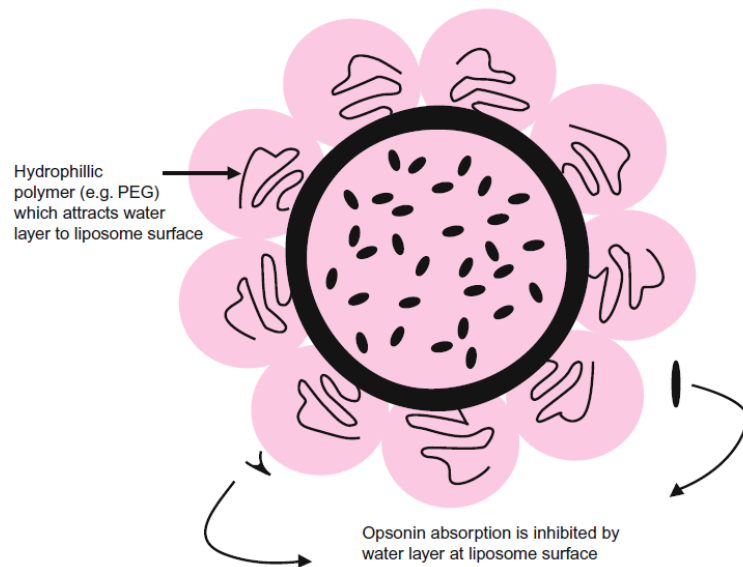
Em ordem a maximizar a entrega intracelular do seu conteúdo, estas partículas devem interagir especificamente com as células tumorais e serem internalizadas por estas (Haley *et al.*, 2008, Wheeler *et al.*, 1999). Idealmente, no interior das células as partículas destabilizarão no compartimento endossomal, induzindo a libertação do agente encapsulado para o citoplasma (Fenske &Cullis, 2005, Santos *et al.*, 2010). Estes sistemas de entrega deverão ser seguros e bem tolerados após repetições de administração sistémica, de modo a permitir a administração cíclica dos quimiofármacos (Gomes-da-Silva *et al.*, 2012a), de acordo com os protocolos terapêuticos actuais.

A principal limitação da administração intravenosa das nanopartículas é a interação da sua carga positiva com a carga negativa das proteínas do soro, levando à formação de agregados que se acumulam nos pulmões, fígado e baço, sendo rapidamente eliminadas, de seguida, pelo Sistema Reticuloendotelial (SRE) (Abraham *et al.*, 2005, Cuenca *et al.*, 2006).

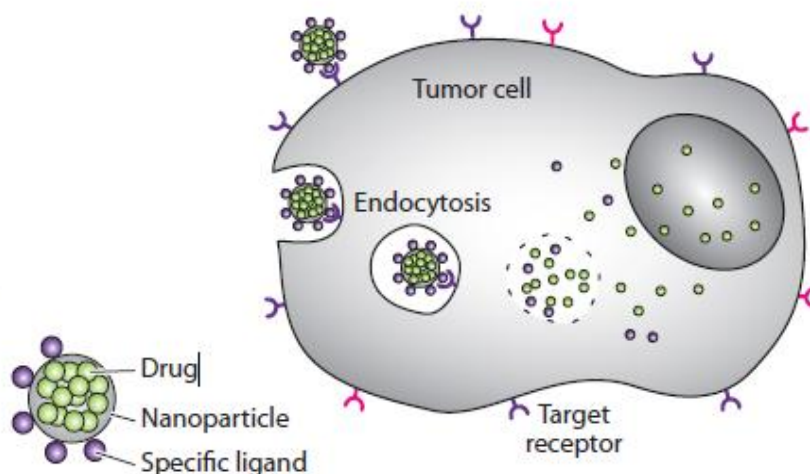
Novas formulações têm sido desenvolvidas com o intuito de modular diferentes propriedades da partícula, adequada à utilização clínica, nomeadamente através da incorporação de derivados lipídicos de poli(etileno glicol) (PEG) na superfície dos lipossomas (Moreira *et al.*, 2001, Sawant *et al.*, 2010). A natureza hidrofílica do PEG permite diminuir a imunogenicidade da partícula lipídica ao permitir “mascarar” a sua superfície, diminuindo a agregação e o reconhecimento daquela pelo Sistema Reticuloendotelial (Ishida *et al.*, 2001, Lasic, 1998, Song *et al.*, 2002) (Figura 1.5.). Permite, ainda, uma estabilização da partícula e uma farmacocinética favorável à acumulação tumoral, melhorando o perfil de biodistribuição dos agentes terapêuticos com a redução das doses a serem administradas (Fonseca *et al.*, 2014, Semple *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 1999).

A funcionalização adicional com ligandos específicos para o tumor, suscetíveis de promover a internalização das nanopartículas mediante interação específica com proteínas de membrana sobreexpressas na superfície das células-alvo tumorais, incluindo as células cancerígenas em circulação, melhora a eficácia destes sistemas de entrega de fármacos

(Malam *et al.*, 2009), otimizando o rácio dos fármacos desde o local de administração até ao sítio-alvo (Moura *et al.*, 2012, Peer *et al.*, 2007, Xing *et al.*, 2012) (Figura 1.6.). Estas nanopartículas aumentam, ainda, o tempo de circulação e semi-vida do fármaco no sangue após a administração sistémica, verificando-se que uma concentração significativa dos lipossomas permanece no sangue 24 h após a administração (Mendonca *et al.*, 2010, Moura *et al.*, 2012).



**Figura 1.5.** Lipossomas com poli(etileno glicol) (PEG) incorporado na sua superfície. Oponinas do sangue são repelidas devido à presença de PEG e das moléculas de água que este atrai em redor da partícula. Uma diminuição da extensão de opsonização dos lipossomas leva, por sua vez, a uma diminuição da extensão de captação de lipossomas pelo Sistema Reticuloendotelial, resultando no aumento do tempo de meia-vida da partícula em circulação (Allen, 1998).



**Figura 1.6.** Terapia direcionada para o tratamento do cancro. A internalização da partícula com o fármaco encapsulado ocorre através da ligação do recetor ao ligando presente na superfície da célula, permitindo a entrega do conteúdo lipossómico intracelularmente. Adaptado de (Koumoutsakos *et al.*, 2013).

#### 1.4.1. Lipossomas sensíveis ao pH

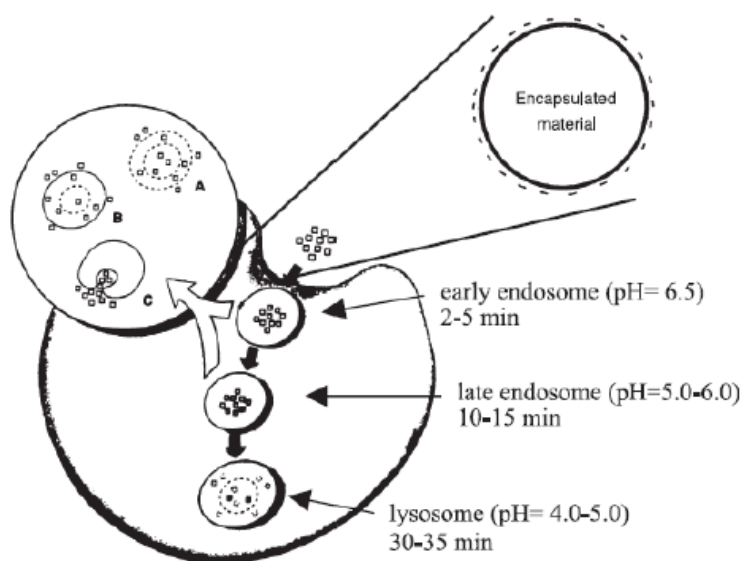
A preparação dos lipossomas pode ser feita de forma a torná-los sensíveis a uma diversidade de estímulos químicos e físicos, nomeadamente à temperatura, luz ou pH, potenciando a sua aplicação terapêutica (Hafez *et al.*, 2000a).

Os lipossomas que podem ser “ativados” e destabilizados para libertar os seus conteúdos em resposta a estímulos de pH são de particular interesse, uma vez que podem responder a ambientes ácidos *in vivo*, como é o caso do microambiente tumoral (Simoes *et al.*, 2004). Lipossomas sensíveis ao pH são constituídos por uma mistura lipídica, contendo o lípido dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) e o lípido colesterol hemissuccinato (CHEMS). O DOPE adota uma estrutura hexagonal invertida e tem a capacidade de permitir o aumento da hidrofobicidade da membrana lipídica, o que favorece as interações com a membrana celular (Cullis *et al.*, 1978, Simoes *et al.*, 2004). Lípidos aniónicos como CHEMS, um éster de colesterol ácido, são frequentemente utilizados com o DOPE com o objetivo de formar partículas sensíveis ao pH (Hafez *et al.*, 2000b). A valores de pH acima de 6,0, aproximadamente, a carga negativa do CHEMS induz a estabilidade do DOPE na bicamada lipídica (Ishida *et al.*, 2001). Contudo, quando há uma diminuição do pH no ambiente celular ocorre a protonação do CHEMS, com redução da estabilidade do DOPE na organização lipídica (Lai *et al.*, 1985). Ou seja, o conjugado CHEMS/DOPE é estável a pH neutro

(incluindo o pH fisiológico 7,35 a 7,45) e básico mas instável a pH ácido (Hafez & Cullis, 2000b). Assim, nestes lipossomas sensíveis ao pH, quando sujeitos ao ambiente ácido da via endocítica, o CHEMS é protonado, o que inicia um comportamento fusogénico da partícula lipídica, levando à libertação intracelular do fármaco encapsulado e ao seu acesso a alvos terapêuticos no citoplasma e no núcleo (Fonseca *et al.*, 2005, Moura *et al.*, 2012). É igualmente devido a esta característica que o lipossoma consegue libertar-se do aprisionamento feito pelo endossoma antes deste se fundir e ser destruído pelo lisossoma (Simoes *et al.*, 2004) (Figura 1.7.).

A utilização do complexo CHEMS/DOPE, bem como o uso de lípidos como DSPC, CHOL e PEG, é frequentemente selecionada para plataformas nanotecnológicas de libertação de agentes terapêuticos devido à favorável retenção do fármaco e razoável tempo de circulação (Fenske & Cullis, 2005).

Verifica-se, assim, que formulações lipídicas sensíveis ao pH são estratégias terapêuticas competentes capazes de aumentar a eficácia do tratamento (Ishida *et al.*, 2001).



**Figura 1.7.** Esquematização do princípio de funcionamento dos lipossomas sensíveis ao pH e funcionalizados com ligandos. Mecanismo de endocitose, seguido de inclusão da nanopartícula nos endossomas numa fase precoce, maturando, posteriormente, em endossomas tardios com diminuição do pH. Tal processo induz a destabilização dos lipossomas direcionados devido ao comportamento fusogénico de CHEMS/DOPE e consequente libertação do seu conteúdo no interior da célula antes de se fundirem com o lisossoma (Simoes *et al.*, 2004).

## 1.4.2. Lipossomas com doxorubicina

Doxorrubicina (DXR) é o fármaco anticancerígeno do grupo das antraciclinas mais comumente utilizado na clínica (Ichikawa *et al.*, 2014), em resultado do seu amplo espectro de atividade e excelente mecanismo de ação antineoplásica contra múltiplos cancros humanos, nomeadamente, no tratamento das leucemias (Diao *et al.*, 2011, Fenske & Cullis, 2005).

As antraciclinas intercalam-se no ácido desoxirribonucleico (ADN) celular e inibem a topoisomerase II, interferindo com a funcionalidade da enzima para religar o ADN (Pinto *et al.*, 2009).

Contudo, a elevada toxicidade do fármaco apresenta-se como uma barreira ao tratamento devido aos efeitos adversos limitantes de dose (Malam *et al.*, 2009) como mielossupressão, toxicidade gastrointestinal, cardiotoxicidade, vômitos e alopecia (Brannon-Peppas & Blanchette, 2004). Em muitos casos, a terapêutica tem de ser descontinuada antes do cancro poder ser erradicado, devido aos efeitos tóxicos severos decorrentes do mesmo (Brannon-Peppas & Blanchette, 2004).

Com o aumento da incidência da resistência à quimioterapia, o uso de lipossomas oferece um tratamento mais efetivo (Malam *et al.*, 2009). Tem sido demonstrado que o fármaco encapsulado em lipossomas, mesmo em concentrações mais reduzidas, tem um índice terapêutico mais elevado, com uma diminuição dos efeitos adversos associados ao agente livre (Fonseca *et al.*, 2005).

Desde o desenvolvimento dos lipossomas no início da década de 80 do século XX, a tecnologia tem feito consideráveis avanços; formulações para o tratamento de diversas doenças atingiram já o mercado (Tabela 1) (Immordino *et al.*, 2006). Formulações lipossómicas de doxorubicina estão atualmente aprovadas para uso humano em cancro da mama metastático, Sarcoma de Kaposi e LMC, nomeadamente o Myocet<sup>®</sup> (aprovado pela EMA- *European Medicines Agency*), Doxil<sup>®</sup> e Marqibo<sup>®</sup> (aprovados pela FDA- *Food and Drug Administration*), respetivamente (Fonseca *et al.*, 2014, Haley & Frenkel, 2008).

**Tabela I.** Formulações lipossômicas comercialmente disponíveis. As formulações aprovadas caracterizam-se por diferirem nos seus constituintes e nas suas aplicações terapêuticas a diferentes doenças. Adaptado de (Immordino *et al.* 2006).

Active agent (product name)	Composition	Stealth	Company, year of product marketing	Application	Trial phase
DaunoXome® (daunorubicin)	DSPC/CHOL	no	Nexstar Pharmaceuticals, 1995	Kaposi's sarcoma	Approved
DOXIL®/Caelyx® (doxorubicin)	SoyHPC/CHOL/DSPE-PEG	yes	Sequus Pharmaceuticals, 1997	Kaposi's sarcoma	Approved
Myocet®/Evacet® (doxorubicin)	EPC/CHOL	no	Elan Pharma, 2000	Metastatic breast cancer	Approved
Depocyt	DOPC/DPPG/CHOL/triolein	no	SkyePharma 1999	Lymphomatous meningitis	Approved
Ambisome® (amphotericin)	SoyHPC/DSPPC/CHOL	no	Fujisawa USA Inc. and Nexstar Pharm 1997	Fungal infections in immuno-compromised patients	Approved

A doxorubicina sob a forma neutra é internalizada nos lipossomas, difundindo-se no interior ácido da vesícula (Gubernator, 2011). Na sequência da criação de um gradiente de sulfato de amónio entre o exterior e o interior dos lipossomas, ocorre uma diminuição dos valores de pH de 7,4 para 5,5, sensivelmente, tornando o ambiente intravesicular ácido mesmo que no exterior dos lipossomas permaneça um pH neutro (Celano *et al.*, 2004). Ao adquirir carga positiva, o agente fica protonado e ocorre a sua precipitação, ficando o mesmo retido no interior hidrofílico do lipossoma, devido à baixa permeabilidade membranar após a entrada do agente, com elevada eficiência de encapsulação e sem difusão do fármaco para o exterior do mesmo (Fritze *et al.*, 2006, Gubernator, 2011, Ishida *et al.*, 2001).

#### 1.4.3. Recetor Nucleolina

A nucleolina é uma proteína multifuncional expressa em células de crescimento exponencial que está envolvida na transcrição, proliferação e crescimento celular (Ginisty *et al.*, 1999, Hovanessian *et al.*, 2010). Esta proteína encontra-se em diversos compartimentos celulares: no nucléolo, onde controla parte do metabolismo do ADN e ARN; no citoplasma onde induz o transporte de proteínas para o núcleo, controlando a regulação pós-transcricional; e na superfície onde funciona como proteína de fixação para diversos ligandos (Hovanessian, 2006, Otake *et al.*, 2007, Storck *et al.*, 2007).



Recentemente, Moura *et al.* (2012) propuseram uma nanopartícula de base lipídica sensível ao pH dirigida para a entrega eficiente de agentes quimioterapêuticos, utilizando o ligando F3 que reconhece especificamente a nucleolina que se encontra sobreexpressa em diversas células cancerígenas, incluindo no cancro da mama, e endoteliais (Fonseca *et al.*, 2014, Moura *et al.*, 2012). A capacidade que este recetor tem em permitir a internalização de moléculas que se ligam a si, faz da nucleolina um alvo potencial e atrativo no desenvolvimento de estratégias terapêuticas anti-tumorais (Christian *et al.*, 2003).

## 1.5. Objetivos

No seguimento do que foi descrito anteriormente, e tendo em conta a necessidade de novas terapêuticas com o intuito de dirigir especificamente os tratamentos apenas a células cancerígenas sem afetar células saudáveis, e sem comprometer a sua eficácia, este trabalho experimental foi realizado com o intuito de desenvolver e caracterizar uma nanopartícula de base lipídica, tendo como alvo células leucémicas (de leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielóide crónica e leucemia mieloblástica aguda de linhagem monocítica).

Com a perspectiva futura de desenvolver uma possível estratégia terapêutica lipossómica para o tratamento das leucemias, este projeto teve como objetivo compreender os mecanismos de associação, internalização e citotoxicidade de uma nanopartícula PEGuilada sensível ao pH, funcionalizada com o peptídeo F3 e contendo doxorubicina. O ligando F3 é um peptídeo de 31 aminoácidos específico para o domínio N-terminal do recetor nucleolina que se encontra sobreexpresso na superfície das células cancerígenas (Barel *et al.*, 2008).

Será expectável que a formulação funcionalizada, composta por lípidos que permanecem estáveis a pH fisiológico ou básico mas que destabilizam a pH ácido, possam aumentar a concentração intracelular do agente quimioterapêutico nas células de leucemia, e, conseqüentemente, aumentar a eficácia da terapêutica.

## 2. Materiais e Métodos

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Materiais

#### 2.1.1. Materiais

Para a preparação da nanopartícula foram utilizados diferentes constituintes lipídicos fornecidos pela empresa Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, EUA).

Os peptídeos NS (ARALPSQRSR) e F3 (KDEPQRRSARLSAKPAPPKPEPKPKKAPAKK) foram obtidos a partir da firma Genecust (Luxemburgo) e o agente quimioterapêutico doxorubicina foi adquirido à IdisPharma (Reino Unido).

#### 2.1.2. Culturas Celulares

As linhas celulares MDA-MB-435s (células de melanoma), CCRF-CEM (células de leucemia linfoblástica aguda), K562 (células de leucemia mielóide crônica), THP-1 (células de leucemia mieloblástica aguda de linhagem monocítica) e MOLT-3 (células de leucemia linfoblástica aguda) foram fornecidas pela *American Type Culture Collection* (Virginia, EUA).

As culturas dos diversos tipos celulares foram preparadas em meio RPMI-1640 (Sigma), suplementado com 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino (FBS) (Invitrogen), 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina. As células foram mantidas a 37°C numa atmosfera húmida a 90%, contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Preparação de lipossomas

#### 2.2.1.1. Ativação dos peptídeos

Para a realização dos estudos, foram preparadas três partículas lipídicas, em duas das quais foi incorporado um peptídeo na superfície dos lipossomas sensíveis ao pH (DOPE:CHEMS:DSPC:CHOL:DSPE-PEG,4:2:2:2:0.8 rácio molar) através do método de pós-inserção (Gomes-da-Silva *et al.*, 2012b, Moreira *et al.*, 2001, Santos *et al.*, 2010).

Inicialmente, procede-se à ativação dos ligandos, não específico (NS) e específico (F3), a partir da tiolação dos peptídeos após reação com o reagente 2-iminotiolano (Sigma) em HBS a pH 8, durante 1 h à temperatura ambiente. Esta metodologia foi realizada por ser descrita como uma das mais eficientes reações de bioconjugação, que resulta numa ligação estável (Fonseca *et al.*, 2005). Após este período de tempo, os peptídeos já tiolados foram

acoplados a micelas de DSPE-PEG-MAL, preparadas previamente a 50 °C, em tampão MES salino pH 6,5. Posteriormente, estes conjugados (peptídeo-micelas) foram deixados a reagir durante 16 - 18 h à temperatura ambiente. As micelas correspondentes aos lipossomas sem ligando foram preparadas utilizando o lípido DSPE-PEG. Após 12 h a 24 h, as diferentes formulações foram sujeitas ao método injeção de etanol (Maurer *et al.*, 2001, Semple *et al.*, 2001), abaixo descrito.

#### 2.2.1.2. Preparação de lipossomas pelo método de Injeção de Etanol e pós-inserção

A mistura lipídica utilizada para a preparação de lipossomas foi preparada através do método de injeção de etanol, caracterizado pela formação das partículas em 40% de etanol e 60% de tampão de sulfato de amônio sob agitação e prévio aquecimento, mantendo, no final, as formulações ressuspendidas em etanol a 60 °C. A utilização de etanol permite uma maior solubilidade lipídica e uma redução do tamanho das partículas, característica fundamental para a utilização da terapia *in vivo* (Semple *et al.*, 2001).

Quarenta microlitros de solução orgânica lipídica foram adicionados ao tampão de sulfato de amônio, gota a gota, sob 30 segundos de vórtex, seguido do aquecimento das formulações a 60 °C durante 1 min. Todo este procedimento foi repetido até que todo o lípido fosse adicionado ao tampão.

Após a adição dos lípidos ao sulfato de amônio, as formulações foram sequencialmente passadas 21 vezes através de membranas de policarbonato de 50 nm de diâmetro de porosidade, utilizando um extrusor LipoFast Basic (Avestin, Canadá) previamente aquecido. Tal extrusão permite obter uma distribuição uniformizada do tamanho das partículas (Semple *et al.*, 2001).

Após a formação dos lipossomas, o tampão foi trocado recorrendo a cromatografia de exclusão molecular através de uma coluna Sephadex G-50 (Sigma), para permitir a encapsulação da doxorubicina.

A doxorubicina foi encapsulada ativamente na ausência de luz, durante 1,5 h a 60 °C (Bolotin *et al.*, 1994). A remoção do fármaco que não foi encapsulado (fármaco livre) foi realizada através de cromatografia de exclusão molecular usando uma coluna G-50 equilibrada com 25 mM de HEPES e 140 mM de NaCl (tampão salino HEPES, HBS), a pH 7,4.

Após a passagem dos lipossomas pela coluna de cromatografia, os lipossomas já formados foram submetidos ao processo de pós-inserção. Este método caracteriza-se pela incorporação dos ligandos à superfície dos lipossomas a 50 °C em todas as formulações

preparadas, com uma proporção lípido total/conjugado de 2 mol%. Os lipossomas não direcionados, embora sem peptídeo, foram também sujeitos a 1 h de incubação à mesma temperatura.

## 2.3. Caracterização de Lipossomas

### 2.3.1. Tamanho, Índice de Polidispersão e Eficiência de encapsulação

A média do diâmetro dos lipossomas preparados, bem como o Índice de Polidispersão, foi determinada por *dynamic light scattering* usando o analisador de tamanhos N5 (Beckman Coulter, Califórnia, EUA).

A fim de aferir a concentração final de lípido, foi quantificado o fosfolípido colina através do *kit Phospholipids C* (Wako Chemicals, EUA).

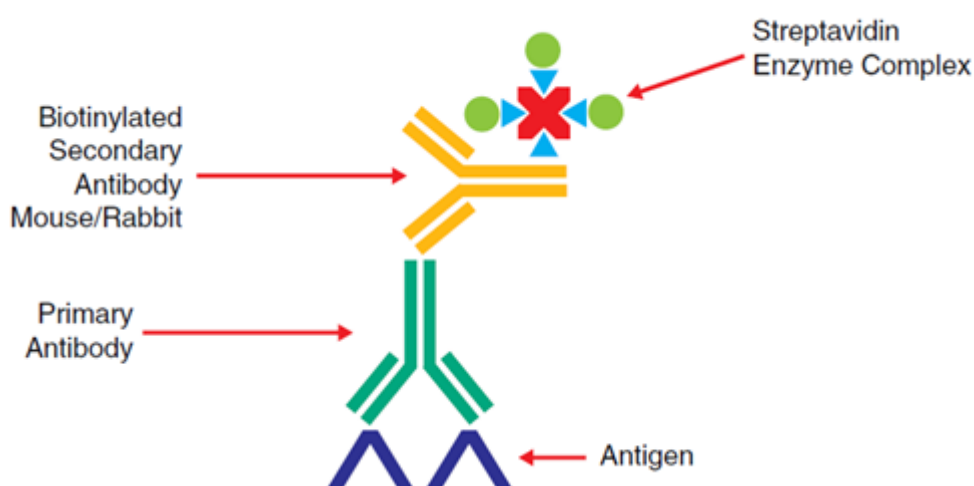
A absorvância do fármaco encapsulado foi determinada a 492 nm por interpolação em curva padrão sob solubilização dos lipossomas em 90% de etanol absoluto, de forma a determinar a eficiência de encapsulação (%) através da equação:  $[(\text{Fármaco/LT})_{\text{final}}/(\text{Fármaco/LT})_{\text{inicial}}] \times 100$ .

### 2.3.2. Estudos de Imunocitoquímica

Com o intuito de verificar a presença da nucleolina nas células utilizadas, realizaram-se ensaios de imunocitoquímica para três das linhas celulares de leucemia (CCRF-CEM, K562 e THP-1). Para tal, 500 000 células de cada linha foram preparadas em meio de cultura sem soro, até atingirem 80%-90% de confluência, em placas de cultura de 12 poços previamente revestidos com gelatina 0,1% (Sigma, G1890-100G), para potenciar a adesão das células. Posteriormente, as células foram fixadas com etanol a 96% para permitir a aplicação do método de marcação com estreptavidina biotina (LSAB) (Kammerer *et al.*, 2001). Inicialmente foi adicionado peróxido de hidrogénio 3% durante 15 min, seguido de 5 min com soro de cabra (Ultravision Protein Block -125 mL- TA-125-PBQ, Kit ThermoScientific). Ao anticorpo primário monoclonal (anticorpo de ratinho anti-nucleolina humana- Bond Primary Antibody Diluent - 500 mL - AR9352, Leica Bond- diluição de 1:50 por lâmina) foi de seguida adicionado o anticorpo secundário biotilado (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent - 125 mL - TP-125-BNK, Kit ThermoScientific) durante 15 min e, logo após, a estreptavidina-peroxidase (Streptavidin Peroxidase - 125 mL - TS-125-HR) também durante 15 min. Foi adicionado o revelador colorimétrico 3,3'-diaminobenzidina (DAB- Novocastra DAB

Substrate Buffer - 30 mL - RE7106; Novocastra DAB Chromogen - 30 mL - RE7105, Leica Microsystems) durante 5 min e contrastado com hematoxilina, permitindo a detecção do complexo anticorpo-antigénio.

As imagens de microscopia foram obtidas utilizando um microscópio ótico composto com uma câmara digital DXM 1200F (Nikon, Germany) com uma ampliação de 400×, detetando o complexo anticorpo-antigénio por *bright field microscopy*, e utilizando um microscópio morfológico Carl Zeiss Axioskop 2 plus, com objetiva Plan-Neofluar de ampliação 40×/1.25.



**Figura 2.1.** Reação entre anticorpo-antigénio visualizado em imunocitoquímica por microscopia por aplicação do revelador clorimétrico DAB. Ao antígeno de interesse, neste caso a nucleolina, é adicionado o anticorpo primário, seguido do anticorpo secundário biotilado. É adicionado, posteriormente, o complexo estreptavidina-peroxidase que se liga à biotina do anticorpo secundário, visualizando-se a presença da proteína. Adaptado de (Kumar *et al.*, 2009).

### 2.3.3. Estudos de entrega intracelular por citometria de fluxo

Duzentas mil células das linhas celulares MDA-MB-435s, CCRF-CEM, K562, THP-1 e MOLT-3 foram incubadas em tubos de citometria a 4°C e a 37°C, durante 1 h, com lipossomas não direcionados e direcionados sensíveis ao pH com 0,4 mM de lípido total, marcados com rodamina-PE (Rhod-PE) (0,78 mM) (Avanti Polar Lipids).

Após a hora de incubação, as células foram centrifugadas a 300 g durante 5 min e lavadas com 500 µL de tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4), novamente centrifugadas durante 5 min a 300 g e lavadas, pela segunda vez, com 300 µL de PBS. Imediatamente

depois, as células foram analisadas por citometria de fluxo, utilizando um citómetro FACScalibur (BD Biosciences).

A fluorescência correspondente à RhoD-PE foi avaliada por FL2, num total de 20 000 eventos registados. Os resultados obtidos foram analisados pelo software CellQuest Pro (BD Biosciences) e normalizados contra células não sujeitas a incubação com lipossomas. Os resultados foram ainda comparados com células da linha MDA-MB-435s usadas como controlo positivo nos ensaios com os lipossomas preparados.

#### **2.3.4. Estudos de Viabilidade Celular**

De forma a avaliar as diferentes subpopulações existentes nas linhas celulares, 200 000 células foram incubadas com lipossomas sem doxorrubicina, duplamente marcados com RhoD-PE e 7-aminoactinomicina D (7-AAD) (Sigma) (Santos *et al.*, 2008). Controlos celulares não incubados com lipossomas e sem terem sido sujeitos à execução do protocolo, também marcados com 7-AAD, foram utilizados como controlo para identificar as diferentes populações e a respetiva taxa de morte verificada nos ensaios de citometria de fluxo (Zembruski *et al.*, 2012).

O 7-AAD é um composto fluorescente que se intercala no ADN de células com a membrana celular danificada ou permeabilizada, permitindo a deteção da perda da integridade membranar associada aos eventos de morte celular, quer seja por apoptose precoce ou tardia, quer por necrose (Khan *et al.*, 2005, Lecoeur *et al.*, 2001, Mancuso *et al.*, 2009, Zembruski *et al.*, 2012). O seu nível de incorporação depende da extensão da alteração da membrana durante o processo de morte celular, sendo que, quanto maior o grau de destruição e consequente permeabilização da membrana, maior são os níveis de 7-AAD no interior da célula (Lecoeur *et al.*, 2001).

#### **2.3.5. Estudos de Citotoxicidade**

De forma a avaliar a capacidade citotóxica de cada uma das formulações com o fármaco encapsulado, foram realizados estudos de citotoxicidade. Neste ensaio, procedeu-se à incubação das linhas celulares com diferentes concentrações de doxorrubicina encapsulada nas partículas lipídicas (10 µM; 2,5 µM; 0,625 µM; 0,156 µM; 0,039 µM; 0,00976 µM; 0,00244 µM; 0,000610 µM; 0,000153 µM). Neste sentido, de acordo com as curvas de crescimento determinadas para cada linha celular, 32 000 células CCRF-CEM, 14 000 células K562 e 32



000 células THP-1 foram incubadas quer com lipossomas direcionados com os ligandos NS e F3, quer com lipossomas não direcionados durante 1, 4 e 24 h. Após os respetivos tempos de incubação, o meio de cultura das células foi renovado com novo meio, sem lipossomas, e as células foram mantidas até 96 h (no caso das linhas CCRF-CEM e K562) e 144 h (para a linha THP-1), para que completassem 3 a 4 ciclos de crescimento celular após as incubações.

Após este período de tempo, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de resazurina (Alamar Blue), a qual é reduzida apenas pelas células metabolicamente ativas, permitindo avaliar a função metabólica celular e a citotoxicidade induzida pelo fármaco (O'Brien *et al.*, 2000, Pinto *et al.*, 2009, Rampersad, 2012). A absorvância das microplacas foi medida a 570-600 nm, permitindo a elaboração de curvas de dose-resposta.

### 2.3.6. Análise Estatística

Os dados foram analisados através do cálculo da média  $\pm$  SEM e as diferenças estatísticas foram avaliadas por análise de variância (*one-way* ou *two-way* ANOVA), constando os níveis de significância nas respectivas figuras (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). Considerou-se como estatisticamente significativo um valor de  $p < 0,05$ .

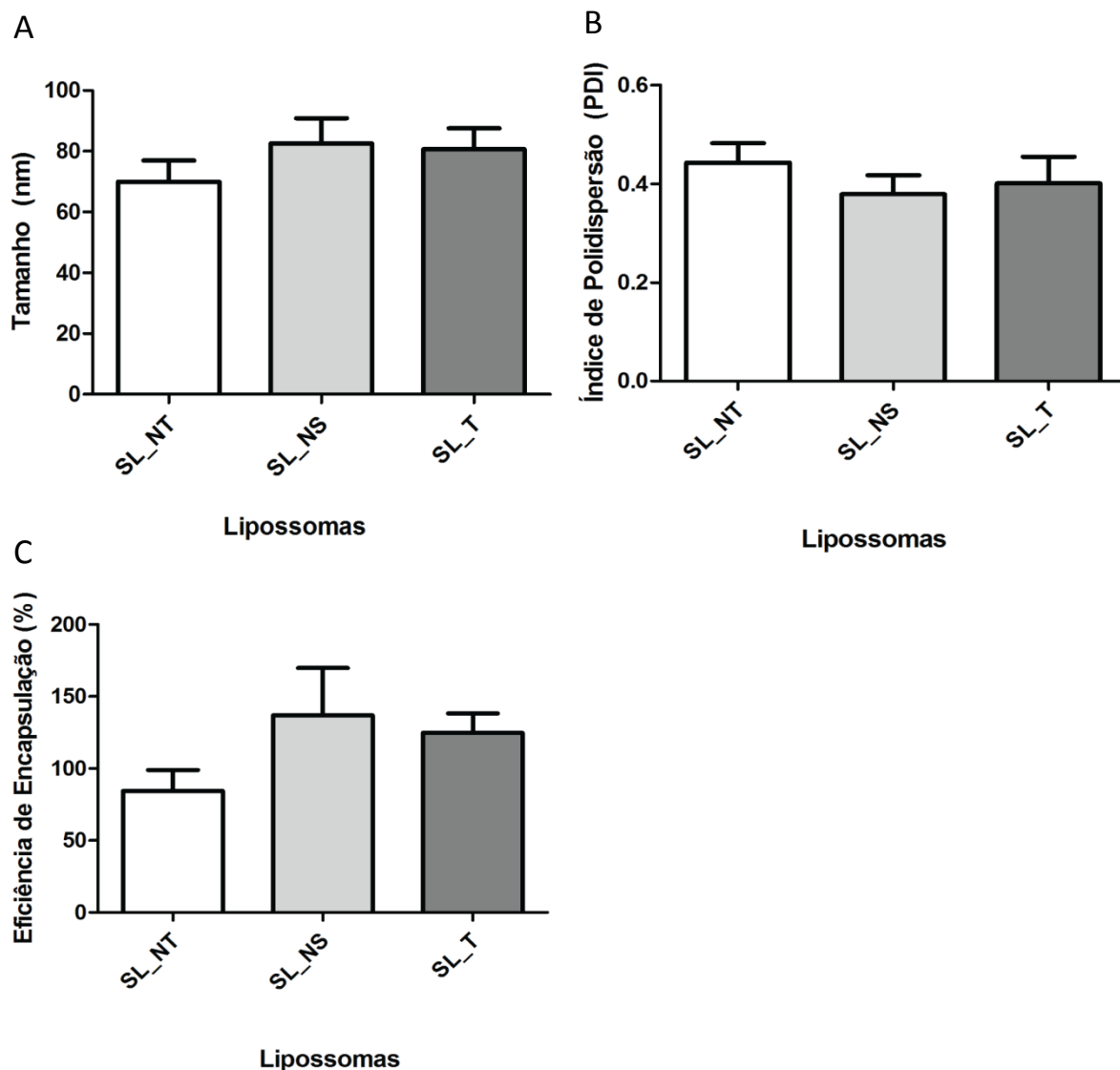
## **3. Resultados e Discussão**

### 3.1. Caracterização das propriedades físico-químicas das nanopartículas

Segundo os resultados verificados na Figura 3.1.A, o tamanho médio das três formulações varia entre 70 a 90 nm, sensivelmente, sendo que a partícula lipídica sem ligando (lipossomas SL\_NT) apresenta um tamanho ligeiramente inferior comparativamente aos lipossomas sem ligando específico (SL\_NS) e aos lipossomas direcionados especificamente (SL\_T). O menor tamanho associado aos lipossomas não vetorizados estará associado à ausência de ligando na superfície da partícula lipídica. Contudo, apesar dos tamanhos variarem ligeiramente entre as três formulações, as diferenças não são estatisticamente significativas e todas elas apresentam um tamanho inferior a 100 nm, o que representará uma vantagem terapêutica comparativamente a partículas de maiores dimensões (>200 nm) quanto à administração sistêmica (Fenske & Cullis, 2005, Simoes *et al.*, 2004).

Está descrito que o método por injeção de etanol tem um impacto na média final do tamanho das partículas, proporcionando uma redução significativa do mesmo (Semple *et al.*, 2001) e, após a utilização deste método, os nossos resultados pareceram confirmar a sua utilidade.

No que diz respeito ao índice de polidispersão (Figura 3.1.B), que reflete a heterogeneidade das amostras quanto ao tamanho dos lipossomas preparados, verifica-se não existirem diferenças significativas entre as 3 formulações lipossômicas. No entanto, é possível observar um ligeiro aumento da heterogeneidade referente à formulação SL\_NT. Isto poderá indicar que as duas restantes formulações, ambas vetorizadas, poderão apresentar uma estabilidade adicional e superior devido à presença dos peptídeos NS e F3, o que lhes poderá possivelmente permitir, comparativamente a partículas sem ligando, adquirir uma maior homogeneidade lipídica quanto ao tamanho.



**Figura 3.1.** Caracterização físico-química das nanopartículas não funcionalizadas (SL\_NT), funcionalizadas com peptídeo não específico (SL\_NS) e com o peptídeo F3 (SL\_T), contendo doxorrubicina. (A) Representação do tamanho médio (nm) de nanopartículas lipídicas preparadas pelo método de injeção de etanol descrito em Materiais e Métodos. (B) Índice de Polidispersão (PDI) como medida de homogeneidade de tamanho das nanopartículas. (C) Eficiência de encapsulação (%) da doxorrubicina em cada uma das três formulações (não vetorizada e vetorizadas com ligando). Os dados estatísticos são referentes à média  $\pm$  SEM de 3 experiências independentes. *One-way ANOVA* foi o teste estatístico utilizado. Nenhuma das diferenças observadas foram estatisticamente significativas.

Pela observação do gráfico da Figura 3.1.C verifica-se que a eficiência de encapsulação do fármaco no interior dos lipossomas é ligeiramente diferente entre as três formulações, embora, também, sem diferenças consideráveis e significativas.

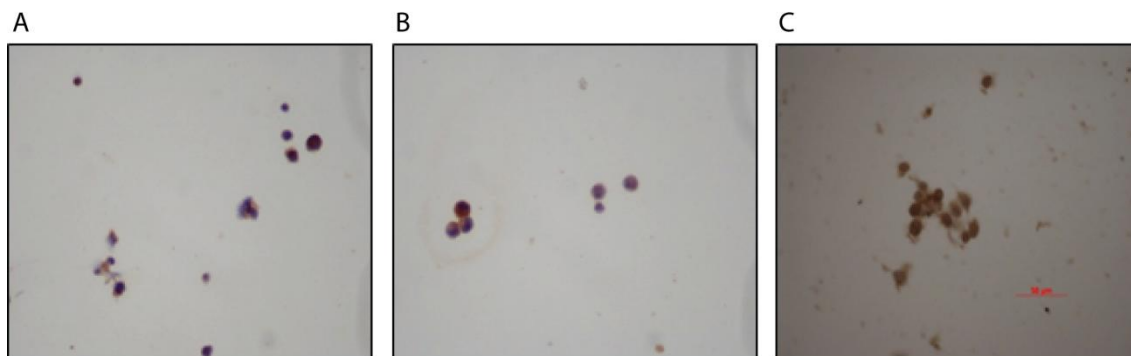
### 3.2. Estudos de Imunocitoquímica nas linhas celulares de leucemia

A imunocitoquímica constitui uma importante ferramenta que permite a visualização da morfologia celular individual e uma localização *in situ* de proteínas sub-celulares (Paciorek *et al.*, 2006, Sauer *et al.*, 2006). Embora apresente algumas limitações, esta técnica alcança uma sensibilidade semelhante à citometria de fluxo por proporcionar uma deteção amplificada, simples e direta, sendo estas duas técnicas complementares (Risberg *et al.*, 2000).

Para comprovar a presença da nucleolina, realizaram-se estudos de imunocitoquímica nas células CCRF-CEM, K562 e THP-I. Confirmou-se a presença da proteína nestas linhas celulares leucémicas (demarcada com cor mais escura acastanhada), como é possível verificar nas imagens abaixo representadas (Figura 3.2.).

Apesar de confirmada a presença da nucleolina no citoplasma e núcleo, a presença deste recetor à superfície celular torna-se difícil de validar. No entanto, a ausência ou a reduzida observação da nucleolina na membrana não é indicador de que esta não possa estar presente na superfície celular, uma vez que este recetor caracteriza-se pela sua capacidade de se deslocar entre os diferentes compartimentos da célula, nomeadamente entre a superfície e o núcleo (Christian *et al.*, 2003, Said *et al.*, 2002, Shibata *et al.*, 2002), estando presente à superfície durante apenas uma fração da sua semi-vida (Hovanessian *et al.*, 2010).

Adicionalmente, as técnicas de imunocitoquímica não são específicas para a deteção de proteínas à superfície celular, visto que a fixação das células pode ter sido feito no momento em que a nucleolina não estivesse disponível em quantidades suficientes à superfície celular para que fosse possível a sua deteção.



**Figura 3.2.** Observação da expressão do recetor nucleolina em linhas celulares leucémicas, por imunocitoquímica. De forma a verificar a existência do recetor nucleolina nas linhas celulares CCRF-CEM (A), K562 (B) e THP-I (C), 500 000 células foram preparadas. De seguida, procedeu-se ao bloqueio, à incubação com os anticorpos primário e secundário e, por fim, à revelação da reação entre anticorpo-antígeno, utilizando um composto colorimétrico (DAB). A visualização da proteína foi observada através de um microscópio ótico composto (400 ×) para as linhas CCRF-CEM e K562 e de um microscópio morfológico (40×) para a linha THP-I.

Nos nossos ensaios, embora não seja possível quantificar a nucleolina nos diferentes compartimentos nas três linhas, foi possível detetá-la qualitativamente, o que permitiu avançar para a realização dos estudos de associação celular.

### 3.3. Estudos de associação celular por citometria de fluxo

Os estudos de associação celular foram realizados com o intuito de se analisar a entrega intracelular das nanopartículas produzidas. As células foram incubadas durante 1 h com as diferentes formulações sem fármaco, de forma a avaliar se a presença do peptídeo F3 à superfície das nanopartículas e se a utilização de diferentes peptídeos (NS e F3) altera a especificidade para as diferentes linhas celulares leucémicas.

Nestes estudos de associação celular avaliou-se não só a ligação dos lipossomas à superfície da célula mas também a sua internalização pela análise da fluorescência da sonda de rodamina-PE (RhoD-PE) que se insere na bicamada lipídica dos lipossomas. A distinção entre estes dois mecanismos confirma-se pela diferença verificada nos resultados obtidos quanto aos valores do sinal de fluorescência da RhoD-PE nas experiências realizadas a duas diferentes temperaturas: 4 °C e 37 °C. Como se sabe, os mecanismos biológicos,

nomeadamente os de endocitose mediados por recetores (mecanismo pelo qual a partícula internaliza na célula), estão inativos a 4 °C e, como tal, ocorre apenas a ligação da partícula à célula (Moura *et al.*, 2012). Pelo contrário, a 37 °C a maquinaria celular está normalmente ativa e ocorre a ligação bem como a internalização do lipossoma no interior da célula, o que sugere que este processo ocorre de uma forma dependente de energia (Gomes-da-Silva *et al.*, 2012b, Moura *et al.*, 2012).

Desta forma, tentou determinar-se se a variação na constituição das partículas desenvolvidas poderia influenciar a ligação e entrada dos lipossomas em cada uma das linhas celulares: CCRF-CEM, K562, THP-1 e MOLT-3. Como controlo, foram utilizadas células MDA-MB-435s (células de melanoma) por demonstrarem ser uma linha com uma extensa internalização celular (Gomes-da-Silva *et al.*, 2012b, Moura *et al.*, 2012).

Como se pode observar no gráfico da Figura 3.3., os valores do sinal de fluorescência da RhoD-PE são, de uma forma geral, ligeiramente mais baixos a 4 °C que a 37 °C devido às razões anteriormente mencionadas.

À exceção da linha MDA-MB-435s (Figura 3.3.A), caracterizada pela elevada expressão de nucleolina à superfície da célula, as linhas CCRF-CEM ( $p < 0,05^*$ ) (Figura 3.3.B), THP-1 ( $p < 0,001^{**}$ ) (Figura 3.3.D) e MOLT-3 ( $p < 0,001^{**}$ ) (Figura 3.3.E) são as que apresentam uma internalização da nanopartícula significativamente maior a 37°C quando incubadas com os lipossomas SL\_T, comparativamente às incubações com lipossomas SL\_NT e SL\_NS. Já a linha K562 (Figura 3.3.C) não demonstraram aumento da internalização com os mesmos lipossomas.

Pelos dados obtidos, percebe-se a existência de diferenças quanto à utilização de um ligando não específico e de um ligando específico, como é o caso do peptídeo F3. Os dois peptídeos apresentam especificidades diferentes, sendo que a associação celular é maior quando utilizados lipossomas com ligando F3 (SL\_T), o qual demonstra ser mais específico para o recetor nucleolina presente nas células leucémicas, de que resulta uma maior extensão da internalização celular da nanopartícula correspondente.

A diferença de valores que se observa entre as linhas celulares, no que diz respeito às incubações com lipossomas SL\_T, poderá estar relacionada com a expressão do recetor nucleolina à superfície de cada tipo celular. Perante os resultados adquiridos, o maior valor de fluorescência de RhoD-PE atribuída às células THP-1, MOLT-3 e CCRF-CEM poderá relacionar-se com o facto destas três linhas celulares apresentarem uma maior sobre-expressão do recetor comparativamente às células K562. Este facto poderá ter reflexos na eficácia do tratamento com nanopartículas dirigidas para nucleolina na leucemia mielóide

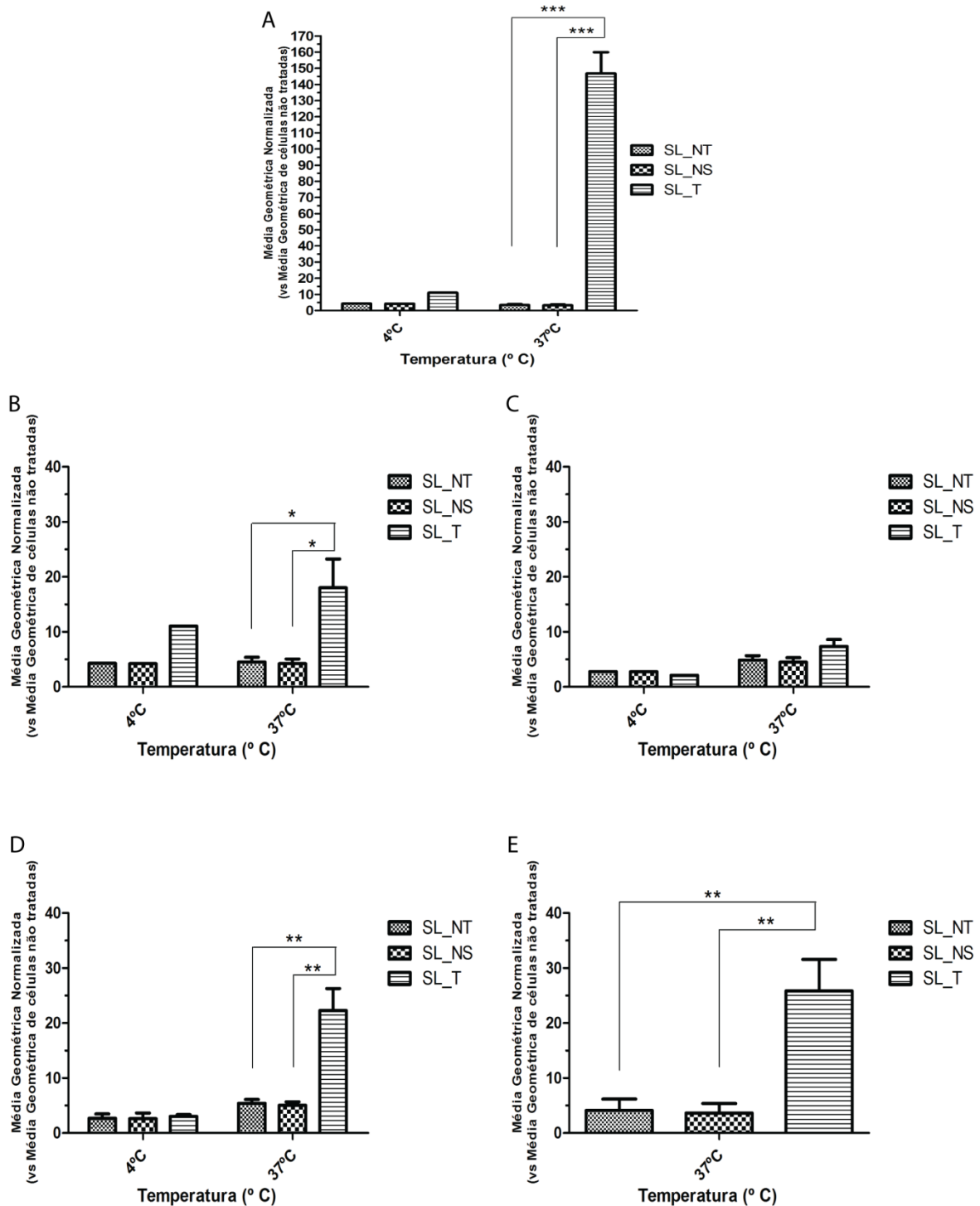
crónica. De facto, segundo Soundararajan *et al.* (2009), as células K562 apresentam uma expressão diminuída da nucleolina à sua superfície e, como tal, menor poderá ser a ligação dos lipossomas à membrana celular e, conseqüentemente, a sua internalização no citoplasma da célula leucémica (Soundararajan *et al.*, 2009).

Outras hipóteses podem explicar a diminuída internalização das nanopartículas na linha K562. Para além das possíveis variações na expressão e na presença da nucleolina nas células, a própria especificidade do peptídeo F3 poderá contribuir para os resultados verificados, uma vez que a sua especificidade poderá variar de acordo com as linhas utilizadas (Moura *et al.*, 2012). Moura *et al.* (2012) também comprovaram a diferença de expressão da nucleolina em diferentes células utilizadas nos seus estudos, tendo-se observado uma sobreexpressão do recetor nas linhas celulares cancerígenas MDA-MB-435s, MDA-MB\_231 e Hs578T e uma reduzida expressão em linhas T47D e MCF-7 (Moura *et al.*, 2012).

Também o facto de poder ocorrer uma rápida saturação dos recetores à superfície por ligação à nanopartícula, uma vez que a sua presença se encontra diminuída, juntamente com um tempo reduzido da presença da proteína na superfície da célula poderá, eventualmente, impedir uma internalização significativa. Segundo Hovanessian *et al.* (2010) a semi-vida da nucleolina à superfície celular nalgumas células cancerígenas é de, aproximadamente, 45 min enquanto que no núcleo é possível detetar a sua presença durante cerca de 8 h (Hovanessian *et al.*, 2010). Possivelmente para esta linha celular poderá ocorrer algo semelhante e, como tal, haverá uma menor captação da nanopartícula para o interior da célula, uma vez que a disponibilidade da nucleolina na membrana celular poderá ser reduzida após saturação e internalização.

Ainda uma outra hipótese para a baixa eficiência da internalização das formulações SL\_T neste tipo de células poderá relacionar-se com mecanismos moleculares intracelulares que regulam a expressão da nucleolina à superfície. Segundo Payne & Dovat (2014) e Yamada *et al.* (2014), algumas proteínas presentes nas células de leucemia mielóide crónica têm a capacidade de ser ligar à nucleolina, causando a sua retenção no citosol e bloqueando tanto as suas funções pró-proliferativas no núcleo, como a sua expressão à superfície celular (Payne *et al.*, 2014, Yamada *et al.*, 2014).





**Figura 3.3.** Estudos de associação celular de lipossomas funcionalizados (SL\_NS e SL\_T) e não funcionalizados com diferentes linhas celulares de melanoma ((A) MDA-MB-435) e de leucemia ((B) CCRF-CEM; (C) K562; (D) THP-1; (E) MOLT-3). Para a realização dos estudos de entrega intracelular da partícula lipídica, 200 000 células foram incubadas com lipossomas a uma concentração de 0,4 mM de lípido total, marcados com rodamina-PE (RhoD-PE), a 4 °C e a 37 °C, durante 1 h. Os dados representam a média  $\pm$  SEM, em que  $p < 0,001^{**}$  e  $p < 0,05^*$  representam a significância estatística obtidas a partir do teste estatístico two-way ANOVA. Para a todas as linhas,

foram feitas 3 ou mais experiências independentes a 37 °C. Para as linhas MDA-MB-435s, CCRF-CEM e K562 foi feita apenas uma experiência a 4 °C; para as linhas THP-1 e MOLT-3, foram feitas 2 experiências à mesma temperatura.

Os resultados obtidos nas nossas experiências sugerem que, à exceção das células K562, a presença do peptídeo F3 poderá trazer um ganho importante na quimioterapêutica lipossômica e, portanto, que se torna necessária e vantajosa uma terapêutica direcionada e específica para células cancerígenas de forma a aumentar a eficácia do tratamento.

### **3.3.1. Estudos de associação celular de diferentes subpopulações**

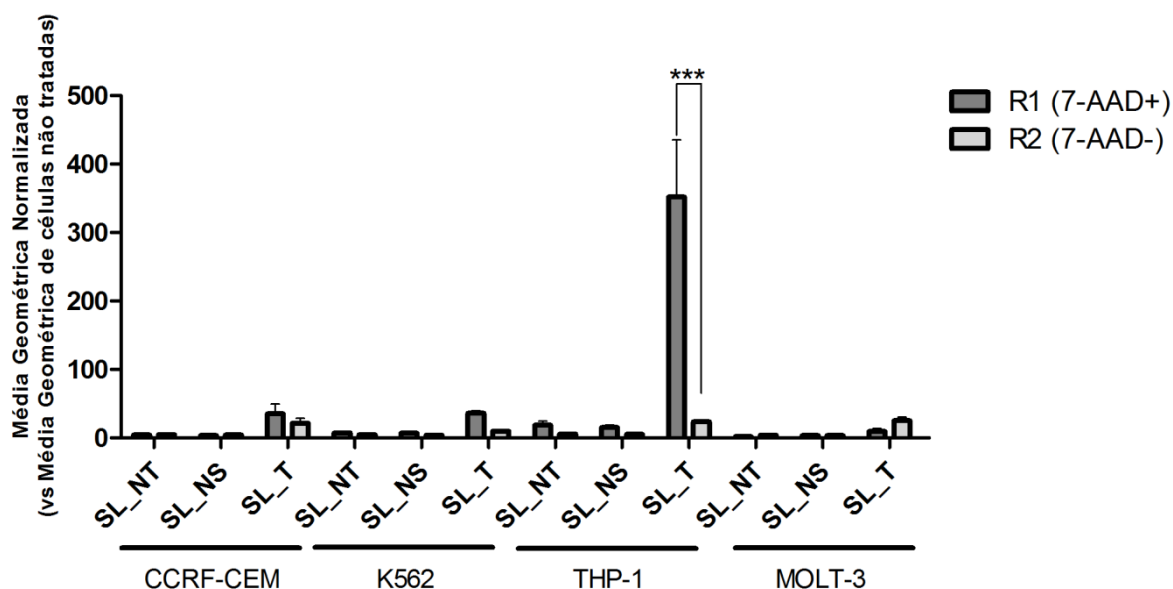
No decorrer dos estudos de associação celular, foi verificada em todas as linhas a presença de duas subpopulações celulares com características distintas quanto ao seu tamanho e complexidade citoplasmática, interpretadas como correspondendo a uma subpopulação de células vivas e a uma subpopulação de células mortas, sendo que as células aparentemente não viáveis pareciam possuir um sinal de fluorescência de RhoD-PE superior ao emitido pelas células viáveis. Para clarificar estes resultados, foram realizados ensaios de associação celular analisando separadamente as duas subpopulações.

Como é demonstrado no gráfico da Figura 3.3.1., as células consideradas não viáveis, em virtude da elevada expressão de 7-AAD (R1), das linhas CCRF-CEM, K562 e MOLT-3 não apresentaram um aumento significativo de internalização após a incubação com a formulação SL\_T, quando comparada com a internalização induzida pelas duas restantes formulações lipídicas. Pelo contrário, nas células da linha THP-1 observou-se uma associação celular marcadamente aumentada com a incubação com lipossomas específicos. Tais resultados poderão indicar que existe, nesta linha (THP-1), uma subpopulação que apresenta uma maior sobreexpressão do recetor nucleolina. Nenhuma das subpopulações celulares consideradas viáveis pela ausência de marcação pelo 7-AAD (R2) das restantes linhas apresentou um valor tão elevado do sinal de associação celular como o observado na subpopulação não viável da linha THP-1.

Recordando que os lipossomas usados nestas experiências não continham fármaco, foi colocada a hipótese de que algumas subpopulações presentes nas linhas celulares poderiam estar a internalizar a nanopartícula numa extensão superior do que outras subpopulações e que, após a endocitose, estas células poderiam ter entrado em apoptose

por elevada sensibilidade aos lípidos constituintes dos lipossomas ou, até mesmo, aos procedimentos inerentes aos ensaios de associação celular.

Assim, estudou-se, em seguida, o impacto da nanopartícula livre de fármaco sobre a viabilidade celular.



**Figura 3.3.1.** Estudos de associação celular das subpopulações observadas nas linhas celulares de leucemia. Para avaliar o comportamento entre as populações consideradas não viáveis, positivas para 7-AAD (R1), e viáveis, negativas para 7-AAD (R2), presentes em todas as linhas celulares (CCRF-CEM, K562, THP-1 e MOLT-3), foram incubadas 200 000 células com lipossomas não vetorizados (SL\_NT) e vetorizados (SL\_NS e SL\_T) sem fármaco encapsulado. A incubação decorreu durante 1 h a 37 °C. Foram feitas, para todas as linhas, entre 4 a 6 experiências a 37°C. Os dados apresentados no gráfico representam a média  $\pm$  SEM, no qual  $p < 0,001$ \*\*\* reproduz a significância estatística. *Two-way ANOVA* foi o teste estatístico utilizado. Como controlo, foram usadas células não incubadas com lipossomas. R1- células consideradas não viáveis pela sua elevada expressão de 7-AAD. R2- células consideradas viáveis pela ausência de marcação pelo 7-AAD.

### 3.4. Estudos de análise do impacto da nanopartícula na viabilidade celular

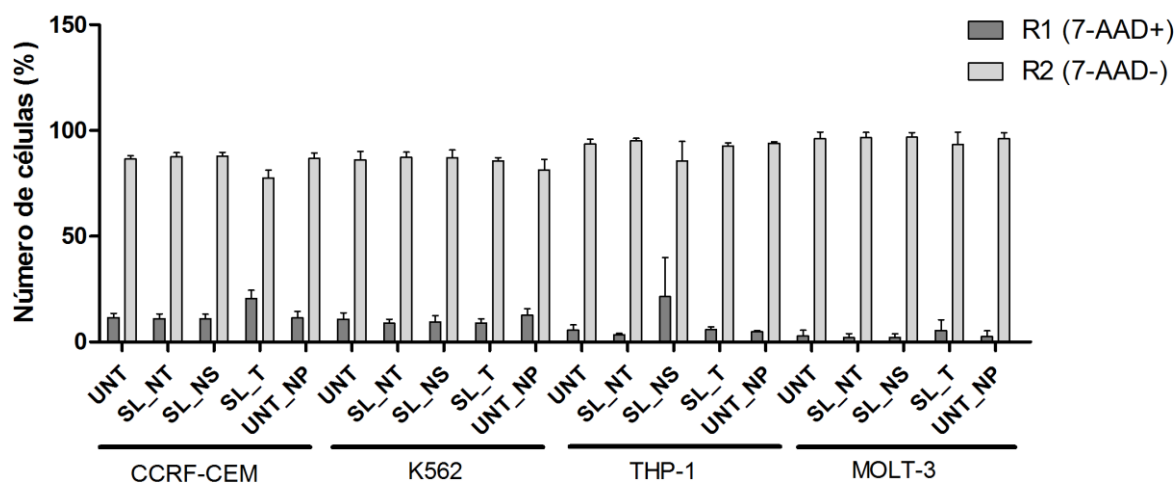
Como descrito acima, no decorrer da realização dos ensaios de citometria de fluxo, observou-se a existência de duas subpopulações distintas de células em cada uma das linhas celulares. Tal como está demonstrado na Figura 3.3.1., as subpopulações caracterizadas como não viáveis foram as que apresentaram um maior sinal de fluorescência de RhoD-PE, embora nem sempre de forma significativa, em resultado, possivelmente, de uma maior

ligação da partícula. Considerando que as células não viáveis exibiram uma maior extensão de internalização da nanopartícula, e que as células consideradas viáveis apresentaram uma menor internalização, poder-se-ia estar perante uma citotoxicidade provocada pelos próprios lipossomas (pelos lípidos e/ou pelo ligando e/ou pela rodamina-PE), após a entrada das nanopartículas nas células consideradas não viáveis. Por outro lado, os métodos de preparação celular do protocolo experimental poderiam induzir uma suscetibilidade maior à morte celular. Tornou-se, assim, necessário compreender o mecanismo de morte celular ocorrida.

Efetuarão-se ensaios com 7-AAD, comparando células não incubadas com lipossomas, células incubadas com as 3 formulações, sem encapsulação do agente terapêutico, e células não sujeitas aos procedimentos experimentais.

De acordo com a Figura 3.4., não se verificam diferenças significativas em termos de morte celular em nenhuma das linhas entre as amostras não sujeitas a incubação com as partículas lipídicas (UNT), incubadas com lipossomas sem citostático (SL\_NT, SL\_NS e SL\_T) e não sujeitas a protocolo (UNT\_NP). Tais resultados indicam que a morte observada por citometria de fluxo não se deve nem a uma eventual citotoxicidade lipídica induzida pelos lipossomas, nem ao manuseamento experimental. Foi demonstrada a existência de subpopulações caracterizadas como não viáveis (R1) em percentagem sempre significativamente inferior às viáveis (R2) em todas as amostras celulares, não aumentando com nenhuma das diferentes condições a que as células foram sujeitas nesta experiência.

Uma vez que ficou demonstrado que a constituição da nanopartícula e o procedimento experimental não afetaram a viabilidade celular, a elevada fluorescência de RhoD-PE verificada nas subpopulações não viáveis, em particular na linha THP-I, poderá estar relacionada com o mecanismo de morte celular, o qual poderá induzir uma exposição elevada da nucleolina à superfície das células ou intracelularmente, após ruptura da membrana. Ao haver uma elevada exposição dos recetores com a lise celular, estes estariam mais disponíveis para que houvesse uma maior ligação da partícula. Desta forma, poder-se-á estar perante um mecanismo de morte celular e não perante um aumento de internalização da nanopartícula dirigida, como foi presumido inicialmente.



**Figura 3.4.** Estudo de viabilidade celular utilizando 7-aminoactinomicinaD (7-AAD) como marcador nuclear de necrose celular. Duzentas mil células foram preparadas e incubadas durante 1 h a 37 °C sem fármaco encapsulado. Após o tempo de incubação e de adicionado o marcador 7-AAD, as amostras foram imediatamente analisadas por citometria de fluxo. Foram realizadas 3 ou mais experiências para cada uma das linhas, à exceção da linha MOLT-3 em que foram efetuados 2 ensaios. Como controlo, foram utilizadas amostras de células sem que tenham sido sujeitas a incubação com lipossomas e ao processo experimental. Os dados obtidos representam a média  $\pm$  SEM. A diferença estatística entre R1 e R2, resultante do teste *two-way ANOVA*, foi significativa ( $p < 0,001$ ). UNT, SL\_NT, SL\_NS, SL\_T e UNT\_NP correspondem às células não sujeitas a incubação, a células incubadas com lipossomas não direcionados, células incubadas com lipossomas vetorizados com ligando não específico, células incubadas com lipossomas vetorizados com peptídeo específico e células não sujeitas ao processo de experimentação, respetivamente. R1 corresponde às subpopulações não viáveis, e R2 corresponde às subpopulações viáveis.

### 3.5. Estudos de citotoxicidade celular utilizando as formulações lipossômicas com doxorubicina encapsulada

#### 3.5.1. Linha celular CCRF-CEM

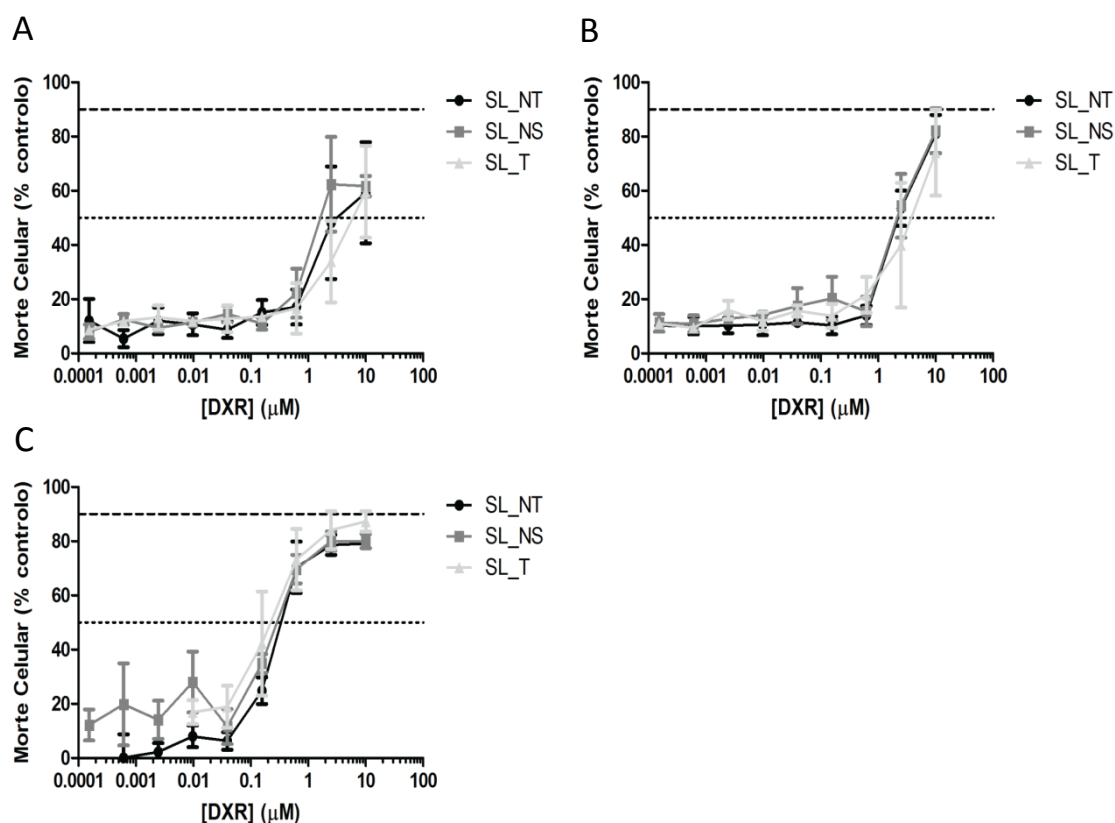
Com o intuito de se avaliar o efeito do fármaco encapsulado nas nanopartículas na proliferação celular, células na fase de crescimento exponencial foram incubadas com diferentes concentrações de fármaco, com diferentes tempos de incubação.

Os resultados representados na Figura 3.5.1. A mostram que, após 1 h de incubação das células com o fármaco, a taxa de morte provocada pela partícula não direcionada e pelas partículas vetorizadas com ligandos é semelhante. Em diversas concentrações de fármaco, nomeadamente a 2,5  $\mu\text{M}$  e a 10  $\mu\text{M}$ , verifica-se a existência de desvios-padrão mais

demarcados que poderão também indicar a existência de alguma variabilidade quanto ao comportamento associado a este tipo de células após a incubação com as três partículas lipídicas, o que impede verificar quaisquer possíveis diferenças que poderiam ocorrer. Apesar da variabilidade estatística observada, os dados parecem demonstrar que a taxa de morte celular máxima ao fim de 1 h, para todas as formulações, atinge um plateau de cerca de 70% a 80%.

Quando as células são incubadas com o fármaco durante 4 h (Figura 3.5.1.B), ocorre mais de 50% de morte celular com apenas um quarto da dose máxima (2,5  $\mu\text{M}$ ), aproximadamente, quando a incubação com os lipossomas SL\_NT e SL\_NS, taxa que alcança os 80% a 90% com a concentração máxima (10  $\mu\text{M}$ ). Ao contrário do esperado, os lipossomas SL\_T atingem taxas de morte não-superiores às provocadas pelas restantes nanopartículas. Contudo, os resultados obtidos com esta nanopartícula dirigida especificamente apresentam, uma vez mais, desvios padrões no que diz respeito à morte celular com um quarto da dose e até mesmo com a concentração máxima de doxorrubicina encapsulada, essencialmente. Uma vez mais, tais resultados advêm, possivelmente, da variabilidade celular que é característica destas células. Novamente, verifica-se que os lipossomas direcionados com o ligando F3 apresentam um efeito semelhante que as formulações não direcionadas e não específicas, já que a diferença entre as três formulações é mínima.

Quando as células estão em contacto com o fármaco durante 24 h (Figura 3.5.1.C), cerca de 80% da população torna-se não viável, mesmo com concentrações mínimas do agente quimioterapêutico, com todas as formulações. Esta taxa de morte manteve-se de forma mais ou menos constante ao longo do ensaio mesmo para concentrações de fármaco mais elevadas, o que indica que existe um limiar a partir do qual a morte celular não aumenta de forma considerável, mesmo com o aumento das concentrações do fármaco.



**Figura 3.5.1.** Estudos de citotoxicidade dos lipossomas desenvolvidos contendo doxorubicina encapsulada na linha celular CCRF-CEM. Trinta e duas mil células foram incubadas com as três formulações com doxorubicina encapsulada. Foram realizados diferentes tempos de incubações (1, 4 e 24 h) a 37 °C com diferentes concentrações de fármaco obtidas através de diluições em série, a partir dos 10 μM. Após os diferentes tempos de incubação, o meio foi substituído e, de acordo com a curva de crescimento para esta linha celular, a experiência foi prolongada por um total de 96 h. A inibição do crescimento celular foi analisada pelo método de resazurina a partir da leitura a 570-600 nm. (A), (B) e (C) representam a morte celular (%) da linha celular CCRF-CEM às 1, 4 e 24 h, respetivamente. A taxa de morte induzida após a exposição ao fármaco encapsulado nas nanopartículas está expressa relativamente a células não incubadas com lipossomas (% do controlo). Os dados representam a média ± SEM de 3 experiências realizadas. Os lipossomas sem ligando, com ligando inespecífico e com ligando específico para o recetor estão representados no gráfico por SL\_NT, SL\_NS e SL\_T, respetivamente. A linha a tracejado mais clara representa o valor IC<sub>50</sub>, e a linha a tracejado mais escura representa o valor IC<sub>90</sub> do fármaco nestas células.

Nestes três tempos de incubação (1, 4 e 24 h), como é possível verificar pelas figuras acima representadas e ao contrário do que seria expectável devido aos resultados obtidos pelos ensaios de associação celular, não é possível inferir diferenças entre a incubação com lipossomas sem ligando (SL\_NT) e vetorizados com ligando (SL\_NS e SL\_T), o que poderá sugerir a ausência de maior eficácia da formulação com o peptídeo F3 utilizado à superfície

do lipossoma para o recetor nucleolina presente nas células e, como tal, a ausência de vantagens na morte celular numa terapêutica direcionada desta natureza para estas linhas celulares. Por outro lado, os resultados demonstram uma elevada sensibilidade das células à doxorubicina mesmo em baixas concentrações, podendo ainda surgir a hipótese de que se torna difícil de aumentar a qualidade de resposta obtida, mesmo com lipossomas especificamente direcionados, pelo facto da eficácia da doxorubicina lipossómica ser por si só tão elevada.

Para além disso, é possível concluir que o efeito de citotoxicidade provocado pelo fármaco, em qualquer uma das condições, é um processo dependente do tempo de incubação e, simultaneamente, da dose.

### **3.5.2. Linha celular K562**

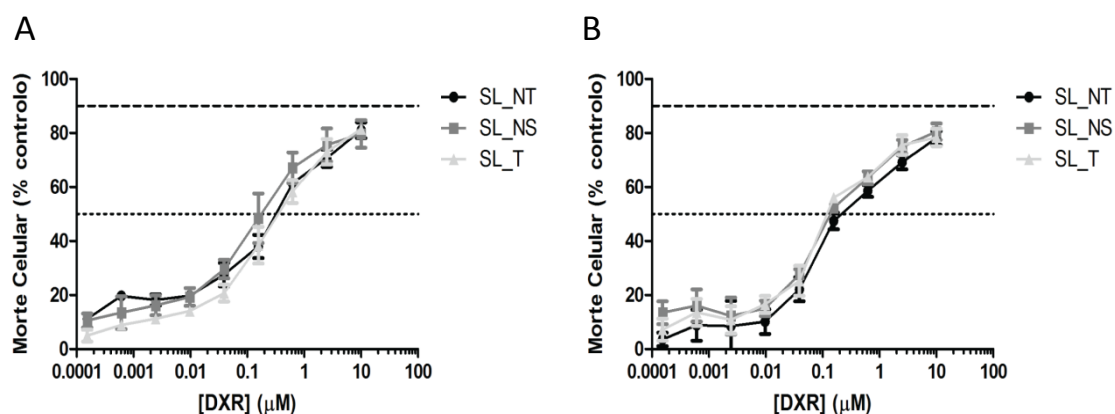
Tal como se verificou na linha celular CCRF-CEM, também as células K562 apresentaram uma elevada sensibilidade ao fármaco (Figura 3.5.2.).

Após a incubação ter sido prolongada até 4 h (Figura 3.5.2.A), a taxa de morte para esta linha celular atingiu valores compreendidos entre 70% a 80% para concentrações superiores do fármaco em todas as partículas preparadas, sem haver maior eficácia dos lipossomas SL\_T. Verifica-se, ainda, uma elevada sensibilidade das células à ação da doxorubicina, mesmo em baixas concentrações.

Às 24 h após a incubação (Figura 3.5.2.B), a taxa de morte é semelhante à observada após 4 h de incubação com o fármaco, uma vez que a morte celular máxima atingida é cerca de 80%, o que parece indicar que a taxa de morte não aparenta aumentar de forma considerável com o prolongamento do tempo de incubação.

Em todos os casos, a morte induzida pelas formulações SL\_NT, SL\_NS e SL\_T é semelhante ao longo do ensaio, indicando que a nanopartícula desenvolvida com o ligando F3 não é superiormente eficaz, pois proporciona a mesma eficácia que as restantes formulações desenvolvidas; e/ou que a eficiência da doxorubicina encapsulada nesta partícula lipídica é tão elevada que se torna difícil de obter taxas de morte consideravelmente superiores mesmo com esta partícula. A reduzida taxa de morte celular nesta linha, ao contrário do que se observa na linha CCRF-CEM, comprova os resultados de associação celular anteriormente mencionados, pois em ambos os ensaios não se verificam diferenças entre os lipossomas SL\_NT, SL\_NS e SL\_T.



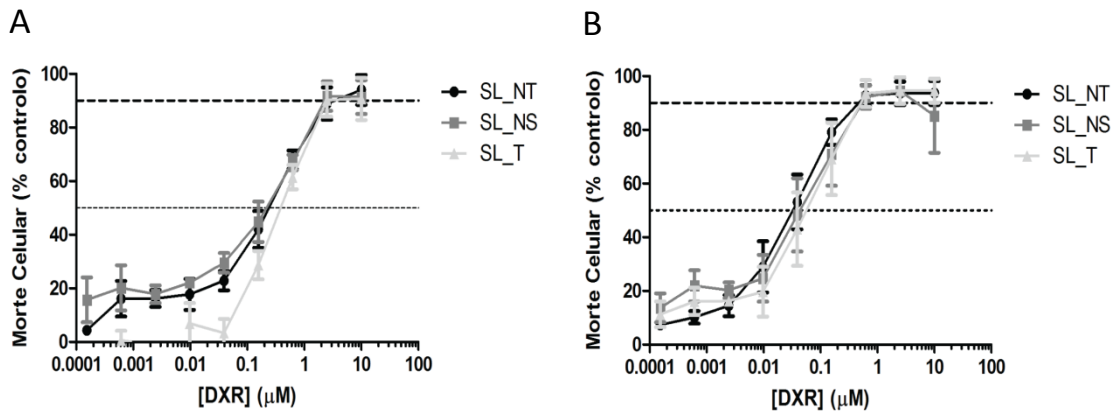


**Figura 3.5.2.** Estudos de citotoxicidade dos lipossomas contendo doxorubicina contra a linha celular K562. Nos ensaios de citotoxicidade foram incubadas 14 000 células com cada uma das formulações de lipossomas com o fármaco encapsulado. As células foram sujeitas a diferentes concentrações de fármaco através de diluições em série realizadas a partir de 10  $\mu\text{M}$ , durante 4 e 24 h a 37  $^{\circ}\text{C}$ . Após as incubações, o meio foi substituído e a experiência prolongada por um total de 96 h, de acordo com a curva de crescimento desta linha celular. O método de resazurina permitiu averiguar a inibição do crescimento celular, efetuando-se a leitura a 570-600 nm. (A) e (B) representam a morte celular (%) da linha celular K562 às 4 e 24 h, respetivamente. A citotoxicidade induzida após a incubação está expressa comparativamente a células não sujeitas à incubação com lipossomas (% do controlo). Para todas as linhas foram feitas 3 experiências, sendo que os dados representam a média  $\pm$  SEM. Os lipossomas não direcionados, direcionados inespecificamente e direcionados de forma específica estão representados por SL\_NT, SL\_NS e SL\_T, respetivamente. A linha a tracejado mais clara representa o valor  $\text{IC}_{50}$ , enquanto que a linha a tracejado mais escura representa o valor  $\text{IC}_{90}$  do fármaco nestas células.

Pode assim concluir-se que, nesta linha celular, os diferentes tempos de incubação e as partículas utilizadas não apresentam diferenças consideráveis entre si, já que a taxa de morte é semelhante e se mantém, de uma forma geral, constante com os diferentes tempos de incubação e para as diferentes formulações desenvolvidas, traduzindo a elevada sensibilidade intrínseca da linha à doxorubicina.

### 3.5.3. Linha celular THP-1

No que diz respeito à linha THP-1 (Figura 3.5.3.), verifica-se uma elevada sensibilidade das células a baixas concentrações de doxorubicina, tal como foi verificado nas duas linhas celulares acima descritas.



**Figura 3.5.3.** Estudos de citotoxicidade dos lipossomas contendo doxorubicina encapsulada na linha celular THP-I. Trinta e duas mil células foram incubadas com cada uma das formulações lipossômicas, encapsulando o fármaco. As células foram sujeitas a incubações com diferentes concentrações de fármaco através de diluições em série realizadas e durante 4 e 24 h a 37°C. Após as incubações, o meio foi substituído e a experiência prolongada por um total de 144 h, de acordo com a curva de crescimento desta linha celular. Pelo método de resazurina foi verificada a inibição do crescimento celular através da leitura a 570-600 nm. (A) e (B) representam a morte celular (%) da linha celular THP-I às 4 e 24 h, respetivamente. A citotoxicidade após a incubação está expressa relativamente a células não incubadas com lipossomas (% do controlo). Os dados representam a média  $\pm$  SEM em 3 experiências efetuadas. SL\_NT, SL\_NS e SL\_T representam lipossomas não vetorizados, vetorizados inespecificamente e vetorizados com ligando específico. A linha a tracejado mais clara representa o valor IC<sub>50</sub>, e a linha a tracejado mais escura representa o valor IC<sub>90</sub> do fármaco nestas células.

Para incubações de 4 h (Figura 3.5.3.A) e 24 h (Figura 3.5.3.B), taxas de morte de cerca de 90% são alcançados com concentrações muito baixas de doxorubicina, sendo a citotoxicidade praticamente total no final do ensaio. Às 4 h, a partir de 2,5  $\mu$ M de concentração do fármaco, cerca de 90% de morte celular é alcançada, mantendo-se a mesma percentagem ao longo das restantes concentrações utilizadas no ensaio. Já às 24 h, a morte celular atinge, desde as baixas doses iniciais, valores ligeiramente superiores a 90%. A taxa de morte vai aumentando com o aumento da concentração de doxorubicina a que as células estão sujeitas.

Contudo, apesar da elevada taxa de morte induzida pelas nanopartículas contendo doxorubicina, não se verificam diferenças significativas nos resultados obtidos entre as três partículas que foram desenvolvidas, presumivelmente induzidos pela não superior vantagem dos lipossomas com o ligando F3 ou pela elevada sensibilidade das células à excessiva eficácia

do fármaco encapsulado. Tais resultados indicam que, de facto, não existe correlação entre os ensaios de associação celular e os de citotoxicidade, uma vez que diferenças verificadas nos primeiros ensaios não se observam nem se traduzem numa superior taxa de morte celular induzida pelos lipossomas SL\_T.

De uma forma geral, para todas as linhas de leucemia utilizadas nos ensaios, a incubação de lipossomas não dirigidos ou dirigidos quer de forma inespecífica, quer de forma específica, encapsulando doxorrubicina, mostram a ausência de melhoria dos resultados de citotoxicidade usando a partícula com o ligando F3, sem benefício em termos de eficácia na morte celular.

Perante os resultados de citotoxicidade celular induzida pela doxorrubicina encapsulada nas diferentes formulações de lipossomas, surgem algumas hipóteses que poderão, possivelmente, explicar a inexistência de diferenças quanto à eficácia entre a partícula direcionada especificamente (SL\_T) e as partículas não direcionadas (SL\_NT) ou direcionadas inespecificamente (SL\_NS) nas linhas celulares. Apesar de os resultados obtidos nos ensaios de associação celular, nomeadamente no que diz respeito às células CCRF-CEM e THP-I, demonstrarem uma ligação e internalização significativa da nanopartícula, o número de recetores nucleolina presentes nestas linhas celulares poderá não ser suficiente para aumentar e despoletar uma citotoxicidade tão significativa, relativamente aos resultados já tão favoráveis obtidos com os lipossomas SL\_NS e, particularmente, com os SL\_NT. Por outro lado, estes resultados poderão ser um reflexo da elevada eficácia intrínseca da doxorrubicina encapsulada nas diferentes nanopartículas nas células leucémicas, tornando-se, portanto, difícil de obter uma resposta mais favorável por parte dos lipossomas SL\_T comparativamente à já obtida pelas restantes formulações. Para clarificar estes aspetos, estudos experimentais alternativos poderiam ser propostos, passando pela utilização de lipossomas encapsulados com fármacos menos eficazes que a doxorrubicina ou com maior dificuldade em atravessar a membrana lipídica.

Ainda uma possível libertação e extravasamento de fármaco para o exterior dos lipossomas SL\_NT e SL\_NS, por mais pequena que seja, poderá ser suficiente para induzir a mesma taxa de morte celular provocada pelos lipossomas SL\_T e, como tal, mascarar possíveis diferenças que poderiam ser verificadas pelos estudos de citotoxicidade e que são demonstradas nos ensaios de associação celular.

Quanto à linha celular K562, os estudos de citotoxicidade induzidos pelas três formulações corroboram a reduzida internalização celular verificada nos ensaios de associação celular, uma vez que não existem diferenças de internalização e de morte celular provocadas pelas três formulações em ambos os ensaios.

Após a análise de todos os resultados obtidos, verifica-se a ausência de melhoria da eficácia de morte celular com os lipossomas contendo o ligando F3 nos estudos de citotoxicidade, concluindo-se que a partícula não é mais eficaz comparativamente às formulações SL\_NT e SL\_NS, ainda que ocorram diferenças entre as mesmas nos estudos de associação celular nalgumas das linhas celulares. O recetor encontra-se presente em todas as células estudadas mas diversos fatores terão contribuído para a inexistência de vantagem com a utilização de lipossomas direccionados especificamente.

A cardiotoxicidade causada pela doxorrubicina é um sério fator limitante de dose administrada na situação clínica (To *et al.*, 2003). Apesar destes lipossomas com o ligando F3 incorporado à superfície não traduzirem um benefício de eficácia, em parte devido à utilização de um fármaco já muito eficaz por si só, apresentam, ainda assim, benefícios clínicos por terem a capacidade de direccionar fármacos à nucleolina presente nas células leucémicas. Este direccionamento permite alcançar uma maior afinidade às células cancerígenas e uma diminuição da dose de fármaco administrada com redução da toxicidade em células saudáveis e, conseqüentemente, dos efeitos secundários (como a cardiotoxicidade) que estão inerentes à utilização dos fármacos na prática clínica.

## 4. Conclusões e Perspetivas Futuras

## Conclusões e Perspetivas Futuras

Os sistemas de entrega de fármacos em nanoescala usando lipossomas são tecnologias que têm vindo a emergir, de forma a promover a entrega racional de fármacos quimioterapêuticos para o tratamento do cancro (Malam *et al.*, 2009). A sua utilização oferece uma melhoria das propriedades farmacocinéticas, uma libertação controlada dos agentes terapêuticos e, acima de tudo, uma redução dos efeitos colaterais que estão inerentes à ação da terapia sobre as células saudáveis (Haley & Frenkel, 2008).

A enorme versatilidade destas plataformas em termos de tamanho e parâmetros físico-químicos, condicionados pela variabilidade da sua constituição lipídica, consiste num potencial atrativo para o desenvolvimento de veículos destinados a uma ampla variedade de aplicações (Ulrich, 2002). A aplicação de nanotecnologias inovadoras tem, portanto, o potencial de beneficiar marcadamente a prática clínica, oferecendo soluções para muitas das limitações no tratamento dos doentes oncológicos (Malam *et al.*, 2009).

Com o intuito de desenvolver uma estratégia terapêutica para o tratamento de leucemias, formulações lipídicas desenvolvidas neste trabalho, encapsulando doxorrubicina, incorporaram na sua superfície o peptídeo F3 específico para o recetor nucleolina, sobreexpresso na superfície das células cancerígenas. Como principais conclusões, registou-se que:

- 1) o tamanho dos lipossomas encontra-se numa escala compatível com a administração endovenosa e bastante favorável ao escape endossomal;
- 2) a expressão da nucleolina foi confirmada em 3 das linhas celulares de leucemia estudadas por imunocitoquímica;
- 3) a nanopartícula internaliza de forma específica e significativa em 3 linhas celulares de leucemia aguda testadas, sendo inespecífica numa linha de leucemia mielóide crónica;
- 4) a citotoxicidade provocada por doxorrubicina internalizada nesta partícula lipídica (SL\_T) não é superior à provocada pela doxorrubicina encapsulada em lipossomas não direcionados (SL\_NT) ou direcionados de forma não específica (SL\_NS).

Ou seja, apesar dos resultados obtidos a partir dos estudos de associação celular, os ensaios de citotoxicidade não evidenciaram um aumento da eficácia da nanopartícula com doxorrubicina dirigida com o peptídeo F3, neste tipo de células cancerígenas. Apesar do reduzido benefício terapêutico, existe, contudo, um benefício clínico quanto aos efeitos secundários durante a quimioterapia.

A preparação dos lipossomas com um ligando mais específico para um outro recetor alvo que esteja presente à superfície das células cancerígenas leucémicas, ou com maior densidade de expressão, poderia ser uma outra estratégia que, possivelmente, poderia aumentar a interação entre a partícula e as células e, conseqüentemente, a eficácia terapêutica através de estratégias lipossômicas. Estudos anteriores dentro do mesmo domínio demonstraram o acesso de lipossomas sensíveis ao pH a células de cancros hematológicos (Fonseca *et al.*, 2005, Ishida *et al.*, 2001), pelo que estudos mediados por estas plataformas nanotecnológicas com fármacos que apresentam uma eficácia menos exuberante seriam também uma possível proposta experimental com vista ao tratamento de leucemias.

Apesar das conclusões retiradas quanto aos estudos de citotoxicidade, seria, ainda assim, conveniente e oportuno a realização dos mesmos ensaios com amostras de células leucémicas de doentes. Visto que as características das linhas celulares *in vitro*, nomeadamente o seu comportamento e as mutações adquiridas, não são exatamente as mesmas que ocorrem *in vivo*, tais ensaios poderiam, eventualmente, evidenciar diferenças quanto à eficácia citotóxica da nanopartícula desenvolvida. Apesar de ter já sido demonstrado no nosso grupo que a nanopartícula desenvolvida não induz níveis significativos de hemólise (Gomes-da-Silva *et al.*, 2013), novos estudos de biocompatibilidade poderia ser realizados com células leucémicas de doentes e, simultaneamente, com células normais, a fim de confirmar tais resultados.

A oncologia é uma das áreas médicas que mais beneficia destas novas estratégias terapêuticas, pelo que novas medidas e novas descobertas ao nível de plataformas nanotecnológicas são urgentes, a fim de melhorar a entrega específica dos agentes no tecido-alvo, com decréscimo do índice de toxicidade em órgãos e tecidos saudáveis. No futuro, tecnologias baseadas em nanopartículas para a terapia do cancro continuarão a expandir-se. Espera-se que a procura de novos alvos tumorais, novos ligandos e novas estratégias com vista à direção de fármacos ao alvo terapêutico permitirão alcançar grandes avanços em prol da qualidade de vida dos doentes.

## Referências

- ABRAHAM, S. A.; WATERHOUSE, D. N.; MAYER, L. D.; CULLIS, P. R.; MADDEN, T. D.; BALLY, M. B. (2005) - The liposomal formulation of doxorubicin. *"Methods Enzymol"*. Vol. 391. (2005). p. 71-97.
- ALLEN, T. M. (1998) - Liposomal drug formulations. Rationale for development and what we can expect for the future. *"Drugs"*. Vol. 56. n.º 5 (1998). p. 747-56.
- ALOISI, A.; DI GREGORIO, S.; STAGNO, F.; GUGLIELMO, P.; MANNINO, F.; SORMANI, M. P.; BRUZZI, P.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.; SAGLIO, G.; VENUTA, S.; GIUSTOLISI, R.; MESSINA, A.; VIGNERI, P. (2006) - BCR-ABL nuclear entrapment kills human CML cells: ex vivo study on 35 patients with the combination of imatinib mesylate and leptomyacin B. *"Blood"*. Vol. 107. n.º 4 (2006). p. 1591-8.
- AMBEGIA, E.; ANSELL, S.; CULLIS, P.; HEYES, J.; PALMER, L.; MACLACHLAN, I. (2005) - Stabilized plasmid-lipid particles containing PEG-diacylglycerols exhibit extended circulation lifetimes and tumor selective gene expression. *"Biochim Biophys Acta"*. Vol. 1669. n.º 2 (2005). p. 155-63.
- ANDRESEN, T. L.; JENSEN, S. S.; JORGENSEN, K. (2005) - Advanced strategies in liposomal cancer therapy: problems and prospects of active and tumor specific drug release. *"Prog Lipid Res"*. Vol. 44. n.º 1 (2005). p. 68-97.
- BAREL, M.; HOVANESSIAN, A. G.; MEIBOM, K.; BRIAND, J. P.; DUPUIS, M.; CHARBIT, A. (2008) - A novel receptor - ligand pathway for entry of Francisella tularensis in monocyte-like THP-1 cells: interaction between surface nucleolin and bacterial elongation factor Tu. *"BMC Microbiol"*. Vol. 8. (2008). p. 145.
- BASELGA, J. (2006) - Targeting tyrosine kinases in cancer: the second wave. *"Science"*. Vol. 312. n.º 5777 (2006). p. 1175-8.
- BELLODI, C.; LIDONNICI, M. R.; HAMILTON, A.; HELGASON, G. V.; SOLIERA, A. R.; RONCHETTI, M.; GALAVOTTI, S.; YOUNG, K. W.; SELMI, T.; YACOBI, R.; VAN ETEN, R. A.; DONATO, N.; HUNTER, A.; DINSDALE, D.; TIRRO, E.; VIGNERI, P.; NICOTERA, P.; DYER, M. J.; HOLYOAKE, T.; SALOMONI, P.; CALABRETTA, B. (2009) - Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. *"J Clin Invest"*. Vol. 119. n.º 5 (2009). p. 1109-23.
- BELOV, L.; DE LA VEGA, O.; DOS REMEDIOS, C. G.; MULLIGAN, S. P.; CHRISTOPHERSON, R. I. (2001) - Immunophenotyping of leukemias using a cluster of differentiation antibody microarray. *"Cancer Res"*. Vol. 61. n.º 11 (2001). p. 4483-9.
- BOLOTIN, E. M.; COHEN, R.; BAR, L.K.; EMANUEL, N.; NINIO, S.; LASIC, D. D.; BARENHOLZ, Y. (1994) - Ammonium sulfate gradients for efficient and stable remote loading of amphipathic weak bases into liposomes and ligandsomes. *"J. Liposome Res."*. Vol. 4. (1994). p. 455-479.
- BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. O. (2004) - Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *"Adv Drug Deliv Rev"*. Vol. 56. n.º 11 (2004). p. 1649-59.
- BUZZEO, M. P.; SCOTT, E. W.; COGLE, C. R. (2007) - The hunt for cancer-initiating cells: a history stemming from leukemia. *"Leukemia"*. Vol. 21. n.º 8 (2007). p. 1619-27.
- CAIRNS, R. A.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. (2011) - Regulation of cancer cell metabolism. *"Nat Rev Cancer"*. Vol. 11. n.º 2 (2011). p. 85-95.
- CELANO, M.; CALVAGNO, M. G.; BULOTTA, S.; PAOLINO, D.; ARTURI, F.; ROTIROTI, D.; FILETTI, S.; FRESTA, M.; RUSSO, D. (2004) - Cytotoxic effects of gemcitabine-loaded liposomes in human anaplastic thyroid carcinoma cells. *"BMC Cancer"*. Vol. 4. (2004). p. 63.
- CHRISTIAN, S.; PILCH, J.; AKERMAN, M. E.; PORKKA, K.; LAAKKONEN, P.; RUOSLAHTI, E. (2003) - Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels. *"J Cell Biol"*. Vol. 163. n.º 4 (2003). p. 871-8.



- CLARKSON, B.; STRIFE, A.; WISNIEWSKI, D.; LAMBEEK, C. L.; LIU, C. (2003) - Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies. "*Leukemia*". Vol. 17. n.º 7 (2003). p. 1211-62.
- COLEMAN, W. B.; TSONGALIS, G. J. (2006) - Molecular mechanisms of human carcinogenesis. "*EXS*". n.º 96 (2006). p. 321-49.
- CORTES, J. E.; TALPAZ, M.; KANTARJIAN, H. (1996) - Chronic myelogenous leukemia: a review. "*Am J Med*". Vol. 100. n.º 5 (1996). p. 555-70.
- CRANS, H. N.; SAKAMOTO, K. M. (2001) - Transcription factors and translocations in lymphoid and myeloid leukemia. "*Leukemia*". Vol. 15. n.º 3 (2001). p. 313-31.
- CUENCA, A. G.; JIANG, H.; HOCHWALD, S. N.; DELANO, M.; CANCE, W. G.; GROBMYER, S. R. (2006) - Emerging implications of nanotechnology on cancer diagnostics and therapeutics. "*Cancer*". Vol. 107. n.º 3 (2006). p. 459-66.
- CULLIS, P. R.; DE KRUIJFF, B. (1978) - The polymorphic phase behaviour of phosphatidylethanolamines of natural and synthetic origin. A <sup>31</sup>P NMR study. "*Biochim Biophys Acta*". Vol. 513. n.º 1 (1978). p. 31-42.
- DA FONSECA, L. M.; BRUNETTI, I. L.; CAMPA, A.; CATALANI, L. H.; CALADO, R. T.; FALCAO, R. P. (2003) - Assessment of monocytic component in acute myelomonocytic and monocytic/monoblastic leukemias by a chemiluminescent assay. "*Hematol J*". Vol. 4. n.º 1 (2003). p. 26-30.
- DAI, Y.; LAWRENCE, T. S.; XU, L. (2009a) - Overcoming cancer therapy resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins and nuclear factor-kappa B. "*Am J Transl Res*". Vol. 1. n.º 1 (2009a). p. 1-15.
- DAI, YAO; LAWRENCE, THEODORE S.; XU, LIANG (2009b) - Overcoming cancer therapy resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins and nuclear factor-kappa B. "*Am J Transl Res*". Vol. 1(1). (2009b). p. 1-15.
- DEININGER, M. W.; GOLDMAN, J. M.; MELO, J. V. (2000) - The molecular biology of chronic myeloid leukemia. "*Blood*". Vol. 96. n.º 10 (2000). p. 3343-56.
- DIAO, Y. Y.; LI, H. Y.; FU, Y. H.; HAN, M.; HU, Y. L.; JIANG, H. L.; TSUTSUMI, Y.; WEI, Q. C.; CHEN, D. W.; GAO, J. Q. (2011) - Doxorubicin-loaded PEG-PCL copolymer micelles enhance cytotoxicity and intracellular accumulation of doxorubicin in adriamycin-resistant tumor cells. "*Int J Nanomedicine*". Vol. 6. (2011). p. 1955-62.
- DOEPFNER, K. T.; BOLLER, D.; ARCARO, A. (2007) - Targeting receptor tyrosine kinase signaling in acute myeloid leukemia. "*Crit Rev Oncol Hematol*". Vol. 63. n.º 3 (2007). p. 215-30.
- DONALDSON, M. S. (2004) - Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet. "*Nutr J*". Vol. 3. (2004). p. 19.
- DRUKER, B. J.; TALPAZ, M.; RESTA, D. J.; PENG, B.; BUCHDUNGER, E.; FORD, J. M.; LYDON, N. B.; KANTARJIAN, H.; CAPDEVILLE, R.; OHNO-JONES, S.; SAWYERS, C. L. (2001) - Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. "*N Engl J Med*". Vol. 344. n.º 14 (2001). p. 1031-7.
- EL-SHAMI, K.; SMITH, B. D. (2008) - Immunotherapy for myeloid leukemias: current status and future directions. "*Leukemia*". Vol. 22. n.º 9 (2008). p. 1658-64.
- FENSKE, D. B.; CULLIS, P. R. (2005) - Entrapment of small molecules and nucleic acid-based drugs in liposomes. "*Methods Enzymol*". Vol. 391. (2005). p. 7-40.
- FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ERVIK, M.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D.M.; FORMAN, D.; BRAY, F. (2012) - Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase "GLOBOCAN". (2012).
- FERNANDEZ-MEDARDE, A.; SANTOS, E. (2011) - Ras in cancer and developmental diseases. "*Genes Cancer*". Vol. 2. n.º 3 (2011). p. 344-58.
- FERRARA, FELICETTO; SCHIFFER, CHARLES A. (2013) - Acute myeloid leukaemia in adults. "*The Lancet*". Vol. 381. n.º 9865 (2013). p. 484-495.
- FONSECA, C.; MOREIRA, J. N.; CIUDAD, C. J.; PEDROSO DE LIMA, M. C.; SIMOES, S. (2005) - Targeting of sterically stabilised pH-sensitive liposomes to human T-leukaemia cells. "*Eur J Pharm Biopharm*". Vol. 59. n.º 2 (2005). p. 359-66.

- FONSECA, N. A.; GREGORIO, A. C.; VALERIO-FERNANDES, A.; SIMOES, S.; MOREIRA, J. N. (2014) - Bridging cancer biology and the patients' needs with nanotechnology-based approaches. *"Cancer Treat Rev"*. Vol. 40. n.º 5 (2014). p. 626-35.
- FRITZE, A.; HENS, F.; KIMPFLER, A.; SCHUBERT, R.; PESCHKA-SUSS, R. (2006) - Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate gradient. *"Biochim Biophys Acta"*. Vol. 1758. n.º 10 (2006). p. 1633-40.
- GEARY, C. G. (2000) - The story of chronic myeloid leukaemia. *"Br J Haematol"*. Vol. 110. n.º 1 (2000). p. 2-11.
- GINISTY, H.; SICARD, H.; ROGER, B.; BOUVET, P. (1999) - Structure and functions of nucleolin. *"J Cell Sci"*. Vol. 112 ( Pt 6). (1999). p. 761-72.
- GOLDMAN, J. M.; MELO, J. V. (2003) - Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *"N Engl J Med"*. Vol. 349. n.º 15 (2003). p. 1451-64.
- GOMES-DA-SILVA, L. C.; FERNANDEZ, Y.; ABASOLO, I.; SCHWARTZ, S., JR.; RAMALHO, J. S.; PEDROSO DE LIMA, M. C.; SIMOES, S.; MOREIRA, J. N. (2013) - Efficient intracellular delivery of siRNA with a safe multitargeted lipid-based nanoplatform. *"Nanomedicine (Lond)"*. Vol. 8. n.º 9 (2013). p. 1397-413.
- GOMES-DA-SILVA, L. C.; FONSECA, N. A.; MOURA, V.; PEDROSO DE LIMA, M. C.; SIMOES, S.; MOREIRA, J. N. (2012a) - Lipid-based nanoparticles for siRNA delivery in cancer therapy: paradigms and challenges. *"Acc Chem Res"*. Vol. 45. n.º 7 (2012a). p. 1163-71.
- GOMES-DA-SILVA, L. C.; SANTOS, A. O.; BIMBO, L. M.; MOURA, V.; RAMALHO, J. S.; PEDROSO DE LIMA, M. C.; SIMOES, S.; MOREIRA, J. N. (2012b) - Toward a siRNA-containing nanoparticle targeted to breast cancer cells and the tumor microenvironment. *"Int J Pharm"*. Vol. 434. n.º 1-2 (2012b). p. 9-19.
- GORDON, M. Y. (1999) - Biological consequences of the BCR/ABL fusion gene in humans and mice. *"J Clin Pathol"*. Vol. 52. n.º 10 (1999). p. 719-22.
- GUARNERIO, J.; COLTELLA, N.; ALA, U.; TONON, G.; PANDOLFI, P. P.; BERNARDI, R. (2014) - Bone Marrow Endosteal Mesenchymal Progenitors Depend on HIF Factors for Maintenance and Regulation of Hematopoiesis. *"Stem Cell Reports"*. Vol. 2. n.º 6 (2014). p. 794-809.
- GUBERNATOR, J. (2011) - Active methods of drug loading into liposomes: recent strategies for stable drug entrapment and increased in vivo activity. *"Expert Opin Drug Deliv"*. Vol. 8. n.º 5 (2011). p. 565-80.
- HAFEZ, I. M.; ANSELL, S.; CULLIS, P. R. (2000a) - Tunable pH-sensitive liposomes composed of mixtures of cationic and anionic lipids. *"Biophys J"*. Vol. 79. n.º 3 (2000a). p. 1438-46.
- HAFEZ, I. M.; CULLIS, P. R. (2000b) - Cholesteryl hemisuccinate exhibits pH sensitive polymorphic phase behavior. *"Biochim Biophys Acta"*. Vol. 1463. n.º 1 (2000b). p. 107-14.
- HALEY, B.; FRENKEL, E. (2008) - Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *"Urol Oncol"*. Vol. 26. n.º 1 (2008). p. 57-64.
- HAMERSCHLAK, NELSON (2008) - Leukemia: genetics and prognostic factors. *"Jornal de Pediatria"*. Vol. 0. n.º 0 (2008).
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. (2000) - The hallmarks of cancer. *"Cell"*. Vol. 100. n.º 1 (2000). p. 57-70.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. (2011) - Hallmarks of cancer: the next generation. *"Cell"*. Vol. 144. n.º 5 (2011). p. 646-74.
- HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. (2011) - NF-kappaB in immunobiology. *"Cell Res"*. Vol. 21. n.º 2 (2011). p. 223-44.
- HE, S. N.; LI, Y. L.; YAN, J. J.; ZHANG, W.; DU, Y. Z.; YU, H. Y.; HU, F. Q.; YUAN, H. (2013) - Ternary nanoparticles composed of cationic solid lipid nanoparticles, protamine, and DNA for gene delivery. *"Int J Nanomedicine"*. Vol. 8. (2013). p. 2859-69.
- HIRAYAMA, C.; WATANABE, H.; NAKASHIMA, R.; NANBU, T.; HAMADA, A.; KUNIASU, A.; NAKAYAMA, H.; KAWAGUCHI, T.; SAITO, H. (2008) - Constitutive overexpression of P-glycoprotein, rather than breast cancer resistance protein or organic cation transporter 1, contributes to acquisition of imatinib-resistance in K562 cells. *"Pharm Res"*. Vol. 25. n.º 4 (2008). p. 827-35.

- HIRJI, I.; GUPTA, S.; GOREN, A.; CHIROVSKY, D. R.; MOADEL, A. B.; OLAVARRIA, E.; VICTOR, T. W.; DAVIS, C. C. (2013) - Chronic myeloid leukemia (CML): association of treatment satisfaction, negative medication experience and treatment restrictions with health outcomes, from the patient's perspective. *"Health Qual Life Outcomes"*. Vol. 11. (2013). p. 167.
- HOFFBRAND, A.V.; MOSS, P.A.H.; PETTIT, J.E. - 5th. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2006.
- HOVANESSION, A. G. (2006) - Midkine, a cytokine that inhibits HIV infection by binding to the cell surface expressed nucleolin. *"Cell Res"*. Vol. 16. n.º 2 (2006). p. 174-81.
- HOVANESSION, A. G.; SOUNDARAMOURTY, C.; EL KHOURY, D.; NONDIER, I.; SVAB, J.; KRUST, B. (2010) - Surface expressed nucleolin is constantly induced in tumor cells to mediate calcium-dependent ligand internalization. *"PLoS One"*. Vol. 5. n.º 12 (2010). p. e15787.
- HOWLADER, N.; NOONE, AM.; KRAPCHO, M.; GARSHELL, J.; NEYMAN, N.; ALTEKRUSE, SF.; KOSARY, CL.; YU, M.; RUHL, J.; TATALOVICH, Z.; CHO, H.; MARIOTTO, A.; LEWIS, DR.; CHEN, HS.; FEUER, EJ.; CRONIN, KA. (2013) - *"SEER Cancer Statistics Review, National Cancer Institute. Bethesda, MD"*. (2013). p. 1975-2011.
- HU, Y.; FU, L. (2012) - Targeting cancer stem cells: a new therapy to cure cancer patients. *"Am J Cancer Res"*. Vol. 2. n.º 3 (2012). p. 340-56.
- ICHIKAWA, Y.; GHANEFAR, M.; BAYEVA, M.; WU, R.; KHECHADURI, A.; NAGA PRASAD, S. V.; MUTHARASAN, R. K.; NAIK, T. J.; ARDEHALI, H. (2014) - Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *"J Clin Invest"*. Vol. 124. n.º 2 (2014). p. 617-30.
- IMMORDINO, M. L.; DOSIO, F.; CATTEL, L. (2006) - Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *"Int J Nanomedicine"*. Vol. 1. n.º 3 (2006). p. 297-315.
- INABA, HIROTO; GREAVES, MEL; MULLIGHAN, CHARLES G. (2013) - Acute lymphoblastic leukaemia. *"The Lancet"*. Vol. 381. n.º 9881 (2013). p. 1943-1955.
- ISHIDA, T.; KIRCHMEIER, M. J.; MOASE, E. H.; ZALIPSKY, S.; ALLEN, T. M. (2001) - Targeted delivery and triggered release of liposomal doxorubicin enhances cytotoxicity against human B lymphoma cells. *"Biochim Biophys Acta"*. Vol. 1515. n.º 2 (2001). p. 144-58.
- IZRAELI, S.; SHOCHAT, C.; TAL, N.; GERON, I. (2014) - Towards precision medicine in childhood leukemia - Insights from mutationally activated cytokine receptor pathways in acute lymphoblastic leukemia. *"Cancer Lett"*. (2014).
- JEFFS, L. B.; PALMER, L. R.; AMBEGIA, E. G.; GIESBRECHT, C.; EWANICK, S.; MACLACHLAN, I. (2005) - A scalable, extrusion-free method for efficient liposomal encapsulation of plasmid DNA. *"Pharm Res"*. Vol. 22. n.º 3 (2005). p. 362-72.
- JUNG, Y.; KIM, M.; SOH, H.; LEE, S.; KIM, J.; PARK, S.; SONG, K.; LEE, I. (2014) - TC1(C8orf4) regulates hematopoietic stem/progenitor cells and hematopoiesis. *"PLoS One"*. Vol. 9. n.º 6 (2014). p. e100311.
- KAMMERER, U.; KAPP, M.; GASSEL, A. M.; RICHTER, T.; TANK, C.; DIETL, J.; RUCK, P. (2001) - A New Rapid Immunohistochemical Staining Technique Using the EnVision Antibody Complex. *"Journal of Histochemistry & Cytochemistry"*. Vol. 49. n.º 5 (2001). p. 623-630.
- KARIMIANI, E. G.; MARRIAGE, F.; MERRITT, A. J.; BURTHEM, J.; BYERS, R. J.; DAY, P. J. (2013) - Single-cell analysis of K562 cells: An imatinib-resistant subpopulation is adherent and has upregulated expression of BCR-ABL mRNA and protein. *"Exp Hematol"*. (2013).
- KHAN, S. S.; SOLOMON, M. A.; MCCOY, J. P., JR. (2005) - Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *"Cytometry B Clin Cytom"*. Vol. 64. n.º 1 (2005). p. 1-8.
- KIEL, M. J.; MORRISON, S. J. (2008) - Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *"Nat Rev Immunol"*. Vol. 8. n.º 4 (2008). p. 290-301.
- KLIMUK, S. K.; SEMPLE, S. C.; NAHIRNEY, P. N.; MULLEN, M. C.; BENNETT, C. F.; SCHERRER, P.; HOPE, M. J. (2000) - Enhanced anti-inflammatory activity of a liposomal intercellular adhesion molecule-1 antisense oligodeoxynucleotide in an acute model of contact hypersensitivity. *"J Pharmacol Exp Ther"*. Vol. 292. n.º 2 (2000). p. 480-8.

- KOUMOUTSAKOS, PETROS; PIVKIN, IGOR; MILDE, FLORIAN (2013) - The Fluid Mechanics of Cancer and Its Therapy. "Annual Review of Fluid Mechanics". Vol. 45. n.º 1 (2013). p. 325-355.
- KUMAR, G.L.; RUDBECK, L - Education Guide Immunohistochemical Staining Methods Fifth Edition. Carpinteria, California: 2009.
- KUMAR, PAWAN; PAWAIYA, RVS (2010) - Advances in Cancer Diagnostics. "Advances in Cancer Diagnostics.". n.º 3(2), 142-153 (2010).
- LAI, M-Z.; VAIL, W.J.; SZOKA, F. C. (1985) - Acid- and Calcium-Induced Structural Changes in Phosphatidylethanolamine Membranes Stabilized by Cholesteryl Hemisuccinatet. "Biochemistry". Vol. 24. (1985). p. 1654-1661.
- LASIC, D. D. (1998) - Novel applications of liposomes. "Trends Biotechnol". Vol. 16. n.º 7 (1998). p. 307-21.
- LECOEUR, H.; FEVRIER, M.; GARCIA, S.; RIVIERE, Y.; GOUGEON, M. L. (2001) - A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. "J Immunol Methods". Vol. 253. n.º 1-2 (2001). p. 177-87.
- LYDON, N. (2009) - Attacking cancer at its foundation. "Nat Med". Vol. 15. n.º 10 (2009). p. 1153-7.
- MALAM, Y.; LOIZIDOU, M.; SEIFALIAN, A. M. (2009) - Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. "Trends Pharmacol Sci". Vol. 30. n.º 11 (2009). p. 592-9.
- MANCUSO, P.; ANTONIOTTI, P.; QUARNA, J.; CALLERI, A.; RABASCIO, C.; TACCHETTI, C.; BRAIDOTTI, P.; WU, H. K.; ZURITA, A. J.; SARONNI, L.; CHENG, J. B.; SHALINSKY, D. R.; HEYMACH, J. V.; BERTOLINI, F. (2009) - Validation of a standardized method for enumerating circulating endothelial cells and progenitors: flow cytometry and molecular and ultrastructural analyses. "Clin Cancer Res". Vol. 15. n.º 1 (2009). p. 267-73.
- MARNITZ, S.; ZICH, A.; MARTUS, P.; BUDACH, V.; JAHN, U.; NEUMANN, O.; ARNOLD, R. (2014) - Long-term results of total body irradiation in adults with acute lymphoblastic leukemia. "Strahlenther Onkol". (2014).
- MARTINEZ, JESSE D.; PARKER, MICHEL TAYLOR; FULTZ, KIMBERLY E.; IGNATENKO, NATALI A.; GERNER, EUGENE W. (2003) - Molecular Biology of Cancer. "Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery". Vol. Volume 5: Chemotherapeutic Agents. (2003).
- MAURER, N.; WONG, K. F.; STARK, H.; LOUIE, L.; MCINTOSH, D.; WONG, T.; SCHERRER, P.; SEMPLE, S. C.; CULLIS, P. R. (2001) - Spontaneous entrapment of polynucleotides upon electrostatic interaction with ethanol-destabilized cationic liposomes. "Biophys J". Vol. 80. n.º 5 (2001). p. 2310-26.
- MENDONCA, L. S.; MOREIRA, J. N.; DE LIMA, M. C.; SIMOES, S. (2010) - Co-encapsulation of anti-BCR-ABL siRNA and imatinib mesylate in transferrin receptor-targeted sterically stabilized liposomes for chronic myeloid leukemia treatment. "Biotechnol Bioeng". Vol. 107. n.º 5 (2010). p. 884-93.
- MOKHTARIEH, A. A.; CHEONG, S.; KIM, S.; CHUNG, B. H.; LEE, M. K. (2012) - Asymmetric liposome particles with highly efficient encapsulation of siRNA and without nonspecific cell penetration suitable for target-specific delivery. "Biochim Biophys Acta". Vol. 1818. n.º 7 (2012). p. 1633-41.
- MONCK, M. A.; MORI, A.; LEE, D.; TAM, P.; WHEELER, J. J.; CULLIS, P. R.; SCHERRER, P. (2000) - Stabilized plasmid-lipid particles: pharmacokinetics and plasmid delivery to distal tumors following intravenous injection. "J Drug Target". Vol. 7. n.º 6 (2000). p. 439-52.
- MORAIS, EVERTON FREITAS DE; LIRA, JADSON ALEXANDRE DA SILVA; MACEDO, RÔMULO AUGUSTO DE PAIVA; SANTOS, KLAUS STEYLLON DOS; ELIAS, CASSANDRA TEIXEIRA VALLE; MORAIS, MARIA DE LOURDES SILVA DE ARRUDA (2014) - Oral manifestations resulting from chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. "Brazilian Journal of Otorhinolaryngology". Vol. 80. n.º 1 (2014).
- MOREIRA, J. N.; GASPAR, R.; ALLEN, T. M. (2001) - Targeting Stealth liposomes in a murine model of human small cell lung cancer. "Biochim Biophys Acta". Vol. 1515. n.º 2 (2001). p. 167-76.
- MOURA, V.; LACERDA, M.; FIGUEIREDO, P.; CORVO, M. L.; CRUZ, M. E.; SOARES, R.; DE LIMA, M. C.; SIMOES, S.; MOREIRA, J. N. (2012) - Targeted and intracellular triggered delivery of

- therapeutics to cancer cells and the tumor microenvironment: impact on the treatment of breast cancer. *"Breast Cancer Res Treat"*. Vol. 133. n.º 1 (2012). p. 61-73.
- NAPPER, A. D.; WATSON, V. G. (2013) - Targeted drug discovery for pediatric leukemia. *"Front Oncol"*. Vol. 3. (2013). p. 170.
- NASS, SJ; MOSES, HL (2007) - Cancer Biomarkers: The Promises and Challenges of Improving Detection and Treatment. *"Washington D.C.: The National Academies Press"*. (2007).
- O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. (2000) - Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *"Eur J Biochem"*. Vol. 267. n.º 17 (2000). p. 5421-6.
- OTAKE, Y.; SOUNDARARAJAN, S.; SENGUPTA, T. K.; KIO, E. A.; SMITH, J. C.; PINEDA-ROMAN, M.; STUART, R. K.; SPICER, E. K.; FERNANDES, D. J. (2007) - Overexpression of nucleolin in chronic lymphocytic leukemia cells induces stabilization of bcl2 mRNA. *"Blood"*. Vol. 109. n.º 7 (2007). p. 3069-75.
- PACIOREK, T.; SAUER, M.; BALLA, J.; WISNIEWSKA, J.; FRIML, J. (2006) - Immunocytochemical technique for protein localization in sections of plant tissues. *"Nat Protoc"*. Vol. 1. n.º 1 (2006). p. 104-7.
- PATHAK, P.; HESS, R.; WEISS, M. A. (2014) - Liposomal vincristine for relapsed or refractory Ph-negative acute lymphoblastic leukemia: a review of literature. *"Ther Adv Hematol"*. Vol. 5. n.º 1 (2014). p. 18-24.
- PAYNE, K. J.; DOVAT, S. (2014) - G0S2--a new player in leukemia. *"Leuk Res"*. Vol. 38. n.º 2 (2014). p. 147-8.
- PEER, D.; KARP, J. M.; HONG, S.; FAROKHZAD, O. C.; MARGALIT, R.; LANGER, R. (2007) - Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *"Nat Nanotechnol"*. Vol. 2. n.º 12 (2007). p. 751-60.
- PINTO, A. C.; MOREIRA, J. N.; SIMOES, S. (2009) - Ciprofloxacin sensitizes hormone-refractory prostate cancer cell lines to doxorubicin and docetaxel treatment on a schedule-dependent manner. *"Cancer Chemother Pharmacol"*. Vol. 64. n.º 3 (2009). p. 445-54.
- POKHAREL, MANISHA (2012) - Leukemia : A Review Article. *"International Journal of Advanced Research in Pharmaceutical & Bio Sciences (IJARPB)"*. Vol. Vol.2 (3). (2012). p. 397-407.
- POLYAK, K. (2007) - Breast cancer: origins and evolution. *"J Clin Invest"*. Vol. 117. n.º 11 (2007). p. 3155-63.
- RADICH, J. P. (2010) - Chronic myeloid leukemia 2010: where are we now and where can we go? *"Hematology Am Soc Hematol Educ Program"*. Vol. 2010. (2010). p. 122-8.
- RAMPERSAD, S. N. (2012) - Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *"Sensors (Basel)"*. Vol. 12. n.º 9 (2012). p. 12347-60.
- RECKZEH, K.; CAMMENGA, J. (2010) - Molecular mechanisms underlying deregulation of C/EBPalpha in acute myeloid leukemia. *"Int J Hematol"*. Vol. 91. n.º 4 (2010). p. 557-68.
- RISBERG, B.; DAVIDSON, B.; DONG, H. P.; NESLAND, J. M.; BERNER, A. (2000) - Flow cytometric immunophenotyping of serous effusions and peritoneal washings: comparison with immunocytochemistry and morphological findings. *"J Clin Pathol"*. Vol. 53. n.º 7 (2000). p. 513-7.
- ROSHAL, M.; CHIEN, S.; OTHUS, M.; WOOD, B. L.; FANG, M.; APPELBAUM, F. R.; ESTEY, E. H.; PAPAYANNOPOULOU, T.; BECKER, P. S. (2013) - The proportion of CD34(+)CD38(low or neg) myeloblasts, but not side population frequency, predicts initial response to induction therapy in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *"Leukemia"*. Vol. 27. n.º 3 (2013). p. 728-31.
- ROWLEY, J. D. (1973) - Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *"Nature"*. Vol. 243. n.º 5405 (1973). p. 290-3.
- SAHA, V.; LILLEYMAN, J. S. (1998) - Leukaemia. *"Current Paediatrics"*. (1998). p. 73 77.

- SAID, E. A.; KRUST, B.; NISOLE, S.; SVAB, J.; BRIAND, J. P.; HOVANESSIAN, A. G. (2002) - The anti-HIV cytokine midkine binds the cell surface-expressed nucleolin as a low affinity receptor. *"J Biol Chem"*. Vol. 277. n.º 40 (2002). p. 37492-502.
- SANTOS, A. O.; DA SILVA, L. C.; BIMBO, L. M.; DE LIMA, M. C.; SIMOES, S.; MOREIRA, J. N. (2010) - Design of peptide-targeted liposomes containing nucleic acids. *"Biochim Biophys Acta"*. Vol. 1798. n.º 3 (2010). p. 433-41.
- SANTOS, A.; SARMENTO-RIBEIRO, A. B.; DE LIMA, M. C.; SIMOES, S.; MOREIRA, J. N. (2008) - Simultaneous evaluation of viability and Bcl-2 in small-cell lung cancer. *"Cytometry A"*. Vol. 73A. n.º 12 (2008). p. 1165-72.
- SAUER, M.; PACIOREK, T.; BENKOVA, E.; FRIML, J. (2006) - Immunocytochemical techniques for whole-mount in situ protein localization in plants. *"Nat Protoc"*. Vol. 1. n.º 1 (2006). p. 98-103.
- SAVAGE, D. G.; ANTMAN, K. H. (2002) - Imatinib mesylate--a new oral targeted therapy. *"N Engl J Med"*. Vol. 346. n.º 9 (2002). p. 683-93.
- SAWANT, R. R.; TORCHILIN, V. P. (2010) - Polymeric micelles: polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine (PEG-PE)-based micelles as an example. *"Methods Mol Biol"*. Vol. 624. (2010). p. 131-49.
- SEMPLE, S. C.; HARASYM, T. O.; CLOW, K. A.; ANSELL, S. M.; KLIMUK, S. K.; HOPE, M. J. (2005) - Immunogenicity and rapid blood clearance of liposomes containing polyethylene glycol-lipid conjugates and nucleic Acid. *"J Pharmacol Exp Ther"*. Vol. 312. n.º 3 (2005). p. 1020-6.
- SEMPLE, S. C.; KLIMUK, S. K.; HARASYM, T. O.; DOS SANTOS, N.; ANSELL, S. M.; WONG, K. F.; MAURER, N.; STARK, H.; CULLIS, P. R.; HOPE, M. J.; SCHERRER, P. (2001) - Efficient encapsulation of antisense oligonucleotides in lipid vesicles using ionizable aminolipids: formation of novel small multilamellar vesicle structures. *"Biochim Biophys Acta"*. Vol. 1510. n.º 1-2 (2001). p. 152-66.
- SHAH, N. N.; DAVE, H.; WAYNE, A. S. (2013) - Immunotherapy for pediatric leukemia. *"Front Oncol"*. Vol. 3. (2013). p. 166.
- SHIBATA, Y.; MURAMATSU, T.; HIRAI, M.; INUI, T.; KIMURA, T.; SAITO, H.; MCCORMICK, L. M.; BU, G.; KADOMATSU, K. (2002) - Nuclear Targeting by the Growth Factor Midkine. *"Mol Cell Biol"*. Vol. 22. n.º 19 (2002). p. 6788-6796.
- SIMOES, S.; MOREIRA, J. N.; FONSECA, C.; DUZGUNES, N.; DE LIMA, M. C. (2004) - On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *"Adv Drug Deliv Rev"*. Vol. 56. n.º 7 (2004). p. 947-65.
- SONG, L. Y.; AHKONG, Q. F.; RONG, Q.; WANG, Z.; ANSELL, S.; HOPE, M. J.; MUI, B. (2002) - Characterization of the inhibitory effect of PEG-lipid conjugates on the intracellular delivery of plasmid and antisense DNA mediated by cationic lipid liposomes. *"Biochim Biophys Acta"*. Vol. 1558. n.º 1 (2002). p. 1-13.
- SOUNDARARAJAN, S.; WANG, L.; SRIDHARAN, V.; CHEN, W.; COURTENAY-LUCK, N.; JONES, D.; SPICER, E. K.; FERNANDES, D. J. (2009) - Plasma membrane nucleolin is a receptor for the anticancer aptamer AS1411 in MV4-11 leukemia cells. *"Mol Pharmacol"*. Vol. 76. n.º 5 (2009). p. 984-91.
- STORCK, S.; SHUKLA, M.; DIMITROV, S.; BOUVET, P. (2007) - Functions of the histone chaperone nucleolin in diseases. *"Subcell Biochem"*. Vol. 41. (2007). p. 125-44.
- SUBRAMANIAM, D.; RAMALINGAM, S.; HOUCHEN, C. W.; ANANT, S. (2010) - Cancer stem cells: a novel paradigm for cancer prevention and treatment. *"Mini Rev Med Chem"*. Vol. 10. n.º 5 (2010). p. 359-71.
- TALLMAN, M. S.; KIM, H. T.; PAIETTA, E.; BENNETT, J. M.; DEWALD, G.; CASSILETH, P. A.; WIERNIK, P. H.; ROWE, J. M. (2004) - Acute monocytic leukemia (French-American-British classification M5) does not have a worse prognosis than other subtypes of acute myeloid leukemia: a report from the Eastern Cooperative Oncology Group. *"J Clin Oncol"*. Vol. 22. n.º 7 (2004). p. 1276-86.

- TO, H.; OHDO, S.; SHIN, M.; UCHIMARU, H.; YUKAWA, E.; HIGUCHI, S.; FUJIMURA, A.; KOBAYASHI, E. (2003) - Dosing time dependency of doxorubicin-induced cardiotoxicity and bone marrow toxicity in rats. "*J Pharm Pharmacol*". Vol. 55. n.º 6 (2003). p. 803-10.
- ULRICH, A. S. (2002) - Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. "*Biosci Rep*". Vol. 22. n.º 2 (2002). p. 129-50.
- VANNEMAN, M.; DRANOFF, G. (2012) - Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. "*Nat Rev Cancer*". Vol. 12. n.º 4 (2012). p. 237-51.
- WANG, L. D.; WAGERS, A. J. (2011) - Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. "*Nat Rev Mol Cell Biol*". Vol. 12. n.º 10 (2011). p. 643-55.
- WEINBERG, R. A. (1988) - Oncogenes and tumor suppressor genes. "*Trans Stud Coll Physicians Phila*". Vol. 10. n.º 1-4 (1988). p. 83-94.
- WEINBERG, R. A. (1994) - Oncogenes and tumor suppressor genes. "*CA Cancer J Clin*". Vol. 44. n.º 3 (1994). p. 160-70.
- WHEELER, J. J.; PALMER, L.; OSSANLOU, M.; MACLACHLAN, I.; GRAHAM, R. W.; ZHANG, Y. P.; HOPE, M. J.; SCHERRER, P.; CULLIS, P. R. (1999) - Stabilized plasmid-lipid particles: construction and characterization. "*Gene Ther*". Vol. 6. n.º 2 (1999). p. 271-81.
- XING, H.; WONG, N. Y.; XIANG, Y.; LU, Y. (2012) - DNA aptamer functionalized nanomaterials for intracellular analysis, cancer cell imaging and drug delivery. "*Curr Opin Chem Biol*". Vol. 16. n.º 3-4 (2012). p. 429-35.
- YAMADA, T.; PARK, C. S.; SHEN, Y.; RABIN, K. R.; LACORAZZA, H. D. (2014) - G0S2 inhibits the proliferation of K562 cells by interacting with nucleolin in the cytosol. "*Leuk Res*". Vol. 38. n.º 2 (2014). p. 210-7.
- ZEMBRUSKI, N. C.; STACHE, V.; HAEFELI, W. E.; WEISS, J. (2012) - 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. "*Anal Biochem*". Vol. 429. n.º 1 (2012). p. 79-81.
- ZHANG, Y. P.; SEKIROV, L.; SARAVOLAC, E. G.; WHEELER, J. J.; TARDI, P.; CLOW, K.; LENG, E.; SUN, R.; CULLIS, P. R.; SCHERRER, P. (1999) - Stabilized plasmid-lipid particles for regional gene therapy: formulation and transfection properties. "*Gene Ther*". Vol. 6. n.º 8 (1999). p. 1438-47.
- ZHU, Y.; QIAN, S. X. (2014) - Clinical efficacy and safety of imatinib in the management of Ph chronic myeloid or acute lymphoblastic leukemia in Chinese patients. "*Onco Targets Ther*". Vol. 7. (2014). p. 395-404.