UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO-ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

Larissa Chaves Costa Franca

LIPOSSOMAS SÍTIO-ESPECÍFICOS CONTENDO β-LAPACHONA COMO ESTRATÉGIA PARA A TERAPIA DO CÂNCER

Recife
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO-ASAMI

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

LIPOSSOMAS SÍTIO-ESPECÍFICOS CONTENDO β-LAPACHONA COMO ESTRATÉGIA PARA A TERAPIA DO CÂNCER

Tese submetida ao Programa de Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Doutoranda: Larissa Chaves Costa Franca

Orientadora: Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães

Co-orientadora: Profa. Dra. Mariane Cajubá de B. Lira Nogueira

Recife

2017

Catalogação na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Franca, Larissa Chaves Costa
Lipossomas sítio-específicos contendo β-lapachona como estratégia para a terapia do câncer / Larissa Chaves Costa Franca- Recife: O Autor, 2017.

112 folhas: il., fig., tab.
Orientadora: Nereide Stela Santos Magalhães
Coorientadora: Mariane Cajubá de B. Lira Nogueira
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Biologia Aplicada à Saúde, 2017.
Inclui referências e anexos

1. Câncer 2. Nanotecnologia 3. Lectinas I. Magalhães, Nereide Stela Santos (orientadora) II. Nogueira, Mariane Cajubá de B. Lira (coorientadora) III. Título

616.994 CDD (22.ed.) UFPE/CB-2017-231

Larissa Chaves Costa Franca

LIPOSSOMAS SÍTIO-ESPECÍFICOS CONTENDO β-LAPACHONA COMO ESTRATÉGIA PARA A TERAPIA DO CÂNCER

Tese apresentada ao Programa de Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 30/03/2017

BANCA EXAMINADORA

_____

Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Dr. Francisco Humberto Xavier Junior (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Profa. Dra. Mariane Cajubá de B. Lira Nogueira (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esta tese a minha família: aos meus pais pelo amor, paciência e dedicação incondicionais; à meu irmão pelo incentivo e carinho; ao meu marido pela compreenssão, companheirismo, cuidado e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, pela força e capacidade que me foi concedida para realização deste trabalho.

À minha querida e amada família (Ramalho, Salete e Arthur) que mesmo à distância sempre me apoiaram e me deram força nos momentos difíceis, transmitindo seu amor e carinho incondicional, torcendo sempre pelo meu sucesso.

Ao meu marido Vitor, por ser um companheiro extraordinário, me apoiando durante o desenvolvimento deste trabalho, me incentivando e me dando força para seguir em frente. Agradeço imensamente toda sua paciência, compreensão, dedicação e ajuda durante a conclusão deste trabalho. E, principalmente, o carinho e amor sem medida.

Aos meus sogros, Elizabeth e Paulo, pela torcida e carinho com que cuidaram de mim durante a conclusão deste trabalho.

A todos os meus parentes, que mesmo distantes, sempre torceram por mim.

À Profa. Drª. Nereide Stela Santos Magalhães, pela orientação e confiança no meu trabalho, pelo exemplo de professora e pesquisadora e por todos os ensinamentos acadêmicos. Obrigada por acreditar em mim, por me dar a oportunidade participar do grupo SLC, e , assim, poder ampliar meus conhecimentos nesta área que me encanta.

À Profª Drª Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira pela co-orientação e amizade. Obrigada por acompanhar passo-a-passo o desenvolvimento deste trabalho, por cada palavra de incentivo, cada ideia discutida e cada resultado conquistado. Agradeço pela paciência, por ter acreditado e confiado em mim, além de contribuir para o meu crescimento pessoal e profissional. Este trabalho é o resumo da nossa dedicação e perseverança!

À Drª Milena Sales Ferraz pelo trabalho em conjunto no desenvolvimento e caracterização das formulações. Esse trabalho também é fruto do seu esforço e dedicação!

Ao Dr. Francisco Humberto Xavier Junior pelos ensinamentos e colaboração na Calorimetria de Titulação Isotérmica. Obrigada por contribuir para o meu crescimento como pesquisadora, através de reflexões e questionamentos.

A aluna de iniciação científica Maria Clara pela ajuda no desenvolvimento dos lipossomas.

Ao aluno Victor Passos pela ajuda incondicional nos experimentos com células. Obrigada por compartilhar dos desafios e conquistas alcançados.

As amigas Marcela Araújo e Sarah Palácio pelo incentivo e torcida; pelas conversas e "desabafos"; e pelos momentos de descontração, regados sempre de muito café.

A todos os colegas e amigos do Grupo de Pesquisa de Sistemas de Liberação Controlada de Medicamento pela colaboração, amizade e convívio durante estes quatro anos de doutorado.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), em especial aos do laboratório de Bioquímica pela convivência em laboratório.

A todos os funcionários do LIKA, pelo auxílio e atenção prestados.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro durante o curso deste trabalho.

A todos, que de forma direta e indireta, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Novas e eficazes estratégias para o tratamento do câncer são um grande desafio atualmente. Entre as moléculas anticancerígenas disponíveis no mercado, a β-lapachona (β-lap) tem atraído a atenção por sua potente atividade antitumoral. A encapsulação da β-lap em lipossomas sítio-específicos é uma alternativa na melhoria da eficácia terapêutica, direcionando às células cancerígenas, promovendo assim uma redução dos efeitos adversos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi encapsular a β-lap em lipossomas sítio-específicos utilizando a Concanavalina A (ConA) como molécula de vetorização às células do câncer. Os lipossomas com concentração lipídica total de 60 mM foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico seguido de sonicação. Utilizando o mesmo método, lipossomas contendo β-lap (0,5 mg/mL) foram produzidos. Diâmetro médio das vesículas, potencial zeta, conjugação da ConA e a eficiência de encapsulação (EE%) da β-lap nos lipossomas foram avaliados. Calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foi usada para medir a energia de ligação entre as biomoléculas que compõem o lipossoma. A atividade da ConA foi avaliada antes e depois da conjugação na superfície dos lipossomas pelo ensaio de hemaglutinação. Finalmente, a captura dos lipossomas contendo ConA pelas células de câncer de mama (MCF-7) foi realizada por microscopia de fluorescência. Os lipossomas não revestidos e revestidos com ConA apresentaram tamanho e potencial zeta variando de 97,46 ± 2,01 nm a 152,23 ± 2,73 nm e de -6,83 ± 0,28 mV a -17,23 ± 0,64 mV, respectivamente. A conjugação da ConA e a EE% da β-lap foram aproximadamente 100%. A conjugação da ConA às biomoléculas foi avaliada por parâmetros termodinâmicos (ΔH, ΔS e ΔG) demostrando processos favoráveis e espontâneos. O ensaio de hemaglutinação confirmou que a ConA permaneceu ativa nos lipossomas, uma vez que o Lipo-ConA e o Lipo-PEG-ConA foram capazes de hemaglutinar as hemácias em 128^{-1} e 256^{-1}, respectivamente, fato não observado com os lipossomas sem ConA. Finalmente, imagens obtidas a partir da microscopia de fluorescência indicaram uma maior captura dos lipossomas revestidos com ConA pelas células MCF-7 após 15 minutos e 24 horas de incubação. Portanto, a captura dos lipossomas pelas células MCF-7 foi influenciada pela presença da ConA na superfície dos mesmo, sugerindo a sua aplicação como um promissor sistema sítio-específico para direcionar a β-lap às células cancerígenas.

Palavras-chave: Lipossomas. β-lapachone. Concanavalina A. ITC. Células MCF-7.

ABSTRACT

New and effective strategies for the treatment of cancer are currently a big challenge. Among the available anticancer molecules in the market, β-lapachone (β-lap) has attracted attention for its potent antitumor activity. The encapsulation of β-lap in site-specific liposomes is an alternative to improving therapeutic efficacy by targeting to the cancer cells, promoting a reduction of adverse effects. The aim of this work was to encapsulate β-lap in site-specific liposomes using Concanavalin A (ConA) as a targeting molecule to cancer cells. Liposomes with total lipid concentration of 60 mM were prepared by the lipid film hydration method followed by sonication. Using same method, liposomes containing β-lap (0.5 mg / mL) were produced. Mean vesicle diameter, zeta potential, ConA conjugation and encapsulation efficiency (EE%) of β-lap in liposomes were evaluated. Isothermal titration calorimetry (ITC) was used to measure the binding energy between the biomolecules, which compose the liposomes. ConA activity was evaluated before and after the surface conjugation of the liposomes by the hemagglutination assay. Finally, the uptake of ConA-coated liposomes by human breast cancer cells (MCF-7) was performed by fluorescence microscopy. Uncoated and ConA-coated liposomes showed size and zeta potential ranging from 97.46 ± 2.01 nm to 152.23 ± 2.73 nm and -6.83 ± 0.28 mV at -17.23 ± 0 , 64 mV, respectively. The conjugation of ConA and EE% of β-lap were approximately 100%. The confirmation of lipid and ConA conjugation by thermodynamic parameters (ΔH, ΔS and ΔG) was determined by favorable and spontaneous process. Hemagglutination assay confirmed that ConA remained active in the liposomes, once Lipo-ConA and Lipo-PEG-ConA were able to hemagglutinate red blood cells at 128^{-1} and 256^{-1}, respectively, this fact was not observed with liposomes without ConA. Finally, images obtained from fluorescence microscopy indicated a greater capture of the ConA coated liposomes by MCF-7 cells after 15 minutes and 24 hours of incubation. Therefore, the capture of liposomes by MCF-7 cells was influenced by the presence of ConA on the surface of them, suggesting its application as a promising site-specific system to direct β-lap to the cancer cells.

Keywords: Liposomes. β-lapachone. Concanavalin A. ITC. MCF-7 cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Estágios do processo de carcinogênese (iniciação, promoção e progressão) e as ocorrências em cada etapa. 19
Figura 2. Disseminação do tumor formando a metástese. 21
Figura 3. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma* 22
Figura 4. Fotomicrografia da microscopia óptica do cristal da β-lapachona. 26
Figura 5. Síntese da β-lapachona utilizando um ácido protonado. 26
Figura 6. As funções bioquímicas múltiplas e gerais da NQO1 na proteção contra o desenvolvimento do câncer. 28
Figura 7. Ciclo redox da β-lapachona. 29
Figura 8. Representação esquemática de sistemas de liberação controlada. 33
Figura 9. Farmacocinética comparativa de formas farmacêuticas convencionais e de liberação controlada. 34
Figura 10. Esquema ilustrativo de lipossoma, demonstrando compartimentos aquosos internos contendo fármacos hidrofílicos e fármacos lipofílicos retidos na bicamada lipídica. 35
Figura 11. Estrutura química e representação esquemática do fosfolipídeo. 36
Figura 12. Classificação dos lipossomas quanto ao tamanho e número de lamelas. 37
Figura 13. Classificação dos lipossomas quanto à constituição: **A-** Lipossomas convencionais (**a** - fármaco hidrofílico na cavidade aquosa, **b-** fármaco lipofílico incorporado na bicamada lipídica); **B-** Lipossomas furtivos (**c-** PEG); **C-** Lipossomas sítio-específicos (**d-** ligante ancorado hidrofobicamente na porção terminal do PEG, **e-** ligante acoplado covalentemente ao fosfolipídeo reativo da membrana); **D-** Lipossomas direcionados de longa circulação. 38
Figura 14. Depuração dos lipossomas furtivos e convencionais através do sistema reticuloendotelial (RES) no fígado e baço. Os lipossomas convencionais sofrem uma maior degradação no sangue e uma depuração mais rápida através do RES comparado com os lipossomas PEGuilados. 39
Figura 15. Direcionamento passivo e ativo de nanopartículas em tumores através do efeito de permeabilidade e retenção (EPR). 44

Figura 16. Estruturas moleculares de Concanavalina A (ConA). (A) As estruturas primária e secundária do ConA; (B) A estrutura tridimensional da ConA; (C) A estrutura quaternária de ConA.....51

CAPÍTULO 1

Figure 1. Scheme of the liposomal formulation designs. 63
Figure 2. Typical ITC data corresponding to the binding interaction of I) 0.3 mM of free ConA with 10 mM of DPPE-Cyanur lipid; II) 0.117 mM of ConA-coated liposomes with 2.925 mM of MeαMan; and III) 0.3 mM of free ConA with 5.85 mM of MeαMan at pH 8.0 and 25 °C. Exothermic heat flows occurring upon successive injection of 2 µl aliquots of ligand into sample cell containing ConA-receptor (top). Down: Integrated heat profile of the calorimetric titration. The solid line represents the best nonlinear least squares fit to a single binding site model. Heat flows accounting for dilution effects of the ligand solution in the mPBS only were further subtracted from each experimental heat flow (down). 73
Figure 3. Thermodynamic signatures for three different ligand binding with ConA. I) 0.3 mM of free ConA with 10 mM of DPPE-cyanur lipid; II) 0.117 mM of ConA-coated liposome with 2.925 mM of MeαMan; and III) 0.3 mM of free ConA with 5.85 mM of MeαMan. White, grey and black represent enthalpy (ΔH), entropy effect (-TΔS) and Gibbs free energy (ΔG), respectively, according to a single binding site model. 75
Figure 4. A-D) Fluorescence images (Magnification 20x) of MCF-7 cells treated with either Lipo-ConA or Lipo-Cyanur. From left to right: Visible Light, blue and red channels. Control cells without treatment; A) and B) MCF-7 cells treated with Lipo-Cyanur (A) and Lipo-ConA (B) for 15 minutes; C) and D) MCF-7 cells treated with Lipo-Cyanur (C) and Lipo-ConA (D) for 24 hours. D) Box: MCF-7 cells treated with Lipo-ConA for 24 hours (Magnification 40x) imaged in the Blue channel (1), red channel (2) and overlapped image. Blue: DAPI stained nuclei. Red: Rhodamine B stained cells. 78

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1. Atividade citotóxica (IC_{50}) da β-lapachona em diferentes linhagens de células tumorais. 31

CAPÍTULO 1

Table 1. Characterization of liposome formulations before and after ConA conjugation. 69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina tri-fosfato
β-lap	β-lapachona
CHOL	Colesterol
ConA	Concanavalina A
CSF	Líquido cefalorraquidiano
DAPI	4 ',6- diamidino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.P.	Desvio padrão
DPPE-Cianur	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(cianur)
DSPE-PEG2000	Diestearoil-fosfatidiletanolamina-polietilenoglicol 2000
DSPE-PEG-Cianur	1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[cianur (polietilenoglicol)-2000]
EE	Eficiência de encapsulação
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidérmico humano
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano
FDA	Food and Drug Administration
FBS	Soro bovino fetal
IC_{50}	Concentração para inibir 50% do crescimento celular
ITC	Calorimetria de titulação isotérmica
HER	Human epidermal growth factor receptor
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LUV	Vesículas unilamelares grandes
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
MeαMan	Metil-α-D-manopiranosídeo
MLV	Vesículas multilamelares grandes
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
mV	Milivolt

MWCO	Molecular weight cut-off
nm	nanômetros
PBS	Tampão Fosfato Salino
PEG	Polietilenoglicol
RBC	Glóbulos vermelhos
RE	Receptor de estrogénio
RP	Receptor de progesterona
SATA	N-succinimidil-S-acetiltioacetato
SMF	Sistema mononuclear fagocitário
TsT	2,4,6-Tricloro-1,3,5-triazina
UV	Ultravioleta
MLV	Vesículas multilamelares grandes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
2 REVISÃO DA LITERATURA 19
2.2 CÂNCER 19
2.2.1 Prevalência 21
2.2.2 Tratamento 23
2.3 QUINONAS: β-LAPACHONA 24
2.3.1 Características gerais 25
2.3.2 Atividades Farmacológicas 26
2.3.3 Atividades antiproliferativa e antitumoral 27
2.4 NANOTECNOLOGIA E SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA 32
2.4.1 Lipossomas 34
2.4.2 Classificação dos lipossomas 37
2.4.3 Lipossomas sítio específicos na terapia do câncer 43
2.5 LECTINAS 48
2.5.1 Aspectos históricos 48
2.5.2 Definição e classificação 49
2.5.3. Concanavalina A (ConA) 50
3 OBJETIVOS 55
3.1 OBJETIVO GERAL 55
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 55
4 CAPÍTULO 1: ConA-coated liposomes as a system to target β-lapachone to breast cancer cells 57
5 CONCLUSÕES FINAIS 85
REFERÊNCIAS 88
ANEXO A – Artigo publicado 104

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O câncer, denominação geral dada a um conjunto de mais de 100 doenças que apresentam em comum o crescimento desordenado de células capazes de invadir outros tecidos, é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, sendo um importante problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento (NCI, 2015). O câncer é responsável por 8,2 milhões de óbitos a cada ano, o que representa cerca de 13% de todas as causas de morte no mundo. Dentre os cânceres mais frequentes estão o câncer de pulmão, seguido do câncer mama feminina, câncer de intestino e de próstata (FERLAY et al., 2015). O câncer de mama é o mais comum entre as mulheres, respondendo por 28,1% dos casos novos a cada ano (INCA, 2015).

Atualmente, diferentes agentes quimioterápicos são utilizados de forma eficaz para a terapia anticancerígena, contudo, ainda exibem baixa especificidade em atingir o tecido tumoral, além de frequentemente serem restritos por uma toxicidade dose-limitante. Desta forma, a patologia do câncer tem estimulado os pesquisadores a buscar novos agentes anticancerígenos, assim como novas estratégias para o estabelecimento da terapia (PARHI; MOHANTY; SAHOO, 2012). Para este efeito, moléculas vem sendo exploradas visando evitar a resistência, as doses elevadas, assim como visando reduzir os possíveis efeitos colaterais indesejados (TUREK et al., 2016).

Entre as moléculas anticancerígenas disponíveis, a β-lapachona tem atraído a atenção por suas propriedades químicas e biológicas. Demonstrou-se que este composto bioativo natural apresentou uma variedade de atividades farmacológicas com potencial terapêutico, como antiinflamatória (MORENO et al., 2015), antibacteriana (CAVALCANTI et al., 2015; LOURENÇO et al., 2011), antischistosoma (AIRES et al., 2014), fungicida (BRILHANTE et al., 2016), antimalárica (SHARMA et al., 2013) e leishmanicida (GUIMARÃES et al., 2013). Além disso, a β-lapachona tem sido uma das naftoquinonas mais estudadas devido a sua notável atividade antineoplásica contra várias linhagens de células cancerígenas (LAMBERTI et al., 2013a; LI et al., 2011a; WOO; CHOI, 2005), principalmente células humanas de câncer de próstata, mama, pulmão, melanoma e leucemia (LI et al., 1999, 2000; YU et al., 2014).

Apesar do seu potencial terapêutico, a β-lapachona apresenta limitações como baixa solubilidade em água (MA et al., 2015) e toxicidade (ALMEIDA et al., 2009). Desta forma, preparações farmacêuticas que visem aumentar sua solubilidade em água e minimizar sua toxicidade são uma alternativa para garantir o seu uso na terapêutica.

Paralelamente à exploração de novas moléculas, tem sido amplamente descrito o interesse em encapsular estas moléculas em sistemas de liberação controlada de fármacos. Dentes estes, os lipossomas despertam interesse pela sua constituição e versatilidade, além de potencializar a eficácia das moléculas e evitar possíveis efeitos adversos (SALIM et al., 2014). Utilizando esta estratégia, Cavalcanti e colaboradores (2011) encapsularam a β-lapachona e o seu complexo de inclusão com hidroxipropil-β-ciclodextrina em lipossomas convencionais. Apesar dos resultados interessantes, sabe-se que os lipossomas convencionais são rapidamente reconhecidos pelas opsoninas e eliminados da circulação sanguínea pelas células do sistema de fagócitos mononucleares (SMF) (NAKAMURA et al., 2015). Por esta razão, modificações nos lipossomas a partir da adição de polímeros solúveis em água, tais como polietilenoglicol (PEG) e / ou a adição de moléculas específicas tais como anticorpo, polissacárido ou proteínas, são interessantes para conter a rápida metabolização (ALLEN; CULLIS, 2013). A modificação da superfície dos lipossomas tem como objetivo principal aumentar o tempo de circulação e/ou direcionar o fármaco passiva ou ativamente a tecidos ou células alvo (TORCHILIN, 2010).

Lipossomas sítio-específicos podem ser desenvolvidos utilizando moléculas como anticorpos, proteínas, peptídeos e carboidratos ligados covalentemente à sua superfície (EDWARDS; BAEUMNER, 2006). Dentre estas, as lectinas demostraram ser uma excelente alternativa para o direcionamento de fármacos pela sua especificidade de ligação a carboidratos presente na superfície celular. A estratégia para a liberação de fármacos em um local alvo mediado por lectinas baseia-se na sua especificidade de ligação à estruturas do glicocálix, que são importantes nos processos celulares, tais como diferenciação e reconhecimento, inflamação e resposta imunitária (MAUCERI et al., 2014). Além disso, os carboidratos apresentam-se de forma abundante em muitas células cancerígenas, proporcionando uma abordagem interessante para direcionar sistemas de liberação controlada de fármacos (TARBELL; CANCEL, 2016).

Entre a família das lectinas, a Concanavalina A (ConA) é uma das mais estudadas. Trata-se de uma lectina vegetal isolada das sementes do feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), com especificidade de ligação para D-manose e D-glicose (SHARON; LIS, 2004). Além disso, a ConA foi anteriormente descrita como indutora de apoptose via mitocondrial (LI et al., 2010), autofagia em células de hepatoma (HANNIGAN et al., 2009) e anti-angiogênese (AMIN et al., 2003; SINA et al., 2010).

Com base na potente atividade antitumoral da β-lap, na especificidade da ConA pelos receptores de carboidrato, a modificação da superfície dos lipossomas a partir do uso desta lectina torna-se uma estratégia para direcionar a β-lap às células cancerígenas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver lipossomas sítio-específico utilizando a ConA como

molécula sinalizadora, para a encapsulação da β-lap, com a finalidade de direcionar este fármaco às células cancerígenas. Ademais, procuramos avaliar os parâmetros termodinâmicos envolvidos na ligação da ConA, assim como a captura dos lipossomas pelas células de câncer de mama (MCF-7).

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

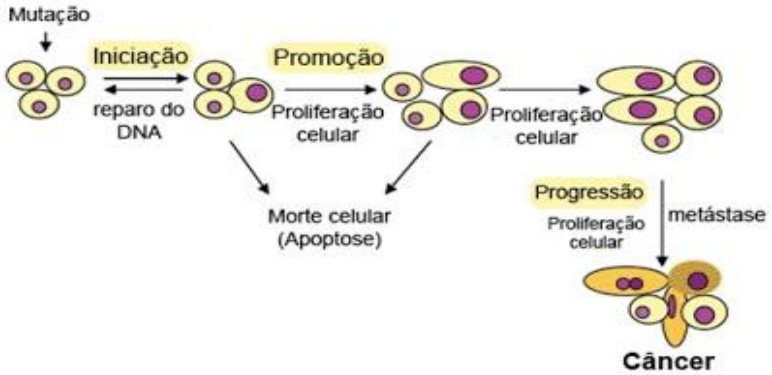
2.2 CÂNCER

Câncer é um termo usado para um grupo heterogêneo e complexo de doenças que envolve várias alterações genéticas e anormalidades celulares que proporcionam crescimento e progressão celular descontrolada levando a formação de uma massa de células cancerígenas chamada de tumor (MOHANTY et al., 2011).

Existem mais de 100 tipos diferentes de câncer, onde a maioria são nomeados de acordo com o órgão ou tipo de célula onde foram formados. Ademais, o paciente pode vir a ter um conjunto de mutações em vários genes diferentes, o que pode levar a diferentes subtipos deste câncer (JURCA et al., 2016). No entanto, a presença de apenas uma alteração na informação genética não é suficiente para levar ao desenvolvimento do câncer, o qual necessita de múltiplas etapas com acúmulo de alterações celulares. Essas, por sua vez, vão conferindo habilidades competitivas em relação as células normais, passando então as células modificadas a ignorar os sinais do organismo que interrompem a divisão celular, se multiplicando indefinidamente resultando na destruição dos tecidos saudáveis adjacentes, tornando-se invasivas (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O processo de formação do câncer é chamado de carcinogênese ou oncogênese e, em geral, acontece lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa se prolifere e dê origem a um tumor visível (COLEMAN; TSONGALIS, 2006). O modelo mais aceito atualmente par explicar o processo de carcinogênese é o da iniciação, promoção e progressão (Figura 1).

Figura 1. Estágios do processo de carcinogênese (iniciação, promoção e progressão) e as ocorrências em cada etapa.



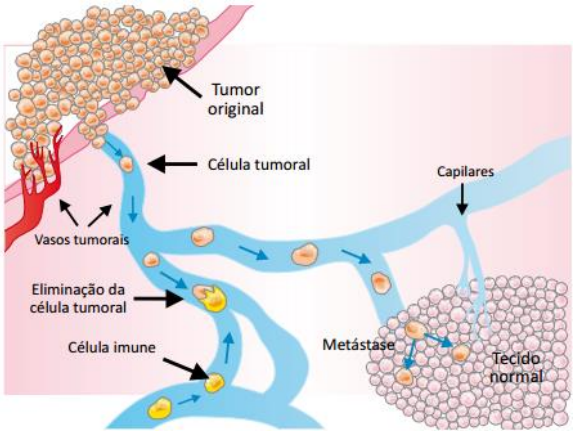
Fonte: Adaptado de Oliveira et al. (2007)

Os efeitos cumulativos de diferentes agentes carcinogênicos são os responsáveis pelo início, promoção e progressão do tumor. A carcinogênese é determinada pela exposição a esses agentes, sob um longo período e com alta frequência, e pela interação entre eles, que resultarão no desenvolvimento de múltiplas mutações genéticas. A primeira etapa desse processo é a iniciação, no qual as células sofrem alterações genotípicas e fenotípicas sucessivas (com indução de proliferação, mas não de diferenciação), pela influência dos agentes carcinogênicos. Nesta fase, as células iniciadas podem permanecer latentes durante semanas, meses ou anos, ou podem crescer de forma autónoma e clonal. A continuação do processo depende da dose carcinogênica, quanto maior a exposição aos agentes carcinogênicos maior a incidência e a multiplicidade de neoplasias resultantes, reduzindo o período latente de sua manifestação (OLIVEIRA et al., 2007).

No segundo estágio do processo de carcinogênese, chamado de promoção, os agentes cancerígenos oncopromotores (proto-oncogens) provocam o aumento da proliferação celular em tecido susceptíveis, contribuindo para o desenvolvimento de mutações e alterações na expressão genética. Para que ocorra essa transformação, é necessário um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor. A promoção é um estágio reversível, após a suspensão de um promotor pode ocorrer uma regressão na proliferação celular, provavelmente por apoptose (COLEMAN; TSONGALIS, 2006; INCA, 2011).

A progressão é o terceiro e último estágio da carcinogênese. A progressão do tumor se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas geneticamente, além de alterações nas características bioquímicas, metabólicas e morfológicas das mesmas. Neste estágio o câncer está instalado e a proliferação celular é independente da presença de estímulos, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença. É durante a progressão do tumor que algumas células escapam da massa tumoral primária e colonizam outros tecidos, produzindo tumores secundários conhecidos como metástases (Figura 2) (OLIVEIRA et al., 2007). Estes assentamentos distantes de células tumorais são a causa de 90% das mortes por câncer no homem (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Figura 2. Disseminação do tumor formando a metástese.



Fonte : INCA (2011).

2.2.1 Prevalência

O câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, sendo um importante problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento (JEMAL; BRAY; FERLAY, 2011; TORRE et al., 2015). De acordo com estimativas da *International Agency for Research on Cancer* (IARC), a incidência de câncer aumentou de 12,7 milhões em 2008 para 14,1 milhões em 2012, e estima-se que até 2030, 23,6 milhões de novos casos devem ser diagnosticados em todo mundo. Embora mais de 60% dos casos de câncer do mundo ocorram em países em desenvolvimento, como África, Ásia e América Central e do Sul, a taxa de incidência mais alta (excluindo o câncer de pele não-melanoma) ocorre em países de alta renda da América do Norte e da Europa Ocidental, juntamente com o Japão, a República da Coréia, a Austrália e a Nova Zelândia (STEWART; WILD, 2014).

Em termos de mortalidade, o câncer é responsável por 8,2 milhões de óbitos a cada ano, representando cerca de 13% de todas as causas de morte no mundo, dos quais 65% ocorrem nos países em desenvolvimento econômico. Em 2012, as causas mais comuns de morte por câncer em todo o mundo, para ambos os sexos, foram o câncer de pulmão (1,6 milhões), seguido do de fígado (745 mil), de estômago (723 mil), do câncer de intestino (694 mil) e de mama (522 mil) (FERLAY et al., 2015).

Os tipos de cânceres mais incidentes no mundo em 2012 foram o câncer de pulmão (1,8 milhões), seguido do de mama (1,7 milhões), do câncer de intestino (1,4 milhões) e de próstata (1,1 milhões). A taxa geral de incidência de câncer padronizada por idade é quase 25% maior nos homens que nas mulheres, equivalente a 205 e 165 casos por 100.000 habitantes,

respectivamente. Entre os homens, os cinco locais mais comuns de câncer diagnosticados em 2012 foram o pulmão (16,7% do total), próstata (15,0%), intestino (10,0%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%). Entre as mulheres, o câncer de mama apresentou uma incidência substancialmente mais elevada (25,2% do total) quando comparada aos demais cânceres, com mais casos ocorrendo em regiões menos desenvolvidos (883 mil casos) do que mais desenvolvidas (794 mil casos). Mesmo sendo o segundo câncer mais comum no mundo, o de mama ocupa o quinto lugar como causa de morte (522 mil casos, 6,4 %) devido ao seu prognóstico relativamente favorável. Entretanto, na população feminina, possui a maior incidência e a maior mortalidade, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos (FERLAY et al., 2015).

A estimativa para o Brasil no biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 420 mil casos novos de câncer, excetuando-se o câncer de pele não melanoma. O perfil epidemiológico observado assemelha-se ao da América Latina e do Caribe, onde os cânceres de próstata em homens e mama em mulheres serão os mais frequentes (Figura 3). Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer, em 2016, no Brasil, foram esperados 57.960 novos casos de câncer de mama, com um risco de 56,30 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2015).

Figura 3. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%	Homens	Mulheres	Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.
Fonte: INCA (2015).

O Brasil vem passando, nas últimas décadas, por alterações de contexto social, econômico e, consequentemente de saúde. O aumento da expectativa de vida, a melhoria e a evolução dos métodos diagnósticos podem explicar o crescimento das taxas de incidência ao longo dos anos no país. Além disso, a melhoria da qualidade dos sistemas de informação do país e a ocorrência de sobre diagnóstico, em função da disseminação do rastreamento dos diferentes tipos de câncer também influenciam na magnitude da doença, auxiliando no tratamento precoce e a cura do paciente (INCA, 2015).

2.2.2 Tratamento

O câncer é uma doença complexa, apresentando um alto grau de heterogeneidade. Os tumores humanos são histopatologicamente diversos, contendo regiões demarcadas por vários graus de diferenciação, proliferação, vascularização, inflamação e/ou invasividade (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Esta heterogeneidade diminui drasticamente a eficácia do tratamento de muitas terapias clássicas empregadas contra o câncer.

O tipo de tratamento utilizado dependerá do tipo de câncer, e do seu nível de invasividade. Em alguns casos, apenas um tratamento é necessário, mas na maioria das vezes é imprescindível uma combinação (NCI, 2015). A cirurgia e radioterapia são considerados os principais tratamentos, visando remover todas as células dentro de um determinado volume de tumor e os tecidos circunvizinhos afetados. Entretanto, dificilmente a cirurgia é suficiente e, geralmente, é inevitável a permanência de células residuais afetadas (ESTANQUEIRO et al., 2015).

A quimioterapia é a terceira opção, sendo utilizada como adjuvante à cirurgia e radioterapia. As quimioterapias, conhecidas também como terapia antineoplásica ou citotóxica, destinam-se a um fenótipo biológico de células cancerígenas, especificamente a sua natureza altamente proliferativa (IVEY et al., 2015).

Atualmente, diferentes agentes quimioterápicos são eficientemente utilizados na terapia anticancerígena atuando através de mecanismos específicos, como inibição da polimerização da tubulina, danos ao DNA, bloqueadores enzimáticos ou de microtúbulos celulares (BRANDÃO et al., 2010). Contudo, o tratamento repetido com estes fármacos isolados pode resultar em resistência às quimioterapias ou desenvolvimento de resistência a múltiplos fármacos, sendo uma das principais razões para o insucesso do tratamento. Para tentar dominar esta limitação, são muitas vezes administradas as doses máximas permitidas, conduzindo a efeitos secundários adversos, devido à acumulação inespecífica nos tecidos saudáveis, ficando assim comprometida a eficácia do tratamento (RODON; PEREZ; KURZROCK, 2010). Por estas razões, a combinação de terapias pode ser uma estratégia, que pode trazer benefícios ao permitir um aumento da eficácia, e simultaneamente uma diminuição da toxicidade associada.

Ao longo dos anos, a terapia de combinação tem sido adotada como estratégia ao tratamento do câncer utilizando um único quimioterápico. A terapia de combinação refere-se geralmente a dois ou mais agentes terapêuticos co-administrados simultaneamente ou a combinação de diferentes terapias, tais como quimioterapia, terapia hormonal, imunoterapia e radioterapia. Acima de todas as abordagens, a co-distribuição de diferentes agentes

quimioterapêuticos é a modalidade terapêutica de combinação mais comum na prática clínica relativamente ao tratamento eficaz do câncer (PARHI; MOHANTY; SAHOO, 2012).

Embora as estratégias quimioterapêuticas de combinação ajudem até certo ponto no direcionamento ao melhor tratamento do câncer, apresentam como desvantagens a inadequada acessibilidade de agentes antineoplásicos ao tecido tumoral, proveniente a rápida eliminação do organismo, baixa solubilidade dos fármacos utilizados, resultando em uma baixa biodisponibilidade, sendo necessário a administração de doses elevadas (NAZIR et al., 2014). Deste modo, para minimizar a dificuldade associada a quimioterapia convencional, sistemas de administração de fármacos que possam optimizar a ação farmacêutica enquanto reduz os efeitos secundários tóxicos passaram a ser desenvolvidos (ESTANQUEIRO et al., 2015). A aplicação da nanotecnologia à administração de fármacos para o câncer é a nova estratégia terapêutica de escolha para o tratamento do câncer.

Desde a antiguidade, a capacidade de tratar e curar doenças humanas com extratos, pós, óleos e raízes da flora circundante tem sido amplamente reconhecida na prática médica. Os produtos naturais nestas plantas, fungos e bactérias têm sido a fonte de drogas valiosas para algumas das doenças mais importantes que afetam a humanidade e serviram como andaimes para transformações sintéticas em compostos mais ativos. Os produtos naturais desempenham hoje um papel relevante na terapia do câncer com um número substancial de agentes anticancerosos utilizados na clínica. Durante os últimos anos, a descoberta de fármacos baseada em produtos naturais está aumentando com base em novas tecnologias, como síntese combinatória e rastreio de alto rendimento, e suas abordagens associadas (NOBILI et al., 2009). Dentre os inúmeros fármacos derivadas de plantas, as quinonas são conhecidas por possuírem atividade anticancerígena promissora, que poderia ser explorada para desenvolver novas estratégias terapêuticas contra o câncer de mama (SILVA; FERREIRA, 2016).

2.3 QUINONAS: β-LAPACHONA

As quinonas constituem uma importante classe de metabólitos secundários que ocorrem naturalmente, sendo encontradas em plantas, fungos e bactérias (THOMSON, 1997). A principal fonte biogênica de quinonas são vegetais (folhas, galhos, raízes) e muitos tiveram seus extratos empregados desde a antiguidade pela medicina popular no tratamento de diversas enfermidades (SOUSA; LOPES; ANDRADE, 2016).

Quinonas naturais despertam interesse pela sua importância nos processos bioquímicos vitais dos seres humanos, vegetais superiores, artrópodes, fungos, líquens, bactérias e algas,

participando da cadeia transportadora de elétrons envolvida na respiração celular e fotossíntese, assim como na coagulação sanguínea e carboxilação do glutamato nas células (O'BRIEN, 1991; MONKS et al., 1992). Nos últimos anos, o interesse nesses metabólitos naturais intensificou-se devido aos resultados obtidos em variados estudos farmacológicos, demostrando suas atividades anticancerígenas, antibacterianas, antifúngicas e tripanossomicidas (SILVA; FERREIRA, 2016).

A estrutura das quinonas apresenta dois grupamentos carbonilas em um anel insaturado de seis átomos de carbono, situados relativamente em posições "orto" ou "para". Utilizando-se como critério o tipo de anel aromático, as quinonas são classificadas como benzoquinonas quando apresentam um anel benzênico; as naftoquinonas que apresentam um anel naftaleno; antraquinonas, um anel antracênico linear ou angular; e finalmente as fenantraquinonas, as quais apresentam um anel fenantrênico. Estas formas isoméricas diferem substancialmente em suas características físico-químicas e atividades biológicas (LU et al., 2013).

Dentre as naftoquinolonas, o lapachol destaca-se por ser considerado um dos principais representantes dos produtos naturais encontrados em plantas do gênero *Tabebuia*. O lapachol foi isolado pela primeira vez por Paterno em 1882, a partir de extração ácido-base da serragem ou lascas do cerne da árvore *Tabebuia avellanedae* (Bigoniaceae), popularmente conhecida como Ipê-Roxo ou Pau d'arco, árvore nativa da América do Sul com alta frequência no Brasil (PARDEE; LI; LI, 2002; CASTRO et al., 2013). A sua estrutura química foi estabelecida desde 1896, por Hooker, o qual o identificou como uma naftoquinona, a 2-hidroxi-3-(e-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona, de peso molecular 242,26 Da, que através da ação controlada do calor, fornece em sequência a desidrolapachona (xiloidona) e os isômeros α- e β-lapachona (D'ALBUQUERQUE, 1968).

2.3.1 Características gerais

A β-lapachona (β-lap) ($C_{15}H_{14}O_3$, PM 242,3 Da) é uma orto-naftoquinona isômera do lapachol, conhecida quimicamente por 3,4-diidro-2,2-dimetil-2H-naftol(1,2-b)pirano-5,6-diona. Apresenta forma cristalina laranja-avermelhada (Figura 4), com absorção máxima no ultravioleta em 256 nm, e ponto de fusão característico em 154,5 – 155,5 °C, sendo estável em um variação de pH de 3 a 9 (PARDEE; LI; LI, 2002; ALVES et al., 2008). A β-lap é uma molécula lipofílica, com baixa solubilidade em água (0,038 mg/mL), o que limita sua aplicação clínica (NASONGKLA et al., 2003). Além disso, Almeida e colaboradores (2009) ao investigarem o efeito da β-lap livre em ratas Wistar grávidas e não-grávidas, observaram

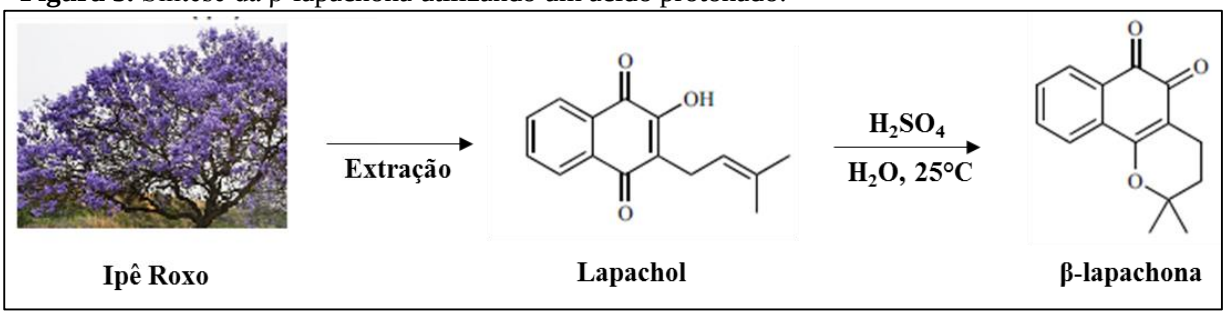
malformações nos embriões, além de alterações hematológicas e bioquímicas, com danos no fígado e baço (ALMEIDA et al., 2009).

Figura 4. Fotomicrografia da microscopia óptica do cristal da β-lapachona.

Fonte: Cunha-Filho, Martínez-Pacheco e Landín (2013).

Por estar presente em pequenas quantidades *in natura*, a β-lap pode ser obtida a partir de uma semi-síntese do lapachol através de hidrólise a frio com ácido sulfúrico, apresentando rendimento de 90% (JIANG et al., 2004). Ou ainda, pode ser obtida utilizando-se ácidos de Lewis ($NbCl_5$, $AlCl_3$ e $FeCl_3$) obtendo a ciclização do lapachol em β-lap com alta regiosselectividade e excelente rendimento (98%), sem formação do isómero α-lapachona que, segundos relatos descritos na literatura, não apresenta atividade biológica significativa (BIAN et al., 2014) (Figura 5).

Figura 5. Síntese da β-lapachona utilizando um ácido protonado.



Fonte: Adaptado de Silva e Ferreira (2016).

2.3.2 Atividades Farmacológicas

As características químico-estruturais das naftoquinonas estão diretamente relacionadas a potência da sua atividade farmacológica, seja como antimicrobiano, antineoplásico ou de toxicidade, podendo ser inativado pela simples retirada de um metileno da cadeia isoprenóide. Este fato justifica o lapachol purificado ser menos ativo que o extrato bruto da *Tabebuia*

avellanedae, sugerindo um sinergismo de ações dos outros componentes, uma vez que, o seu derivado, a β-lap, apresenta uma maior atividade farmacológica, porém com maior grau de toxicidade (ARAÚJO; ALENCAR; NETO, 2002).

A β-lap tem atraído a atenção pelas suas propriedades químicas e biológicas, apresentando uma variedade de atividades farmacológicas com potencial terapêutico tais como: anti-inflamatória (MORENO et al., 2015), antibacteriana (CAVALCANTI et al., 2011, 2015), antischistosoma (AIRES et al., 2014), antifúngica (BRILHANTE et al., 2016), antimalaria (SHARMA et al., 2013), leishmanicida (GUIMARÃES et al., 2013), tripanocida (DOS ANJOS et al., 2016), cicatrizante (KUNG et al., 2008) e antineoplásica (LAMBERTI et al., 2013b).

2.3.3 Atividades antiproliferativa e antitumoral

Desde a descoberta de sua excelente atividade citotóxica e antiproliferativa, a β-lap tem se destacado na linha de pesquisa para obtenção de novos quimioterápicos contra várias linhagens de células cancerígenas, principalmente para o câncer de próstata (BLANCO et al., 2007; DONG et al., 2009), mama (GLORIEUX et al., 2016), pulmão (WOO; CHOI, 2005), gástrico (YU et al., 2014) e melanoma (BANG et al., 2016). No entanto, o mecanismo de ação exato da morte celular provocada pela β-lap ainda é desconhecido (RÍOS-LUCI et al., 2012), sendo a apoptose (LEE et al., 2011), necrose (SUN et al., 2006) ou autofagia (PARK; CHOI; KWON, 2011) os principais mecanismos responsáveis pelo efeito desta molécula.

O principal interesse na β-lap advém da sua capacidade de induzir o estresse oxidativo nas células, a partir da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela ação da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato:quinona oxidorredutase 1 (NQO1) (ALCAÍN; VILLALBA, 2007). A β-lap foi o primeiro composto terapêutico encontrado com um mecanismo de ação dependente de um ciclo catalisado por NQO1 (MA et al., 2015).

A NQO1 é uma flavoenzima citosólica pouco expressa em tecidos humanos, entretanto sua expressão pode ser 10 vezes maior em células tumorais de câncer de mama, pulmão, pâncreas, próstata, melanoma, coloretal e cervical (BENTLE et al., 2006a). Nos cânceres de mama, coloretal e cervical, verificou-se que os altos níveis de NQO1 podem estar associados com um estágio avançado da doença, a uma baixa diferenciação e a metástase nos linfonodos (MA et al., 2014; YANG et al., 2014a), demostrando seu potencial uso como biomarcador, podendo auxiliar no diagnóstico, na progressão do câncer, e mesmo em lesões pré-cancerígenas (AWADALLAH et al., 2008).

Entre as enzimas de fase II, a NQO1 tem sido amplamente estudada pelo seu efeito na prevenção da carcinogênese (ZHU; LI, 2012). As múltiplas e gerais funções bioquímicas da NQO1 na proteção contra a promoção e o início do câncer, podem ser resumidas em quatro categorias (Figura 7): (i) desintoxicação de substratos de quinona por redução de dois elétrons; (ii) remoção de radicais ânion superóxido; (iii) manutenção dos antioxidantes endógenos tais como ubiquinona e α-tocoferol; e (iv) estabilização das proteínas supressoras p53 / p73 / p33 (OH; PARK, 2015).

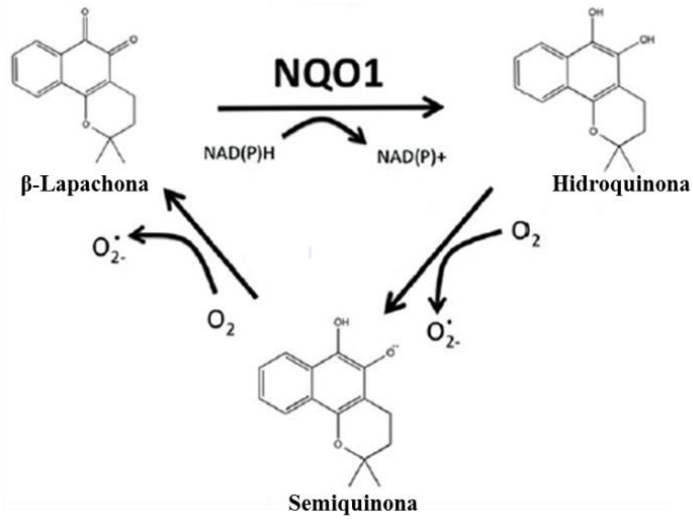
Figura 6. As funções bioquímicas múltiplas e gerais da NQO1 na proteção contra o desenvolvimento do câncer.

Fonte: Adaptado de Oh e Park (2015).

A função melhor descrita e amplamente aceita de NQO1 é, como o próprio nome sugere, a redução de quinonas. Com sua propriedade de transferir dois elétrons, utilizando nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NAD(P)H) ou nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) como cofator redutor, NQO1 catalisa as quinonas e quininoiminas naturais e exógenas em hidroquinonas. O que torna a β-lap única, quando comparadas a outras quinonas que são neutralizadas por NQO1, é que a forma hidroquinona resultante da β-lap é excepcionalmente instável e tóxica (MA et al., 2015). Em vez de ser conjugado e removido da célula, a forma de hidroquinona da β-lap reage espontaneamente com oxigênio em dois passos: primeiro, uma oxidação para a forma de semiquinona e, em seguida, uma reversão de volta para a quinona de origem, gerando um radical superóxido em cada uma das etapas da oxidação espontânea. Em resumo, estas reações formam um ciclo redox no qual a β-lap é convertida em uma hidroquinona por NQO1, oxidando NADH e NADPH, e a hidroquinona reverte de volta para β-lap, gerando superóxido (ALCAÍN; VILLALBA, 2007) (Figura 7). Os radicais superóxido ($O^{2.-}$) formados são rapidamente metabolizados pela superóxido dismutase (SOD) em H_2O_2 (SOUSA; LOPES;

ANDRADE, 2016). Os altos níveis de H_2O_2 formados causam danos a membrana celular através da peroxidação dos lipídeos e diminuição da capacidade antioxidanate celular, podendo danificar os ácidos nucleicos e quebrar as fitas de DNA (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003).

Figura 7. Ciclo redox da β-lapachona.



Fonte: Adaptada de Ma et al. (2015).

O ciclo redox entre as formas semiquinona e hidroquinona da β-lapachona provoca grave redução de NAD(P)H e NADH na célula, com consequente diminuição da concentração de adenosina trifosfato (ATP), o qual afeta outras vias do ciclo celular, resultando na morte celular por apoptose seletiva de células cancerígenas (PARK et al., 2005). Um outro fator relacionado ao desequilíbrio na estrutura e função celular é o aumento do Ca^{2+} citosólico, induzindo o estresse oxidativo, despolarização da membrana mitocondrial e bloqueio da síntese de ATP (ERMAK; DAVIES, 2002). Estudos iniciais demonstraram um aumento no Ca^{2+} citosólico após alguns minutos da administração de β-lap (TAGLIARINO et al., 2003), enquanto uma exposição de 2 h de β-lap foi suficiente para induzir a morte celular em células do câncer de mama (MCF-7) (BEY et al., 2013). Estudos de Bentle e colaboradores (2006b), mostraram que o mecanismo de toxicidade da β-lap está intimamente envolvido com alterações precoces nos níveis intracelulares de Ca^{2+}, provocando a morte celular.

Após a administração da β-lap, as células que expressam NQO1 lidam com uma variedade de estresses, dentre eles o estresse oxidativo induzido pelo ciclo oxidativo da quinona e alterações nos níveis intracelulares de Ca^{2+} resultando em danos ao DNA. Visando a sua recuperação, a célula desencadeia mecanismos de reparação do DNA, e como consequência a enzima poli(ADP-ribose)polimerase (PARP-1) é ativada. A PARP-1 é uma proteína nuclear importante na detecção de lesões presentes na fita simples do DNA, provenientes do dano

celular provocado por moléculas oxidantes e, assim, em manter a integridade do genoma. Uma vez ativada, PARP-1 catalisa a transferência intracelular de unidades de ADP-ribose a partir da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) para as proteínas nucleares, levando à formação de polímeros ADP-ribose. Como NAD^+ é essencial para a reação de transporte de elétrons, foi demonstrada que a super-ativação de PARP-1 pode conduzir a uma repressão da função mitocondrial levando ao déficit de energia, liberação do Fator de Indução de Apoptose (AIF), e eventualmente morte celular (CHIARUGI, 2002; YU et al., 2002; PENNING et al., 2009).

Estudos clínicos demonstraram uma correlação entre os níveis da proteína NQO1 em tumores e sua sensibilidade a β-lap, onde a morte celular mediada por β-lap requeria cerca de 90 unidades enzimáticas de NQO1 e que o nível endógeno de NQO1 afeta proporcionalmente a sensibilidade das células a β-lap (LI et al., 2011). Pink e colaboradores (2000) mostraram evidências que indicam a participação da enzima NQO1 no processo de ativação da β-lap na apoptose, aumentando assim a sua citotoxicidade. Eles constataram que ao adicionar nas culturas celulares um inibidor de NQO1 (dicoumarol) a apoptose era bloqueada. Ough e colaboradores (2005) observaram que a β-lapachona diminui a viabilidade em células cancerígenas de pâncreas que superexpresam a NQO1.

Desde a descoberta de sua excelente atividade antiproliferativa, a β-lap tem se destacado na linha de pesquisa de obtenção de novos quimioterápicos devido a sua eficácia *in vitro* frente a diferentes linhagens celulares cancerígenas humanas malignas (Tabela 1). Visando o tratamento do câncer de mama, estudos realizados com células MCF-7, demonstraram potente efeito anticancerígeno da β-lap por regulação positiva da expressão de NQO1, induzindo um aumento na apoptose e danos ao DNA, ao mesmo tempo que produzem alterações no ciclo celular (GLORIEUX et al., 2016; LAMBERTI et al., 2013a; SEOANE et al., 2013).

Tabela 1. Atividade citotóxica (IC_{50}) da β-lapachona em diferentes linhagens de células tumorais.

Linhagem Celular	IC_{50} (μM)	Referências
Câncer de colo-retal		
HCT-8	0,83	SILVA-JÚNIOR et al., 2007
Câncer de mama		
MCF-7	1,7	NASONGKLA et al., 2003
	3	BENTLE et al., 2007
	2,9	LAMBERTI et al, 2013
	0,65	GLORIEUX et al, 2016
MDA-MB-231	6,6	REINICKE et al., 2005
MDA-MB-435	0,25	SILVA-JÚNIOR et al., 2007
HBL-100	0,69	BONIFAZI et al., 2010
Câncer de próstata		
DU-145	7,4	EYONG et al., 2008
	4	LI et al., 1999
PC-3	3,5	REINICKE et al., 2005
LNCaP NQO1+	2,7	DONG et al., 2009
LNCaP NQO1-	11,8	DONG et al., 2009
Câncer de pulmão		
NCI-H23	0,76	YU et al., 2014
Câncer de ovário		
A2780DDP	~ 2	LI et al., 1999
	1,1	BONIFAZI et al., 2010
Melanoma		
Skmel-28	~ 4	LI et al., 1999
LOXIMVI	0,31	LI et al., 2011

Fonte: autoria própria.

A superexpressão de NQO1 em células cancerígenas torna a β-lap um candidato útil para a terapia direcionada ao tumor com toxicidades reduzidas para células e tecido saudáveis, uma vez que não apresentam ou expressam baixos níveis da enzima. Apesar da potência e seletividade do β-lap na morte de células cancerígenas contendo NQO1 *in vitro*, sua baixa solubilidade em água (0,038 mg / mL ou 0,16 mM) limita a aplicação *in vivo* (MA et al., 2015).

Com a finalidade de superar os desafios de solubilidade e biodisponibilidade da β-lap, pesquisas recentes têm voltado à atenção para a nanotecnologia com o intuito de alcançar formas mais eficientes de direcionar o fármaco para o alvo tumoral, diminuindo a dose

terapêutica e, em consequência, os efeitos adversos relacionados com a biodistribuição não específica do fármaco.

2.4 NANOTECNOLOGIA E SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA

O termo Nanotecnologia tem sua origem na palavra "nano" que significa "anão" em grego e representa a bilionésima parte do metro. Nanotecnologia é a ciência e a engenharia envolvidas na concepção, síntese, caracterização e aplicação de materiais e dispositivos a nível atômico, molecular ou macromolecular, cuja organização funcional, em pelo menos uma dimensão, está na escala nanométrica (0,1 a 100 nanômetros) (GRIMM; SCHEINBERG, 2011).

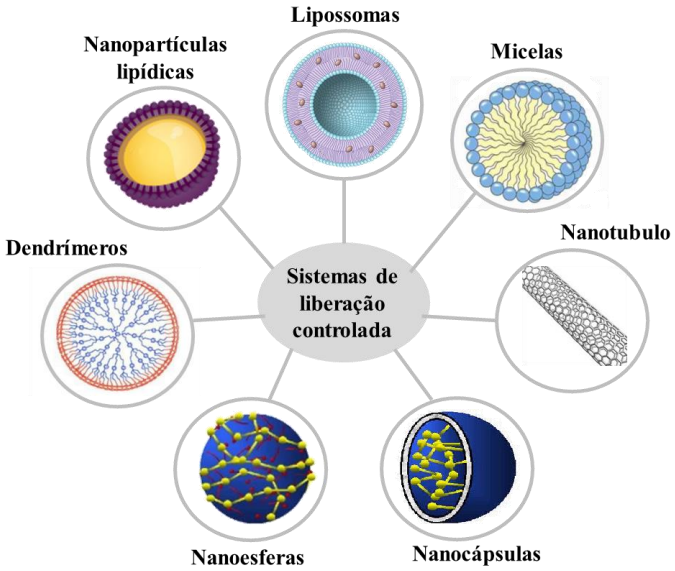
A nanotecnologia é um campo científico multidisciplinar que tem avançado rapidamente nos últimos anos, encontrando aplicações nas mais diversas áreas, desde setores de energia e eletrônica até a indústria farmacêutica (MOZAFARI et al., 2008; MU; SPRANDO, 2010). O princípio dessa ciência é que os materiais na escala nanométrica podem apresentar propriedades químicas, físico-químicas e comportamentais diferentes daquelas apresentadas em escalas maiores. As nanopartículas são projetadas na mesma escala de tamanho dos receptores, canais, ligantes, efetores e ácidos nucléicos e podem ser modificadas para alcançarem um determinado efeito fisiológico (MCNEIL, 2009).

Na área farmacêutica e médica, a nanotecnologia tem como objetivo o desenvolvimento de processos de diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças, bem como preservação da saúde humana através da utilização desses materiais na escala nanométrica (DUNCAN; GASPAR, 2011). O setor farmacêutico está envolvido no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica ou micrométrica. Estudos de tais sistemas têm sido realizados ativamente no mundo com o propósito de direcionar e controlar a liberação de fármacos visando melhorar sua eficácia terapêutica (MISHRA; PATEL; TIWARI, 2010; SAKATA et al., 2007).

A tecnologia associada à modificação da liberação de fármacos, ou de outras substâncias bioativas, a partir de preparações farmacêuticas sofreu um incremento notório nas últimas décadas na tentativa de maximizar as vantagens inerentes as formas farmacêuticas de liberação controlada (Figura 8). Preparações baseadas na escala nanométrica têm sido indicadas atualmente como a principal forma de aumentar o índice terapêutico via direcionamento do fármaco para o sítio de ação. Os nanosistemas possuem propriedades físicas (tamanho, carga e biocompatibilidade) que podem ser manipuladas para aumentar a meia vida de circulação do

fármaco e o seu acúmulo no local de ação, principalmente quando estão associadas com moléculas sinalizadoras (FARRELL et al., 2011).

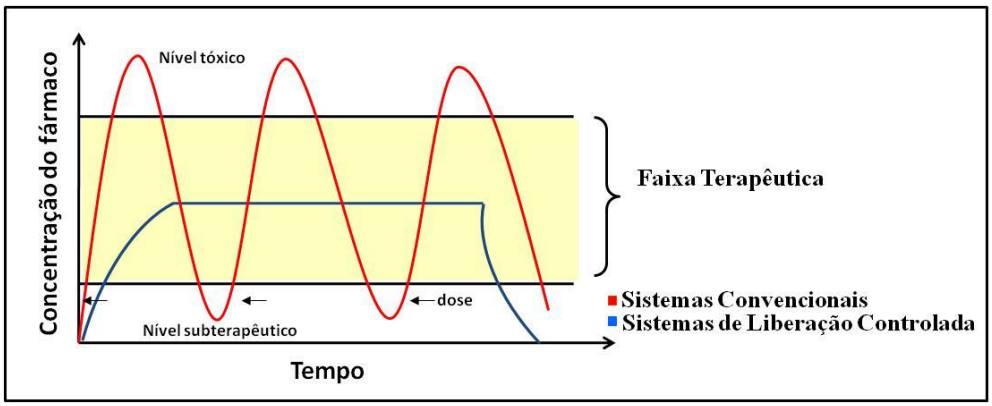
Figura 8. Representação esquemática de sistemas de liberação controlada.



Fonte: autoria própria.

Os sistemas de liberação controlada de fármacos caracterizam-se por oferecer uma liberação progressiva e controlada do princípio ativo, com manutenção do seu nível plasmático em concentrações constantes dentro da faixa terapêutica (Figura 9), aumentando a eficácia terapêutica, diminuindo de forma expressiva o aparecimento de níveis tóxicos e subterapêuticos, além da diminuição na instabilidade e decomposição dos fármacos sensíveis, possibilitando o direcionamento a alvos específicos e incorporação tanto de substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas nos sistemas. Os nanocarreadores possibilitam ainda um maior intervalo de administração, utilizando uma menor quantidade do princípio ativo (CARACCIOLO, 2015; TORCHILIN, 2005).

Figura 9. Farmacocinética comparativa de formas farmacêuticas convencionais e de liberação controlada.



Fonte: LIRA, 2007.

Diante destas vantagens, a aplicação dos sistemas nanométricos na administração de fármacos tem o potencial de revolucionar o tratamento de muitas doenças, como câncer (NAZIR et al., 2014), doenças cardiovasculares (ZHAORIGETU et al., 2014), diabetes tipo 1 (DOMÍNGUEZ; SUÁREZ-MERINO; GOÑI-DE-CERIO, 2014), infecções fúngicas (YANG et al., 2014b).

2.4.1 Lipossomas

Dentre as várias formas de sistema de liberação controlada de fármacos, os lipossomas vêm sendo estudados há mais de 50 anos e despertam grande interesse para pesquisa, aplicações analíticas e terapêutica (ALLEN; CULLIS, 2013), principalmente devido a sua composição, a qual os torna biocompatíveis e biodegradáveis (IMMORDINO; DOSIO; CATTEL, 2006).

Em 1960, Alec Bangham e colaboradores publicaram a primeira descrição de sistemas fechados de fosfolipídeos em solução aquosa (BANGHAM; STANDISH; WATKINS, 1965), estabelecendo um sistema modelo simples para o estudo de membranas biológicas (BANGHAM et al., 1967). Em poucos anos, foram descritas uma variedade de bicamadas fechadas de fosfolipídeos, inicialmente denominadas "bangossomas" e, em seguida, "lipossomas" (DEAMER, 2010).

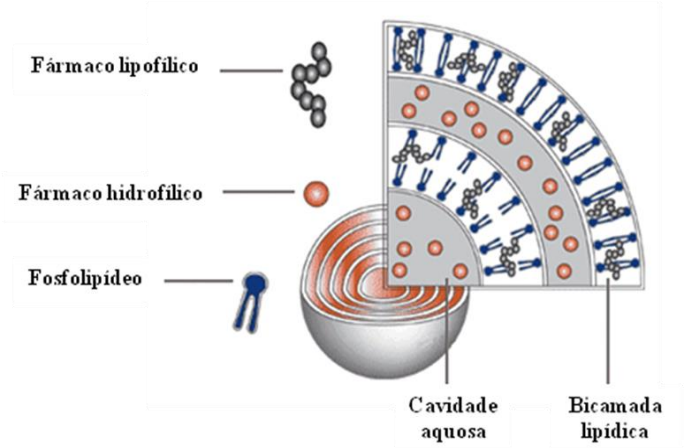
A utilização dos lipossomas como carreadores de fármacos foi proposta e demonstrada apenas na década de 70 por Gregory Gregoriadis. Ele começou a investigar a capacidade de encapsulação e posterior liberação de fármacos por vesículas lipossomais, propondo pela primeira vez, a utilização de lipossomas como sistema transportador de fármacos

(GREGORIADIS, 1976). Desde então estas vesículas tem sido usadas para uma série de aplicações farmacêuticas (PAROOEI et al., 2011; YOSHIZAWA et al., 2011).

Os lipossomas caracterizam-se como vesículas esféricas, de tamanhos variados (em escalas de nm e μm), constituídas de uma ou mais bicamadas concêntricas de fosfolipídeos, que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo (BRANDL; GREGORIADIS, 1994). Essa conformação promove a capacidade de incorporar uma variedade de compostos com características hidrofílicas e/ou lipofílicas (Figura 10). A incorporação dentro da vesícula lipídica promove uma proteção ao fármaco encapsulado contra possíveis processos de degradação seja, por exemplo, pela luz e ou por outros processos físico-químicos (TORCHILIN, 2005). Ademais, os lipossomas funcionam como um depósito a partir do qual o fármaco encapsulado é liberado lentamente ao longo do tempo, permitindo manter o nível terapêutico por períodos prolongados (STORM; CROMMELIN, 1998).

Os lipossomas são sistemas que apresentam uma versatilidade, cuja lamelaridade, tamanho, volume, superfície e composição (lipídica e do compartimento aquoso interno) podem ser manipulados em função dos requisitos farmacêuticos e farmacológicos. Além disso, são biodegradáveis e biocompatíveis (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007; EDWARDS; BAEUMNER, 2006).

Figura 10. Esquema ilustrativo de lipossoma, demonstrando compartimentos aquosos internos contendo fármacos hidrofílicos e fármacos lipofílicos retidos na bicamada lipídica.

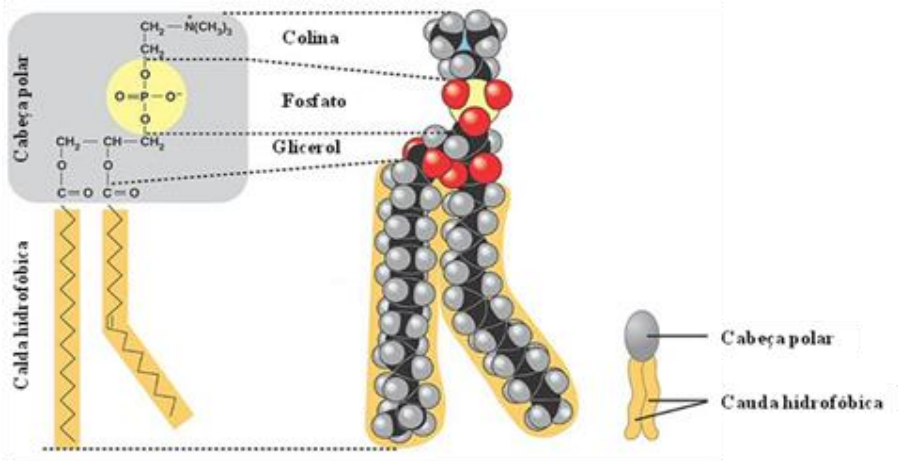


Fonte: Adaptado de http://nanogreenshawaii.com/supersorb/nanosorb.jpg.

As bicamadas lipídicas que compõem os lipossomas assemelham-se às membranas biológicas e podem ser preparadas a partir de lipídeos naturais ou sintéticos (VEMURI; RHODES, 1995). Os lipídeos estruturais mais comumente empregados na preparação de lipossomas são os fosfolipídeos, moléculas anfipáticas, que possuem uma “cabeça” polar

constituída pelo ácido fosfórico e uma "cauda" hidrofóbica composta por ácidos graxos de cadeia longa (Figura 11). O ácido fosfórico pode ser esterificado pela colina, serina, amina e glicerol, dando origem aos lipídeos mais utilizados nas formulações lipossomais como fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilamina e fosfatidilglicerol, respectivamente (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007; VEMURI; RHODES, 1995). Estes alcoóis conferem diferentes propriedades aos lipossomas visto que originam cadeias de diferentes tamanhos e graus de saturação (EDWARDS; BAEUMNER, 2006).

Figura 11. Estrutura química e representação esquemática do fosfolipídeo.



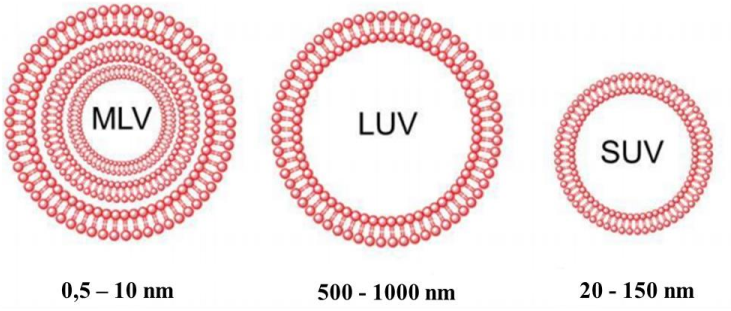
Fonte: Adaptado de avonapbio.pbworks.com.

Outro componente lipídico presente nas formulações lipossomais é o colesterol. Este é um componente relevante visto que influencia na fluidez e deformação da bicamada lipídica, diminuindo a permeabilidade e o extravasamento do fármaco encapsulado, permitindo assim, a produção de lipossomas mais estáveis (SHARMA; SHARMA, 1997). Lipídeos apresentando carga efetiva negativa ou positiva podem também ser incluídos na composição da membrana. A presença de cargas nos lipossomas pode influenciar a taxa de incorporação de substâncias, produzir repulsão eletrostática entre as vesículas lipídicas impedindo a agregação/fusão das mesmas e modular o seu destino no organismo, visto que a presença de uma carga eletrostática na superfície dos lipossomas promove a interação com biomoléculas e células, sendo então removidos mais rapidamente da circulação do que os lipossomas neutros (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007; LAVERMAN et al., 1999).

2.4.2 Classificação dos lipossomas

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com o tamanho das vesículas, ao número de lamelas e quanto à composição química. Assim, os lipossomas podem conter uma única bicamada lipídica ou bicamadas múltiplas em torno do compartimento aquoso interno e, portanto, são classificados em unilamelar e multilamelar, respectivamente. As vesículas multilamelares grandes (MLV- *Multilamellar Large Vesicles*) possuem um tamanho em escala micrométrica (0,5-10 μm) e vários compartimentos aquosos internos, e devido à sua grande laminaridade são mais adequadas para a incorporação de moléculas lipofílicas em comparação com substâncias hidrofílicas. Os lipossomas unilamelares apresentam um único compartimento aquoso interno e podem ser classificados como vesículas pequenas (SUV- *Small Unilamellar Vesicles*) apresentando tamanho em escala nanométrica (20 a 150 nm), ou como vesículas grandes (LUV- *Large Unilamellar Vesicle*) com tamanho variando de 500 a 1000 nm (Figura 12). Os lipossomas SUVs são adequados para administração parenteral devido à sua homogeneidade em tamanho, por outro lado, o seu pequeno tamanho resulta em menor quantidade de encapsulação de fármacos hidrofílicos. Já os LUVs podem encapsular uma maior quantidade de fármacos hidrofílicas devido ao seu maior núcleo aquoso em comparação com SUVs (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007).

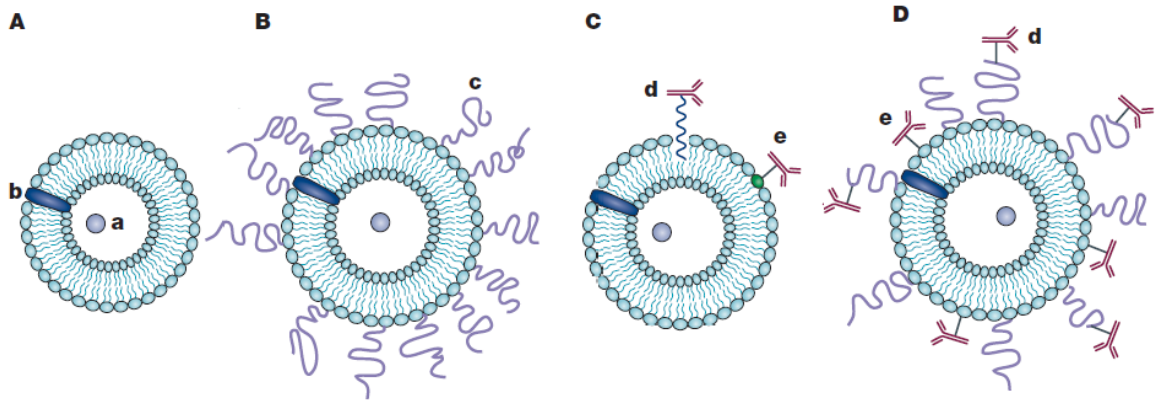
Figura 12. Classificação dos lipossomas quanto ao tamanho e número de lamelas.



Fonte: Adaptado de Pandey, Rani e Agarwal1 (2016).

De acordo com a composição química, os lipossomas podem ser classificados em convencionais, furtivos (longa-circulação) e sítio-específicos (Figura 13).

Figura 13. Classificação dos lipossomas quanto à constituição: **A-** Lipossomas convencionais (**a** - fármaco hidrofílico na cavidade aquosa, **b-** fármaco lipofílico incorporado na bicamada lipídica); **B-** Lipossomas furtivos (**c-** PEG); **C-** Lipossomas sítio-específicos (**d-** ligante ancorado hidrofobicamente na porção terminal do PEG, **e-** ligante acoplado covalentemente ao fosfolipídeo reativo da membrana); **D-** Lipossomas direcionados de longa circulação.



Fonte: Adaptado de Torchilin (2005).

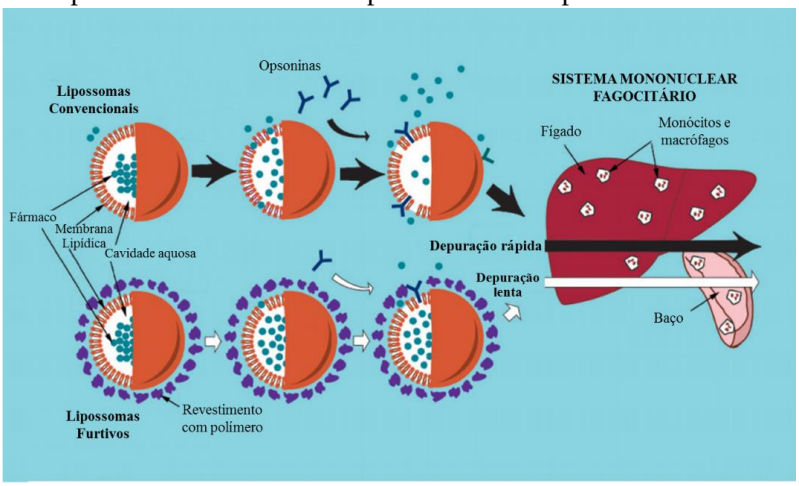
Os lipossomas convencionais foram os primeiros a serem desenvolvidos sendo então conhecidos como lipossomas de primeira geração (Figura 13 A). São compostos basicamente por fosfolipídeos e colesterol, podendo possuir um lipídeo com carga (positiva ou negativa) com a finalidade de aumentar a estabilidade em suspensão. Estes lipossomas são caracterizados por apresentarem um curto tempo de circulação sanguínea. Quando administrados *in vivo*, geralmente através de administração intravenosa, tendem a se acumular rapidamente nas células fagocitárias do sistema mononuclear, sendo então removidas da circulação, principalmente pelo fígado e baço (STORM; CROMMELIN, 1998; TORCHILIN, 2005). Devido a essa elevada captura pelo sistema retículo-endotelial, os lipossomas convencionais são potentes candidatos a carrear fármacos que vão agir nos macrófagos. Da mesma forma, os neutrófilos se tornam células alvo, visto que constituem a primeira linha de defesa no plasma, sendo as primeiras células a identificar e fagocitar os organismos invasores (ANDREWS; GRIFFITHS, 2007).

Relatos na literatura descrevem aplicações bem sucedidas de lipossomas convencionais no direcionamento de agentes antimicrobianos e antiparasitários ao sistema mononuclear fagocitário (macrófagos), assim como, a utilização de imunomoduladores aumentando a capacidade dos macrófagos em matar células neoplásicas e tornando-os resistentes contra microorganismos infecciosos (BAKKER-WOUDENBERG et al., 1993; BERGERS et al., 1995; PINTO-ALPHANDARY; ANDREMONT; COUVREUR, 2000). Por outro lado, a rápida eliminação dos lipossomas convencionais da circulação pelos macrófagos, compromete a aplicação desses lipossomas no tratamento de várias patologias, levando, então, ao desenvolvimento de estratégias para superar essa dificuldade, como a utilização de revestimento

da superfície dos lipossomas com moléculas inertes para formar uma barreira hidrofílica, conhecidos como furtivos ou *stealth liposomes* (Figura 13 B) (SANTOS; CASTANHO, 2002; IMMORDINO; DOSIO; CATTEL, 2006).

A primeira estratégia estudada foi a preparação de lipossomas imitando a membrana eritrocitária. Neste caso a superfície dos lipossomas foi modificada com gangliósidos e derivados de ácido siálico, tais como monosialogangliosídeo (GM1) (GABIZON; PAPAHADJOPOULOS, 1992; ALLEN; HANSEN; MENEZES, 1995). O passo subsequente foi aumentar a hidrofilicidade da superfície dos lipossomas utilizando polímeros hidrofílicos sintéticos inertes e biocompatíveis, especificamente os polietilenoglicóis (PEG) (TORCHILIN, 2012). O mecanismo pelo qual a estabilização estérica dos lipossomas aumenta a sua longevidade na circulação tem sido extensivamente discutido. O conceito básico é que um polímero hidrofílico ou um glicolipídeo, possuindo uma cadeia flexível que ocupe o espaço imediatamente adjacente à superfície do lipossoma ("camada perilipossomal"), tende a excluir outras macromoléculas deste espaço. Consequentemente, o acesso e a ligação das opsoninas do plasma sanguíneo à superfície do lipossoma são diminuídos, e assim o reconhecimento e a captura dos lipossomas pelos macrófagos do sistema mononuclear fagocitário são inibidos, o que aumenta a sua biodisponibilidade na corrente sanguínea (Figura 14). Além disso, os lipossomas furtivos tem a capacidade de serem direcionados passivamente para tecidos e órgãos que possuem maior vascularização, como tumores, áreas de inflamação e infecção (IMMORDINO; DOSIO; CATTEL, 2006; TORCHILIN, 2005).

Figura 14. Depuração dos lipossomas furtivos e convencionais através do sistema reticuloendotelial (RES) no fígado e baço. Os lipossomas convencionais sofrem uma maior degradação no sangue e uma depuração mais rápida através do RES comparado com os lipossomas PEGuilados.



Fonte: Adaptado de ZAMBONI, 2005.

Pesquisas na tentativa de aumentar a especificidade de interação e o acúmulo de fármacos carreados por lipossomas nos tecidos e órgãos alvos, tem focado no desenvolvimento de lipossomas direcionados ou sítio-específicos (Figura 13 C) (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007). Moléculas como anticorpos ou fragmentos, proteínas, peptídeos, folato, carboidratos e fatores de crescimento são acopladas à superfície dos lipossomas, sem comprometer a integridade da membrana e as propriedades do ligante, conferindo seletividade a tecidos e órgãos, direcionando o fármaco encapsulado, em altas concentrações, ao sítio de ação desejado, aumentando assim a eficácia do tratamento (TORCHILIN, 2005; EDWARDS; BAEUMNER, 2006). Quando o ligante conjugado à superfície dos lipossomas, através de reações químicas, são as imunoglobulinas ou seus fragmentos, estes são denominados de imunolipossomas (MANJAPPA et al., 2011)

Os anticorpos ou fragmentos de anticorpos presentes na superfície dos lipossomas são capazes de induzir eficientemente a internalização celular mediada por receptores (SAPRA et al., 2004). Com isso, os imunolipossomas são capazes de promover a destinação seletiva do fármaco para as células neoplásicas, por meio da internalização e da liberação intracelular do fármaco, o que leva à redução da citoxicidade para as células normais (KOZLOWSKA et al., 2009; PARK et al., 2001), podendo assim aumentar o índice terapêutico do fármaco (NIELSEN et al., 2006).

A construção dos lipossomas sítio-específicos envolve a conjugação de ligantes à superfície dos nanosistemas através de conjugação química ou interação física, ou seja, por interação covalente ou não-covalente (TORCHILIN, 2005). Os métodos utilizados nesse processo devem ser simples, rápidos, eficientes e reprodutíveis, produzindo ligações estáveis e não tóxicas. As propriedades biológicas do ligantes tais como o reconhecimento do alvo e a eficiência da ligação não devem ser substancialmente alteradas pela reação de conjugação, assim como a eficiência de encapsulação e a liberação do fármaco no sítio de ação. Além disso, a estabilidade e a meia vida de circulação destes lipossomas devem ser suficientemente longas para permitir o alcance e a interação com as células alvo (SAPRA; ALLEN, 2003).

As técnicas não-covalentes utilizadas como alternativa para conjugação de ligantes à superfície dos lipossomas apresentam a vantagem de serem de fácil realização, sem a necessidade de reagente agressivos. Um método simples consiste em adicionar apenas o ligante à mistura de fosfolipídeos durante a preparação dos lipossomas. Contudo, a percentagem de ligantes acoplados a superfície é relativamente baixa (4-40%) e a agregação dos lipossomas é frequentemente observada (HUANG; KENNEL, 1979; HANSEN et al., 1995). Além disso, a quantidade de ligantes por nanosistema não é facilmente controlada e a orientação correta dos

anticorpos, por exemplo, não é assegurada, com possibilidade de desprendimento do ligante *in vivo*. Tentativas foram descritas (WEISSMANN et al., 1975; LESERMAN et al., 1980), mas, em geral, estas abordagens não foram amplamente utilizadas, principalmente devido à fraca interação entre o lipossomas e o ligante e à distribuição aleatória dos ligantes na superfície dos lipossomas (NOBS et al., 2004).

Por outro lado, a conjugação química proporciona uma ligação estável entre os ligantes e os lipossomas, podendo ser realizada antes ou depois da formação do nanosistema, através de ligações covalentes do tipo tiol-éter, dissulfeto e amida (YU et al., 2010). Os ligantes podem ser acoplados aos lipossomas de três formas diferentes: (I) os ligantes são conjugados diretamente a porção hidrofóbica dos fosfolipídeos nos lipossomas não PEGuilados, através de ácidos graxos de cadeia longa como a fosfatidiletanolamina (PE); (II) os ligantes são conjugados diretamente a porção hidrofóbica dos fosfolipídeos nos lipossomas PEGuilados; e (III) os ligantes são conjugados na porção livre das cadeias de polietilenoglicol (PEG) (Figura 13 B e D). Os lipossomas tipo I ligam-se especificamente às células alvo mas apresentam uma rápida depuração pelo SMF. Os lipossomas do tipo II apresentam uma circulação prolongada mas exibem reduzido direcionamento devido ao impedimento estérico do ligante pelas cadeias poliméricas vizinhas. Já os ligantes do lipossomas tipo III sofrem uma interferência mínima pelas cadeias de PEG vizinhas (TORCHILIN, 2005). Dessa forma, para maximizar a eficiência de direcionamento, o polietilenoglicol é normalmente utilizado como um "braço" para aumentar a distância entre os lipossomas e os ligantes, reduzindo assim a interferência estérica dos na ligação com o receptor (TORCHILIN, 2012).

Na revisão sobre estratégias de conjugação, Manjappa e colaboradores (2011) relatam vários lipídeos funcionalizados sintetizados para acoplar ligantes à terminação PEGuiladas dos lipossomas. Dentre os derivados mais utilizados estão o piridilditiopropionato (PDP)- PEG-PE (MOREIRA et al., 2001), hidrazida (Hz)-PEG-PE (HANSEN et al., 1995) e maleimido (Mal)-PEG-PE (YANG et al., 2007a). Os métodos de acoplamento PDP-PEG e Mal-PEG formam ligações tiol-éter entre proteínas e lipossomas, o que resulta na formação eficiente de uma ligação estável. Para o PDP-PEG, um grupo maleimida é incorporado ao ligante (anticorpo) através da reação com succinimidil-4- (p-maleimidofenil)butirato e estes são então incubados com PDP-PEG tiolado. Já para o Mal-PEG, o ligante (anticorpo) é tiolado utilizando o 2-iminotiolano (reagente de Traut) e reage com o grupo maleimida da porção PEGuilada (PARK et al., 2001; BÉDUNEAU et al., 2007). Para os métodos de conjugação que utilizam o derivado Hz-PEG, carboidratos da porção Fc do anticorpo são oxidados para formar aldeídos reativos,

que se ligam ao grupo hidrazida na porção terminal do PEG (HANSEN et al., 1995; PARK et al., 2002).

Os métodos descritos acima, embora eficazes, requerem uma etapa prévia de modificação do anticorpo antes da sua conjugação aos lipossomas. Torchilin e colaboradores (2001) descreveram um novo método que permite a ligação direta de ligantes contendo grupamentos amina (por exemplo anticorpos) ao PEG terminal dos lipossomas utilizando um derivado PEG anfifílico, p-nitrofenilcarbonil-PEG-PE (pNP-PEG -PE). O pNP-PEG-PE é incorporado a bicamada lipídica através de porção hidrofóbica e liga aos grupos amina através da sua porção pNP exposta para o meio aquoso externo, formando uma ligação carbamato estável e não tóxica. O método permite a ligação de várias moléculas de proteína por lipossoma, mantendo sua funcionalidade. Portanto, o pNP-PEG-PE poderia servir como uma ferramenta muito conveniente para a ligação de proteínas aos lipossomas PEGuilados.

Bendas e colaboradores (1999) também introduziram metodologia para conjugação de anticorpos, sem prévia derivatização, à porção PEG dos lipossomas. Anticorpos monoclonais anti-E-selectina foram acoplados, em condições básicas moderada, a um novo derivado PEG-PE funcionalizado com cloreto cianúrico. O 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina, também chamado cloreto cianúrico, é um reagente trifuncional com uma elevada reatividade, e liga anticorpos e proteínas através de uma substituição nucleofílica em pH básico. As primeiras duas substituições de cloreto podem ser obtidas por reação com nucleófilos sob ligeiras condições básicas. A substituição nucleofílica de átomos de cloro com aminas primárias ou secundárias pode ser controlada com a temperatura. A primeira substituição em cloreto cianúrico ocorre em minutos a 4 °C, enquanto a segunda substituição ocorre em 12-24 h à temperatura ambiente e, finalmente, a terceira substituição ocorre tipicamente em 12-24 h e requer temperaturas acima de 80 °C (CHOUAI; SIMANEK, 2008).

Utilizando essas características do cloreto cianúrico, Bendas e colaboradores (1999) prepararam imunolipossomas incubando anticorpos monoclonais, em tampão borato pH 8,8, com lipossomas contendo cloreto cianúrico PEG-PE em temperatura ambiente por 16 h. Assim sendo, o anticorpo liga-se ao segundo cloreto e o terceiro permanecendo livre, uma vez que a reação de acoplamento dos anticorpos à superfície do lipossoma a uma temperatura acima de 80 °C não é preferível, visto que a maioria das proteínas são desnaturadas a uma temperatura acima de 60 °C e podem perder a sua atividade biológica.

Desta forma, diferentes estratégias de conjugação de ligantes à superfície de lipossomas podem ser utilizadas visando a formação de lipossomas sítio específicos. Além disso, o aperfeiçoamento dos lipossomas sítio-específicos levou a combinação de suas propriedades

com as dos lipossomas de longa circulação em um único sistema, obtendo assim lipossomas direcionados de longa circulação ou imunolipossomas de longa duração (Figura 14 D). Este fato permite um o acúmulo das vesículas em tecidos alvos mesmo quando há uma diminuição do fluxo sanguíneo no órgão ou mesmo quando a expressão do sítio de reconhecimento da molécula sinalizadora é baixa (TORCHILIN, 2005, 2006; IMMORDINO; DOSIO; CATTEL, 2006).

2.4.3 Lipossomas sítio específicos na terapia do câncer

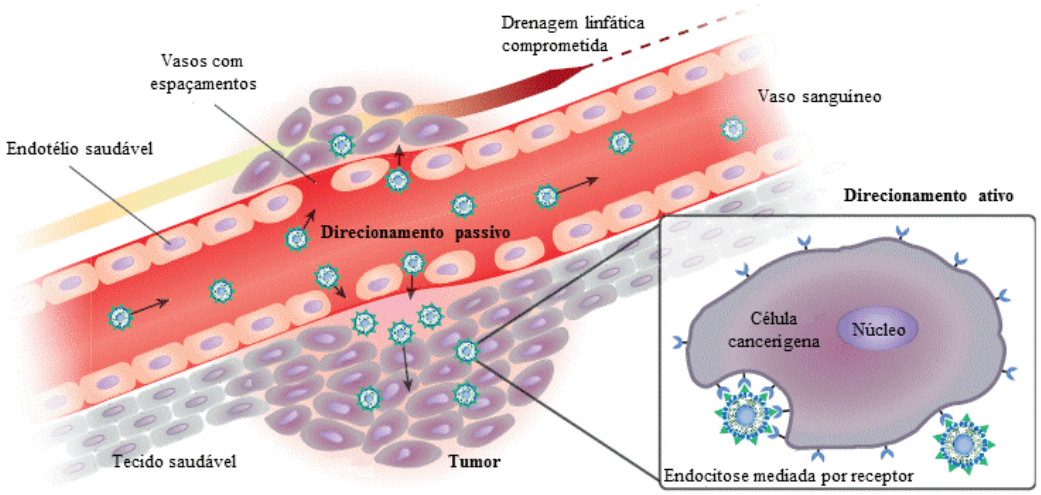
A nanotecnologia abrange diversas áreas da pesquisa, mas um campo em particular, a entrega de fármacos com base em nanosistemas, está agora bem estabelecido e tem potencial para oferecer soluções para muitas das limitações encontradas nas terapias de câncer atuais (WANG; THANOU, 2010).

Os quimioterápicos utilizados atualmente mesmo apresentando alta toxicidade contra células cancerígenas, são tóxicos também para células saudáveis. Isso acontece porque os fármacos, em geral, são moléculas pequenas o suficiente para atravessarem o endotélio em quase todas as regiões do organismo após administrados sistemicamente, chegando tanto às regiões alvo como a outras regiões que não estão relacionadas à doença, originando muito dos efeitos adversos (ESTANQUEIRO et al., 2015). Uma possível estratégia, que visa melhorar a eficácia terapêutica dos quimioterápicos e diminuir seus efeitos adversos, consiste na utilização de sistemas coloidais nanométricos (NAZIR et al., 2014)

Os lipossomas são utilizados como transportadores de fármacos na terapia do câncer devido à sua biocompatibilidade, não toxicidade e proteção dos fármacos da degradação na circulação sistêmica (SEN; MANDAL, 2013). Ao lado dessas vantagens, eles apresentam a capacidade de se acumular nas células tumorais por direcionamento passivo devido as características particulares do microambiente e angiogênese tumoral. Este mecanismo de direcionamento ocorre devido ao aumento da permeabilidade e do efeito de retenção, conhecido como "*Enhanced Permeability and Retection*"*(*EPR) (Figura 15), e está relacionado com as propriedades físico-químicas dos lipossomas tais como pH e temperatura locais, tamanho ou forma (CARACCIOLO, 2015). Os vasos provenientes da angiogênese tumoral apresentam menor empacotamento celular e drenagem linfática comprometida em comparação com tecido normal (MAEDA, 2012). Como resultado, partículas de até 400 nm podem penetrar no endotélio tumoral através das fenestrações existentes no vaso sanguíneo e se acumular preferencialmente no interstício tumoral (YU et al., 2010), enquanto que a penetração através

de vasos íntegros e saudáveis está limitada a sistemas com tamanhos menores que 1-2 nm (BANERJEE; SENGUPTA, 2011). Consequentemente, os sistemas de libertação de fármaco com uma faixa de tamanho definido entre 10-200 nm são comumente utilizados, exibindo uma eficácia aumentada e uma toxicidade sistémica reduzida em comparação com formulações de fármaco livres (WANG; LANGER; FAROKHZAD, 2011; EGUSQUIAGUIRRE et al., 2012).

Figura 15. Direcionamento passivo e ativo de nanopartículas em tumores através do efeito de permeabilidade e retenção (EPR).



Fonte: Adaptado de Nobile et al. (2014).

O direcionamento passivo é o tipo de liberação de fármacos mais empregado pelos nanosistemas para a terapia clínica, contudo apresenta algumas limitações (ALLEN; CULLIS, 2013). A porosidade e o tamanho dos poros dos vasos tumorais varia dependendo do tipo e estado dos tumores, não permitindo um direcionamento passivo em todos os tumores. Dessa forma, alguns sistemas e fármacos não conseguem uma difusão eficaz ao longo do tumor, tornando difícil uma distribuição uniforme a todas as células tumorais (BAE, 2009). Na maioria dos tumores sólidos, a pressão elevada do fluido intersticial também pode inibir a distribuição homogênea dos nanocarreadores dentro dos tecidos tumorais (SEN; MANDAL, 2013). Ademais, a falta de controle do processo de liberação do fármaco pode induzir resistência a múltiplos fármacos (MDR), uma situação em que ocasiona a falha no tratamento quimioterápico devido à resistência das células cancerígenas a um ou mais fármacos (GOTTESMAN; FOJO; BATES, 2002).

Embora a atividade antitumoral tenha sido relatada utilizando sistemas lipossomais direcionados passivamente (BARENHOLZ, 2012), as desvantagens encontradas levaram ao desenvolvimento de sistemas mais seletivos e com uma resposta anticancerígena mais elevada,

empregando ligantes como mediadores para o direcionamento de fármacos, o qual é definido como direcionamento ativo (YU et al., 2010). Entretanto, o direcionamento passivo e ativo são frequentemente utilizados em conjunto garantindo que os nanosistemas sejam retidos nos tecidos tumorais após o seu extravasamento através da parede dos vasos sanguíneos com fenestras (BYRNE; BETANCOURT; BRANNON-PEPPAS, 2008).

Ao longo da última década, o direcionamento ativo tornou-se um conceito central na pesquisa de terapias lipossomais se baseando na interação específica entre os ligantes acoplados a nanocarreadores e receptores presentes na superfície das células do câncer (TORCHILIN, 2010). Esta interação baseia-se na: i) sobreexpressão de receptores antigénicos específicos na superfície de células cancerígenas em relação as células de tecidos normais; ii) especificidade e elevada afinidade de ligação dos ligantes com os receptores; e iii) liberação intracelular do conteúdo lipossomal através de endocitose celular mediada por receptores via interação ligante-receptor (NAZIR et al., 2014; SHI; LU; SHOICHET, 2009). O direcionamento efetivo de nanosistemas ao local de ação desejado, depende da escolha adequada do sítio-alvo, o qual deve ser abundante, e ter elevada afinidade e especificidade de ligação aos receptores da superfície celular, assim como, deve ser bem adaptada à modificação química por conjugação (PARVEEN; MISRA; SAHOO, 2012), o que permite uma elevada concentração intratumoral do fármaco, levando a um aumento da eficácia com redução da toxicidade sistémica, resultando em uma maior da captação pela célula alvo (WANG et al., 2012).

A forma mais natural e universal de conceder a um fármaco afinidade a um alvo específico é a ligação deste a outra molécula (normalmente conhecida como porção de direcionamento ou molécula vetor) com função de reconhecimento específico e ligação a um sítio específico (TORCHILIN, 2010). Atualmente, um vasto espectro de ligantes são utilizados como agentes direcionadores, dentre eles anticorpos monoclonais e seus fragmentos, lectinas e outras proteínas, glicoproteínas, lipoproteínas, peptídeos, vitaminas, carboidratos e alguns ligantes de baixo peso molecular, tais como folato (ALLEN; CULLIS, 2013; SAPRA; TYAGI; ALLEN, 2005; SAWANT; TORCHILIN, 2012).

O acoplamento direto de um fármaco a uma porção de direcionamento é a maneira mais simples de preparar um fármaco alvo (BENDAS et al., 1999). As imunotoxinas representam o principal exemplo dessa abordagem, onde a ricina ao ser conjugada a um anticorpo é direcionada apenas as células que expressam o antígeno apropriado, penetrando no citoplasma celular pelo mecanismo de fagocitose mediada por receptores, enquanto que as células que não apresentam o antígeno em sua superfície não serão reconhecidas pela imunotoxina (VITETTA et al., 1983). Outro exemplo é a ligação de várias enzimas trombolíticas a alguns anticorpos

específicos para diferentes componentes de trombos. Onde foi claramente demonstrado em hamsters e babuínos que a trombólise eficaz pode ser conseguida utilizando o conjugado entre um ativador de plasminogênio de tipo uroquinase de cadeia simples e um anticorpo monoclonal bi-específico contra este ativador e fibrina (IMURA et al., 1992). Os dados sobre conjugados enzima-anticorpo para trombólise, bem como sobre uma variedade de anticorpos utilizados na terapia trombolítica, são numerosos (KOREN; TORCHILIN, 2011).

Algumas tentativas tem sido realizadas para utilização de conjugados fármaco-anticorpo para o tratamento sítio-específico do câncer, tais como carcinoma de pulmão de células pequenas (SCLC) e câncer de mama. O anticorpo monoclonal NCC-LU-243 foi conjugado com mitomicina C e utilizado para a terapia sítio-específica em camundongos nudes transplantados com a linhagem celulares positivas de SCLC humano (KUBOTA et al., 1992). Chiu e colaboradores (2004) avaliaram a utilização de conjugados transtuzumab-polietilenimina (Her-PEI) direcionados ao receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) em linhagens e células do câncer de mama como vetores para a transferência de plasmídeos.

No acoplamento direto do ligante ao fármaco normalmente se obtém uma razão de 1:1, o que não favorece a utilização desta abordagem, uma vez que para ser aplicável e obter uma ação efetiva o fármaco deve apresentar uma concentração mais elevada. Como alternativa, alguns veículos solúveis (polímeros) e insolúveis (microcápsulas, nanopartículas, lipossomas e micelas) podem ser utilizados. Dentre estes sistemas, os lipossomas apresentam a vantagem de poucas unidades de ligantes acoplados a sua superfície sejam capazes de transportar uma grande quantidade de fármaco encapsulado, com possibilidade de controlar o tamanho e a permeabilidade (TORCHILIN, 2010).

Dentre todos os parâmetros para o desenvolvimento eficaz de lipossomas sítio-específicos, a seleção dos receptores ou antígenos alvo sobre células do câncer e o tipo de ligante são os mais significativos. Os alvos ideais são expressos de forma homogénea e em níveis elevados pela população de células tumorais, com insignificante ou baixa expressão em tecidos saudáveis, além de estarem presentes na superfície para permitir a ligação de lipossomas (SAPRA; ALLEN, 2003; SAWANT; TORCHILIN, 2012). Por exemplo, o receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) é sobreexpresso em níveis até 1.000 vezes superiores ao normal em 20-30% de casos de câncer da mama (SLAMON et al., 1989), e lipossomas sítio-específicos contra HER2 mostraram resultados pré-clínicos bem sucedidos (KIRPOTIN et al., 2006; SHMEEDA et al., 2009).

Ao utilizar lipossomas PEGuilados modificados com Herceptin®, Park e Yang juntamente com seus colaboradores (2001; 2007b) obtiveram um aumento no índice terapêutico da

doxorrubicina e do paclitaxel, respectivamente, em relação aos lipossomas PEGuilados, demonstrando o potencial clínico dos imunolipossomas no direcionamento dos fármacos através do mecanismo mediado por anticorpo em linhagens de câncer de mama com alto nível de expressão do receptor HER2. Anos depois, Barrajón-Catalán e colaboradores (2010) também determinaram a capacidade seletiva dos imunolipossomas conjugados ao Anti-HER2 em reduzir a viabilidade de linhagens celulares de câncer de mama, comparando os resultados com o uso do anticorpo comercial isolado (Herceptin®).

A utilização de carboidratos com ligantes para o reconhecimento de proteínas em sítios de ação específicos foi primeiramente demonstrada em 1971 (ROGERS; LOUIS, 1971), desde então essa propriedade tem sido explorada no desenvolvimento de sistemas sítio-específicos de liberação de fármacos explorando as interações altamente específicas de lectinas endógenas com carboidratos, assim como a sua capacidade de endocitose mediada por receptores (DAVIS; ROBINSON, 2002). Bondurant et al. (2003) desenvolveram um glicolipídeo fluorescente (PSMU) que ao ser incorporado a bicamada fosfolipídica permitiu monitorar a ligação específica entre carboidratos e proteínas, e descrever a reorganização da membrana em resposta a complexação com a Concanavalina A. Com o mesmo objetivo, Vico e colaboradores (2011) desenvolveram vesículas unilamelares de β-ciclodextrinas conjugadas a um glicocálix artificial composto por maltose e/ou lactose como plataforma para estudar a cinética das interações multivalentes entre carboidratos e lectinas.

Uma outra forma de explorar as interações carboidrato-lectina é através do glicocálix das células. As superfícies extracelulares das células procarióticas e eucarióticas exibem uma camada densa de carboidratos complexos, que é vulgarmente conhecida como "glicocálix". Os carboidratos do glicocálix atuam como ligantes para proteínas nas interações celulares (TARBELL; CANCEL, 2016). As interações multivalentes das lectinas e carboidrato medeiam o reconhecimento e a adesão das células bem como a ativação da sinalização celular. Além disso, a ligação dos anticorpos as células e vírus, assim como a infecção de células por vírus, são essencialmente mediadas pelas interações proteína-carboidrato na superfície celular (LIS; SHARON, 1998). Utilizando esta estratégia, Idil e colaboradores (2015) desenvolveram partículas magnéticas revestidas com ConA para o diagnóstico do câncer de próstata, sugerindo um sistema modelo para biomarcadores de glicoproteínas.

2.5 LECTINAS

2.5.1 Aspectos históricos

No final do século XIX, estudos relacionados a capacidade das proteínas em aglutinar hemácias foram explorados por grupos que pesquisavam a toxicidade de extratos de plantas e venenos de serpentes. Essas proteínas eram chamadas de hemaglutininas ou fitohemaglutininas, pois eram em sua maioria encontradas em plantas, e o termo "aglutinina" foi amplamente utilizado para descrever moléculas e extratos que causaram o agrupamento ou aglutinação de eritrócitos e outras células. O primeiro relato de uma atividade aglutinante derivada de lectinas foi descrita por Silas Weir Mitchell em 1860, em extrato de veneno de cascavel (*Crotalus durissus*) (MITCHELL; REICHERT, 1886; MITCHELL, 1860).

As lectinas de plantas foram relatadas pela primeira vez em 1888 por Peter Herrman Stillmark em sua tese de doutorado. Ele isolou uma hemaglutina altamente tóxica extraída de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) capazes de aglutinar eritrócitos (STILLMARK, 1888). Em seguida, H. Hellin isolou uma hemaglutinina tóxica de sementes de Jequiriti (*Abrus precatorius*). Ambas se tornaram comercialmente disponíveis e foram utilizadas por Paul Ehrlich como antígenos modelos para estudos imunológicos, estabelecendo vários princípios fundamentais da imunologia através dessas proteínas (SHARON; LIS, 2004; VAN DAMME et al., 1998).

Em 1919, com a melhoria das técnicas de isolamento de proteínas, James B. Sumner purificou a primeira hemaglutinina de sementes de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), que foi denominada Concanavalina A (ConA) (SUMNER, 1919). Em 1936, Sumner e Howell demonstraram que a ConA apresentava habilidade de aglutinar células como eritrócitos e fungos e precipitar glicoconjugados em solução. Sumner também demonstrou que esta atividade poderia ser inibida por sacarose, demonstrando pela primeira vez a especificidade dessas lectinas por açúcar (SHARON; LIS, 2004).

O termo “lectina” (do latim *legere*, que significa selecionar ou escolher) foi proposto por Boyd e Shapleigh em 1954 após a descoberta de que algumas aglutininas de plantas distinguiam diferentes tipos sanguíneos, exibindo uma clara preferência por eritrócitos de um grupo particular dentro do sistema ABO, onde uns aglutinavam e outros não (RENKONEN, 1948; BOYD; REGUERA, 1949; VAN DAMME et al., 1998).

Uma vez estabelecida a especificidade das lectinas a grupos sanguíneos, iniciou-se uma investigação visando elucidar o mecanismo envolvido nessa atividade biológica. Apenas em

1952 demonstrou-se que as propriedades de aglutinação das lectinas se baseiam numa atividade específica de ligação ao açúcar (WATKINS; MORGAN, 1952). A partir de então, as lectinas deixaram de ser consideradas como fatores aglutinantes, mas sim como proteínas de ligação ao açúcar que poderiam ser distinguidas de outras proteínas com base em um critério funcional bem definido. Métodos clássicos para estudar a interação entre lectinas e carboidratos muitas vezes dependiam da aglutinação de eritrócitos ou outros tipos de células. Contudo, mais tarde, a especificidade de hidratos de carbono das lectinas foi explorada por métodos indiretos, tais como, por exemplo, inibição da precipitação ou aglutinação celular por açúcares ou glicoconjugados (VAN DAMME; LANNOO; PEUMANS, 2008).

2.5.2 Definição e classificação

As lectinas são descritas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imune (VANDENBORRE; SMAGGHE; VAN DAMME, 2011) que possuem pelo menos um domínio não catalítico capaz de reconhecer e se ligar reversivelmente a um mono/oligossacarídeo ou a outras substâncias derivadas de carboidratos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). E muitas delas, são altamente estáveis termicamente, e relativamente resistentes à enzimas digestivas e ácidos (KUMAR et al., 2012).

As lectinas são expressas amplamente na natureza, estando presentes em diversos organismos, desde bactérias até as plantas e mamíferos, sendo as de vegetais as mais bem caracterizadas dentre os grupos de lectinas estudadas. Algumas funções tem sido propostas para as lectinas vegetais, tais como: proteção contra patógenos e insetos, transporte e armazenamento de carboidratos, reconhecimento celular (dentro da célula, entre células ou entre organismos), proteínas de reserva ou reguladores de crescimento (SHARON; LIS, 2004).

Lectinas vegetais apresentam-se distribuídas em muitos grupos botânicos, incluindo mono e dicotiledôneas, musgos e liquens, mas são mais frequentemente estudadas nas famílias *Leguminosae* e *Euphorbiaceae*. Nos vegetais, as lectinas podem ser encontradas em diversas partes das plantas, tais como folhas (COELHO; DA SILVA, 2000), cascas (INA et al., 2005), raízes (WANG; NG, 2006) e flores (SUSEELAN et al., 2002), e em maior quantidade em órgãos de estocagem, como por exemplo, em sementes (LAVANYA LATHA; NAGENDER RAO; NADIMPALLI, 2006). As lectinas de plantas são classificadas em sete grupos de acordo com as semelhanças estruturais e evolutivas. Esses grupos são nomeados de lectinas de leguminosas, lectinas ligantes a quitina, lectinas de monocotiledôneas, proteínas inativadoras

de ribossomo tipo 2, lectinas de floema de Cucurbitaceae, família da Jacalina e das Amaranthaceae (VAN DAMME et al., 1998).

A existência de um grande número de lectinas com especificidades glicídicas diferentes e distintas levou à utilização dessas proteínas como ferramentas úteis na pesquisa médica e biológica. Dentre as famílias de lectinas de plantas já caracterizadas, a família lectina leguminosa é bem conhecida por suas funções de longo alcance biológico: essas proteínas versáteis são utilizadas para tipagem de grupos sanguíneos, como agentes mitogênicos (algumas lectinas, como ConA estimulam a mitose de certos tipos de linfócitos); como sondas de detecção de alterações durante o crescimento e transformação celular, podem também ser imobilizadas em matrizes inertes para produção de colunas cromatográficas de afinidade para purificação de glicoproteínas. Um grande número de lectinas com diferentes especificidades já foram conjugadas com isotiocianato de fluoresceína, um marcador fluorescente bastante utilizado na pesquisa farmacológica, e estão disponíveis comercialmente para trabalhos aplicados nos diferentes ramos de pesquisa na área biomédica (KENNEDY et al., 1995; CAVADA et al., 2001). Outras atividades incluem funções anti-tumoral, anti-fúngicas e anti-virais (CAVADA et al., 2001), efeito vasorelaxante, através da liberação de óxido nítrico (GADELHA et al., 2005), inibição da entrada do vírus HIV por lectinas ligadoras de manose (BALZARINI; LAETHEM, 2004), entre outras inúmeras atividades.

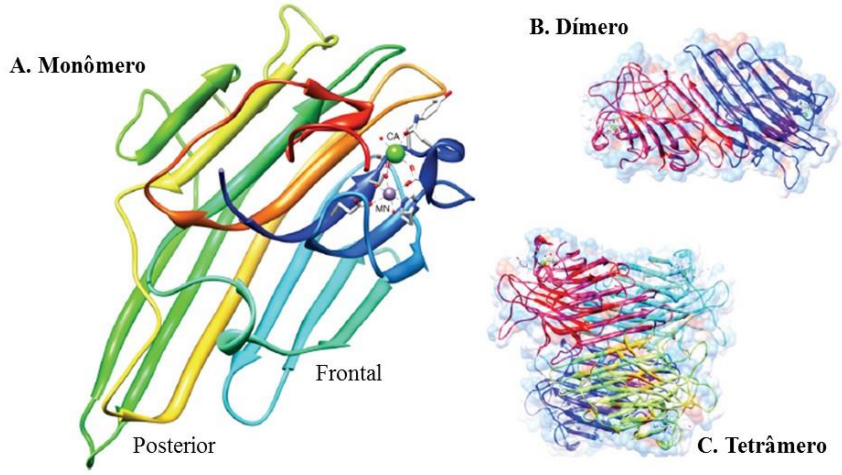
Mais recentemente, as pesquisas concentraram-se sobre as lectinas que possuem atividade envolvida nos mecanismos de morte celular, com alterações na proliferação celular, através de atividades pró-apoptóticas ou indutoras de autofagia em células tumorais e até mesmo em células com ausência de tumor, porém danificadas (JACQUES et al., 2013; LI et al., 2010; LIU et al., 2013; ROY et al., 2014; SILVA et al., 2014). Dessa forma, o uso dessas moléculas *in vitro* mostra que essas proteínas são uma fundamental ferramenta no conhecimento dos mecanismos que envolvem a codificação, principalmente de característica glicídica, em biomoléculas, além do seu próprio potencial de atividades farmacológicas nos mais variados tipos celulares.

2.5.3. Concanavalina A (ConA)

As lectinas de leguminosas tem como principal representante a ConA, uma lectina isolada a partir das sementes de uma planta presente em países tropicais a *Conavalia ensiformis* (feijão-de-porco), a qual pertence à Família Leguminosae e da subfamília Diocleinae. Do ponto de vista estrutural, é geralmente composta por 2 ou 4 subunidades, iguais ou diferentes, com massa

molecular entre 25 a 30 kDa por monômero, estas subunidades são quase sempre compostas de uma cadeia polipeptídica. Sua estrutura nativa possui resíduos de 237 aminoácidos que formam uma estrutura com 3 folhas-β de fitas antiparalelas: uma folha-β anterior composta por sete fitas antiparalela (folha-β frontal) conectada por uma folha-β composta por cinco fitas a uma folha-β posterior composta por seis fitas antiparalela (Figura 16 A). Dois monômeros de ConA colocam-se de um modo adjacente, anti-paralelo, formando um dímero (Figura 16 B). Dois dímeros formam um tetrâmero da mesma maneira (Figura 16 C) (SINHA et al., 2007). A organização estrutural de ConA é dependente do pH, quando o pH está acima de 5,6, existe como um tetrâmero, caso contrário um dímero (AGRAWAL; GOLDSTEIN, 1965).

Figura 16. Estruturas moleculares de Concanavalina A (ConA). (A) As estruturas primária e secundária do ConA; (B) A estrutura tridimensional da ConA; (C) A estrutura quaternária de ConA.



Fonte: Adaptado de Li et al. (2011).

A ConA possui especificidade de ligação por α-D-manose e α -D-glicose e tem sido sugerida como um modelo receptor por ser um dos membros mais estudados de a família de lectina (BAKOWSKY et al., 2008). Na estrutura dessa proteína, o domínio de ligação a carboidrato é estabilizado e ativado por cátions divalentes. Cada subunidade possui um íon Ca^{2+} e Mn^{2+}, que e essencial para a atividade de ligação aos carboidratos (VAN DAMME et al., 1998). Essa ligação se dá através de interações apolares entre as porções apolares dos açúcares e resíduos de aminoácidos aromáticos (tirosina e fenilalanina), e por pontes de hidrogênio formadas entre as hidroxilas dos carboidratos e com cadeias laterais (GADELHA et al., 2005).

A ConA tem despertado crescente atenção pelas capacidade de se ligar a glicoconjugados de membrana de um grande número de células, uma vez que a glicose e manose são frequentemente encontradas em diferentes tipos de células de uma ampla gama de organismos

(ZHAO et al., 2002; AMBROSI; CAMERON; DAVIS, 2005). As aplicações da ConA incluem a marcação de estruturas de membrana de células normais e tumorais, o estudo de glicosilação em células transformadas, e o fracionamento de preparações de polissacarídeos, glicoproteínas e glicopeptídeos em colunas de afinidade a ConA (CHATTERJEE; MANDAL, 2005). Essa lectina também é um mitógeno de linfócitos, induzindo a proliferação de linfócitos T (JAIN et al., 2000).

Mais recentemente, as pesquisas concentraram-se sobre seu papel na morte celular, bem como seu potencial pró-apoptótico e anti-proliferativo em células tumorais, investigando os mecanismos na indução de apoptose e autofagia em uma variedade de células (LI et al., 2011b; ROY et al., 2014). Foi demonstrado que ConA induz morte celular programada, seguindo as vias de apoptose e autofagia, mediadas pela mitocôndria, além de exibir efeitos de anti-angiogênese (LI et al., 2011a). Alguns experimentos confirmaram a participação de ConA nas vias de morte celular de diversos tipos de células, incluindo células PU-1.8, células humanas de melanoma A375 e células humanas de carcinoma de fígado hepatocelular HepG2 (LI et al., 2010; LIU et al., 2009). Em todos esses estudos ConA promoveu morte celular por via apoptótica, com grande participação da via intrínseca nesse processo. Contudo não há nenhum estudo relacionando ConA com efeito anti-necrótico em nenhum tipo de célula, e também não foram encontrados trabalhos mencionando a relação de ConA com o metabolismo mitocondrial na morte celular por necrose.

As lectinas, por suas propriedades características, principalmente por sua habilidade em ligar glicoconjugados, demostrou ser uma excelente alternativa para o direcionamento de fármacos às células tumorais, uma vez que estas superexpressam diferentes glicanos, em comparação com as células normais, permitindo maior especificidade no tratamento (BIES; LEHR; WOODLEY, 2004). Este fato permite que a ConA seja utilizada como moléculas sinalizadoras em sistemas carreadores de fármacos permitindo o direcionamento ao sítio alvo. Visando esta aplicação, Bakowsky et al (BAKOWSKY et al., 2008) e Sudheesh et al (2009) desenvolveram lipossomas revestidos com ConA e confirmaram a funcionalidade da lectina após conjugação, assim como a sua especificidade pelos carboidratos, demostrando a potencialidade destes sistemas para a encapsulação e direcionamento de fármacos. Como proposta para o tratamento do câncer, Santos e colaboradores (2006) desenvolveram lipossomas revestido com ConA com doxorrubicina encapsulada, denominando-os proteolipossomas. Os resultados mostraram que presença da lectina na superfície dos lipossomas aumentou a citotoxicidade em células Hep-2 quando comparada com o fármaco livre. Além do seu potencial para o desenvolvimento de sistemas sítio-específicos, a ConA *per si* apresenta uma significativa

ação antiproliferativa (LI et al., 2011b) apresentando-se como promissora no desenvolvimento de medicamentos para o tratamento do câncer.

Os lipossomas de segunda geração, os quais apresentam propriedades de longa circulação e sitio-especificidade, aumentam o direcionamento seletivo de fármacos encapsulados pelo reconhecimento de receptores de membrana nas células alvo reduzindo assim, a toxicidade em células não cancerígenas.

Baseado na potente atividade antitumoral de β-lapachona e na especificidade da Concanavalina A para receptores de carboidratos, a modificação da superfície de lipossomas com a utilização desta lectina torna-se uma estratégia eficiente para direcionar a β-lap as células cancerígenas. Desse modo, este trabalho tem por objetivo desenvolver lipossomas sítio-específicos utilizando ConA como molécula sinalizadora, para a encapsulação da β-lapachona, com a finalidade de direcionar e potenciar a ação deste fármaco nas células cancerígenas. Ademais, os parâmetros termodinâmicos envolvidos na ligação da ConA foram estudados, assim como a captura dos lipossomas pelas células de câncer de mama (MCF-7).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver lipossomas sítio-específicos utilizando a Concanavalina A como molécula sinalizadora para o direcionamento de β-lapachona às células cancerígenas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir lipossomas PEGuilados contendo β-lapachona;
- Produzir lipossomas PEGuilados contendo β-lapachona, utilizando o lipídeo reativo DSPE-PEG-Cianur ou DPPE-Cianur;
- Desenvolver lipossomas sítio-específicos contendo β-lapachona revestidos com a lectina ConA;
- Caracterizar os sistemas obtidos através de técnicas físico-químicas (tamanho de partícula, carga de superfície e eficiência de encapsulação);
- Quantificar o total de lectina conjugada na superfície dos lipossomas;
- Avaliar a atividade de ligação da ConA antes e depois da conjugação na superfície dos lipossomas pelo ensaio de hemaglutinação;
- Avaliar a energia de ligação entre as biomoléculas que compõem o lipossoma sítio-específico através da Calorimetria de Titulação Isotérmica;
- Avaliar a citotoxicidade dos lipossomas em células de câncer de mama (MCF-7);
- Avaliar a captura celular dos lipossomas por células MCF-7 através de microscopia de fluorescência.

CAPÍTULO I – Artigo

ConA-coated liposomes as a system to target β-lapachone to breast cancer cells

4 CAPÍTULO 1:

ConA-coated liposomes as a system to target β-lapachone to breast cancer cells

Larissa Chaves Costa Franca[a]; Milena Sales Ferraz[a]; Maria Clara de Sousa Arruda Barros[a],Victor Passos Gibson[a] ; Francisco Humberto Xavier Junior[a]; Mariane Cajubá de Britto Lira-Nogueira[a,b,*] , Nereide Stela Santos Magalhães [a*]

[a]Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

[b]Laboratório de Nanotecnologia, Biotecnologia e Cultura de Células, Centro Acadêmico de Vitória/UFPE,Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

*Corresponding authors:
Dra. Nereide Stela Santos Magalhães/Dra. Mariane Cajubá de B. Lira Nogueira
Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami
Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901
E-mail: nssm@ufpe.br/marianelira@gmail.com

Abstract

The present study was set out to develop site-specific liposomes using the lectin Concanavalin A (ConA), as a signaling molecule, to target the antitumor drug β-lapachone (β-lap) to human breast cancer cells (MCF-7). Liposomes were prepared by thin-film hydration method followed by sonication, and characterized according to mean diameter size, zeta potential, ConA conjugation (%) and β-lap encapsulation efficiency (%). Isothermal Titration Calorimetry (ITC) was performed to evaluate the binding energy between the biomolecules, which compose the liposomes. ConA avidity was evaluated before and after conjugation by hemagglutination assays. Finally, fluorescence microscopy was performed to investigate if the presence of ConA on the surface of liposomes influenced on MCF-7 uptake. Uncoated and ConA-coated liposomes prepared presented size diameter and zeta potential values varied from de 97.46 ± 2.01 to 152.23 ± 2.73 nm, and -6.83 ± 0.28 to -17.23 ± 0.64 mV, respectively. Both ConA conjugation and β-lap encapsulation efficiency were almost 100%. The confirmation of lipid and ConA conjugation by thermodynamic parameters was achieved by favorable and spontaneous process. Hemagglutination assay confirmed ConA avidity once Lipo-ConA and Lipo-PEG-ConA were able to hemaglutinate the red blood cells at 128^{-1} and 256^{-1}, respectively. Finally, fluorescence microscopy indicated that higher uptake of ConA-coated liposomes was taken up by MCF-7 cells after 15 minutes and 24 hours. Based on our results, we are led to infer that the presence of ConA on the surface of liposomes could influence MCF-7 uptake, in that way could be used as a promising site-specific system to targeting β-lap until cancer cells.

Keywords: Liposomes; β-lapachone; concanavalin A; ITC; MCF-7 cells.

1. Introduction

New and effective strategies for the treatment of cancer are currently the great challenge, since this disease affects yearly millions of people worldwide (WHO, 2015). For this purpose, new molecules have been explored as alternative to improve the chemotherapeutics agents currently used, to avoid drug resistance and the high doses, in addition to reduce the possible unwanted side effects (Parhi et al., 2012; Turek M, Krzyczmonik M and Balczewski P. 2016). Among the available anticancer molecules, β-lapachone (β-lap) has attracted the attention for its chemical and biological properties. It was demonstrated that this natural bioactive compound presented a variety of pharmacological activities with therapeutic potential, such as anti-inflammatory (Moreno et al., 2015), antibacterial (Cavalcanti et al. 2015), antischistosomal (Aires et al., 2014), fungicide (Medeiros et al., 2010), antimalarial (Sharma et al., 2013), leishmanicidal (Guimarães et al., 2013). In addition, β-lap has been one of the most studied naphthoquinones due to its remarkable antineoplastic activity against several cancer cell lines (Lamberti et al., 2013; Li et al., 2011; Woo and Choi, 2005), mainly human cells of prostate cancer, breast, lung, melanoma and leukemia (Li et al., 1999, 2000; Yu et al., 2014).

Despite the interesting biological activities, it is known that β-lap is toxic. Almeida and coworkers (2009) investigated the possible toxic effects of β-lap in pregnant and non-pregnant Wistar rats during 21 days using 40, 80 and 160 mg/kg (i.p.). The authors reported that β-lap cause malformations in the embryos, damage in the liver, hematological and biochemical alterations and finally, alterations in the spleen according to histological study. These findings indicate the need to develop a pharmaceutical dosage form able to allowing the use of β-lap.

In parallel to explore new molecules, the interest to encapsulate them into drug delivery systems, to improve drugs efficacy and avoid untoward aspects, has been largely

described. Using this strategy, Cavalcanti and coworkers (2011) prepared inclusion complex between hydroxypropyl-β-cyclodextrin and β-lap, as an alternative to increase drug solubility, and encapsulated into conventional liposomes. Despite the interesting results, it is known that conventional liposomes are the ones which are rapidly recognized by opsonins and eliminated from the blood by the cells of the mononuclear phagocyte system (Nakamura, Jun and Maeda, 2015). For that reason conventional liposomes are ideal systems to target drugs till immune system cells as previously reported by our group (Costa et al., 2015), but not to target cancer cells. Thus, modifications on liposomes surface by the addition of water-soluble polymers, such as polyethyleneglycol (PEG), and/or the addition of specific molecules such as antibody, polysaccharide or proteins (Allen and Cullis, 2013) have been described to overcome this disadvantage. The idea behind surface decoration of liposomes is mainly to increase drug-circulating time and/or targeting site-specific tissue or cell.

Currently, targeting systems could be achieved using lectins, a carbohydrate-binding protein. The strategy for drug delivery at a target site mediated by lectins are based on their binding specificity to carbohydrate structures of the glycocalyx, which are important in cellular processes, such as differentiation and recognition, inflammation and immune response (Mauceri et al., 2014). Furthermore, carbohydrates are overexpressed in many cancer cells, in comparison to healthy cells, providing a suitable approach to direct targeting of drug delivery systems. Among lectins family, Concanavalin A (ConA) is one of the most extensively studied. It is a plant lectin isolated from the jack bean of *Conavalia ensiformis*, with binding specificity for D-mannose and D-glucose (Li et al., 2011; Sharon and Lis, 2004). In addition, ConA has been previously reported as inductor of apoptosis via mitochondrial pathway (Li et al., 2010), autophagy in hepatoma cells (Hannigan and Gorski, 2009) and anti-angiogenesis (Amin et al., 2003; Sina et al., 2010).

Based on the potent antitumor activity of β-Lap and the ConA specificity for carbohydrate receptors, surface enrichment of liposomes with this lectin becomes an efficient strategy for targeting β-lapachone to cancer cells. Within this framework, the present study was set out to develop β-Lap-loaded site-specific liposomes using Concanavalin A, as a signaling molecule, to target and potentiate the action of this drug on cancer cells. In addition, the avidity and thermodynamics parameters of ConA-coated liposomes were performed for the first time using Isothermal Titration Calorimetry. Furthermore, liposomes uptake was performed in breast cancer cells (MCF-7).

2. Material and Methods

2.1 Materials

β-lapachone (β-lap), obtained from lapachol by a semi-synthetic route was supplied by Dr. Alexandre Góes (UFPE, Brazil). Cholesterol (CHOL), rhodamine B, metil-α-D-monopianoside (MeαMan), Concanavalin A (ConA), and phosphate-buffered saline (PBS) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, USA); soybean phosphatidylcholine (PC) and 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-[N-(Carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)] (DSPE-PEG_{2000}) were obtained from Lipoid GMBH (Ludwigshafen, Germany); 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(cyanur) (DPPE-Cyanur) and 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N- [cyanur (polyethylene glycol-2000)] (DSPE-PEG-Cyanur) were purchased from Avant Polar Lipids (Alabaster, Alabama,USA). Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (DMEM), fetal bovine serum (FBS), Trypsin/EDTA and Streptomycin (10,000 μg/mL)/Penicillin (10,000 Units/mL) were purchased from Gibco BRL from Life Technology (Merelbeke, Begium). Solvents and other chemicals were supplied by Merck (Darmstadt, Germany).

2.2 Methods

2.2.1 Preparation of liposomes

Lipo-PEG composed of PC:CHOL:DSPE-PEG_{2000} (80:15:5 molar ratio), Lipo-Cyanur composed of PC:CHOL: DPPE-Cyanur (83:15:2 molar ratio) and Lipo-PEG-Cyanur composed of PC:CHOL: DSPE-PEG_{2000}: DSPE-PEG-Cyanur (80:15:3:2 molar ratio) were prepared using the thin-film hydration method followed by sonication as described previously (Lira et al., 2009). Briefly, 60 mM of lipids (CHOL, PC, DSPE-PEG_{2000}, DPPE-Cyanur and DSPE-PEG-Cyanur) were dissolved in a mixture of chloroform/methanol (3:1 v/v) and dried in a rotary evaporator under pressure for 30 min (37 ± 1 °C, 80 rpm), to form a thin film layer. The film was resuspended in phosphate-buffered saline (0.1 M PBS, pH 7.4). The liposomal dispersion was then sonicated (Vibra Cell, Branson, USA) at 200W and 40 Hz for 20 s to form small unilamellar vesicles.

Fluorescent-labeled liposomes and β-lap-loaded liposomes were prepared following the same method except that 1 mL of rhodamine B and 1 mL of β-lapachone, both in methanol solution, were added to the organic phase, obtained a concentration final at 0.5 mg/mL for each.

2.2.2 ConA-coated liposomes

For the coupling procedure, protein/phospholipid molar ratio of 1:500 was chosen, as previously optimized by Santos and co-workers (2006). ConA was covalently coupled to the liposomes via amine-reactive cyanur-groups, either directly to the liposomal surface using cyanuric chloride-activated (DPPE-Cyanur) or to the distal ends of PEG using activated DSPE-PEG-Cyanur according Bendas and colleagues (1999).

ConA protein binding was obtained through the pH modification of preformed vesicle suspension to pH 8.5, containing 60 mM of each lipid (Lipo-Cyanur and Lipo-PEG-Cyanur).

Later, 200 µL of ConA solution (117 µM in 0.1 M PBS) were added and the mixture was incubated overnight at room temperature under gentle magnetic stirring.

As illustrated in Figure 1 five different types of liposomes were prepared. Uncoated-liposomes: Lipo-PEG (PEGuilated) (Fig. 1A); Lipo-Cyanur, containing activated DPPE-Cyanur (Fig. 1B); and Lipo-PEG-Cyanur, with distal ends of lipid containing activated DSPE-PEG-Cyanur (Fig. 1C).Coated-liposomes: Lipo-ConA, with ConA directly coupled to the liposomal surface using cyanuric chloride-activated DPPE (Fig. 1D); and Lipo-PEG-ConA, with ConA coupled to the distal ends of DSPE-PEG-Cyanur (Fig. 1E).

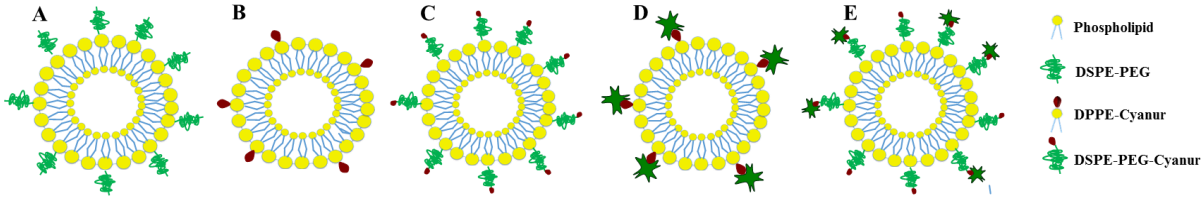


Figure 1. Scheme of the liposomal formulation designs.

ConA-coated liposomes without drug (Lipo-ConA, Lipo-PEG-ConA) and with β-lapachone (β-lap-Lipo-ConA and β-lap-Lipo-PEG-ConA) were separated from unconjugated lectin by the centrifugation method using filtration units (Vivaspin2®, Sartorius,Göttingen, Germany) with 300 MWCO pore for 2 h (986 *g* at 4 °C).

The amount of conjugated (supernatant) and free ConA (filtrate), was measured using protein assay by the modified method of Lowry (Peterson, 1977). The percentage of conjugation was calculated using the following Equation 1:

$$\%conjugated\ protein = \frac{amount\ of\ protein\ concentration\ in\ recovered\ liposomes}{theoretical\ amount\ of\ protein\ concentration\ in\ liposomes} \times 100 \text{ (Eq. 1)}$$

2.2.3 Liposomes characterization

All liposomes formulations were evaluated before and after ConA conjugation. Size distribution and zeta potential values were measured using dynamic light scattering (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd, United Kingdom) at 25 °C.

2.2.4 Entrapment efficiency of β-lapachone into liposomes

The total β-lap content into liposomes was determined after dilution of liposome dispersion in methanol for a theoretical concentration of 10 µg/mL. Samples were analyzed using the HPLC method and the total β-lap content was then calculated by the measured β-lap amount in the liposomes (µg) x 100 per theoretical β-lap amount (µg).

Drug encapsulation efficiency in β-lap-Lipo-ConA e β-lap-Lipo-PEG-ConA were determined using the filtrates obtained after the free lectin separation method (describe above 2.2.2). For the β-lap-Lipo-PEG was used the ultrafiltration/ultracentrifugation technique. Samples of liposomes were inserted in 10 KDa Ultrafree® filtration unit (Millipore, Darmstadt, Germany) and submitted to ultracentrifugation at 8792 *g* for 1h, at 4°C, the unloaded β-lap amount was measured using the HPLC method as detailed below. Drug entrapment efficiency was calculated in relation to the experimental β-lap content in the liposome formulation, as following Equation 2:

$$EE\ (\%) = \frac{\text{experimental measured } \beta\text{−lap amount (µg)− unloaded } \beta\text{−lap amount (µg)}}{\text{experimental measured } \beta\text{−lap amount (µg)}} \times 100 \quad \text{(Eq. 2)}$$

The concentration of β-lap was determined by high performance liquid chromatography (Waters Alliance e2695-2998, Waters, Milford, MA, USA) coupled with a photodiode array detector according Cunha-Filho and co-workers (2005). The chromatographic analysis were performed using reversed-phase Waters C18 XBridge® column (4.6×250 mm i.d. particle 3.5 µm). HPLC analysis of β-lap was performed using a isocratic mobile phase (methanol:TFA 0.05% (8:2 v/v)) at a flow rate of 0.9 mL/min at 37 °C. 50 µL of sample was injected and analysed volume at 256 nm. Standard curves were assayed using β-lap solutions at concentrations ranging from 0.5 to 20 µg/mL (A= 352876 x [β-lap$_{\mu g/mL}$]-45896; r^2= 0.9996). The assays were performed in triplicate.

2.2.5 Binding affinity of conA-coated liposomes

The evidence of functionality of ConA conjugated to vesicles is essential for the development of site-specific liposomes. For that reason, hemagglutination assay and Isothermal Titration Calorimetry (ITC) were performed to assure the binding of lectin on the surface of the liposome.

2.2.5.1 Hemagglutination assays

The presence of ConA-coating the surface liposome was evaluated by the hemagglutinating assay. These analyses provide a diffuse lattice of erythrocytes aggregate in presence of active ConA on the surface of the liposome. Thus, blood was collected from consented unmedicated volunteers in Alsever's solution (2.05 % Glucose, 0.8 % Sodium Citrate and 0.42 % NaCl). Red blood cells (RBCs) were washed four times with isotonic saline (0.9 % NaCl) by centrifugation at 1000 rpm for 10 min ate 4 °C and then a 2 % of RBC suspension was prepared. 50 µL of Lipo-PEG, ConA-coated liposomes and free ConA, corresponding to 117 µM of ConA, were placed in 96-well microplate following serial two-fold dilutions with 0.15 M NaCl from 58.5 to 0.45 µM. Subsequently, 50 µL of RBC suspension were added to each well. The plate was incubated for 1h at 37 °C. Agglutination was considered positive if the red blood cells remained agglutinated after tipped at 60° angle. Non-agglutinating cells were confirmed by microscopic observation. The hemagglutination titer was expressed as the highest dilution presenting a detectable hemagglutination reaction. ConA and NaCl were used as positive and negative control, respectively.

The hemagglutination inhibition assay was performed using glucose solution (1M) as inhibitor. 50 µL of ConA-coated liposomes and glucose solution were add to the well and incubated during 15 minutes, following by 1 hour incubation of RBC (50 µL).

2.2.5.2 . Isothermal titration calorimetry studies

The binding energy of ConA-coated liposome was studied using an isothermal titration calorimeter (ITC-200 MicroCal/GE, Northampton, USA) periodically calibrated either electrically using an internal electric heater or chemically by measuring the dilution enthalpy of methanol in water. To study all interactions involved between ConA and methyl α-D-mannopyranoside (MeαMan) or lipid compounds from liposomes, three different experiments were performed as follows: I) 0.3 mM of free ConA (cell) with 10 mM of DPPE-cyanur lipid (syringe); II) 0.117 mM of ConA-coated liposomes (cell) with 2.925 mM of MeαMan (syringe); and III) 0.3 mM of free ConA (cell) with 5.85 mM of MeαMan (syringe). MeαMan was sectioned as reference to binding experiments due to its strong interaction with ConA (Kizhakkedathu et al., 2010). For the ITC experiments, all solutions were prepared at 0.1M modified phosphate-buffered saline with 0.1 mM $CaCl_2$ and 0.1 mM $MnCl_2$ (mPBS, pH = 8.0). Prior to each experiment, all solutions were filtered through a 0.22 µm membrane (Millex®, Millipore, France) and degassed. The sample cell was filled with 200 µL of ligand solution and 40 µL of titrant solution was placed in the stirring syringe. The first injection of 0.2 µL was discarded to eliminate diffusion effects of material from the syringe to the sample cell. Experiments were set out for consist of 20 consecutive injections (2 µL) with a duration of 5 seconds each and intervals of 240 seconds at a stirring speed of 350 rpm at 25 °C. The values of heat capacity of binding were adjusted considering the dilution effects of titrant solution in mPBS placed in the sample cell. Data consisted of a series of heat flows as a function of time. The interaction process between the two species was analyzed by means of a one-site binding model (Origin 7 software). Based on the concentrations of the titrant and the sample, the software used a nonlinear least-squares algorithm (minimization of χ^2) to fit the series of heat flows (enthalpograms) to an equilibrium binding equation, providing the best fit values of the

stoichiometry of the interaction (n), binding constant (K), change in enthalpy (ΔH) and entropy (ΔS). The Gibbs free energy (ΔG) was calculated based on Equation 3:

$$\Delta G = -R\,T\,\ln K = \Delta H - T\,\Delta S \quad \text{(Eq. 3)}$$

Where *R* is the gas constant (8.314 J K^{-1} mol^{-1}) and *T* is the absolute temperature during the interaction in Kelvin degrees.

2.2.6 Cell culture

For cells study human breast cancer cells (MCF-7) were used. Cells were cultured in DMEM supplemented with 10% (v/v) FBS and 1% Streptomycin (10.000 µg/mL)/Penicillin (10.000 Units/mL) solution. MCF-7 cells were maintained in a humidified atmosphere with 5% CO_2/95% air at 37 °C. Experiments were performed between the fourth and the fiftieth passages. Viable cells were counted and the cell concentration was adjusted with culture medium to the required concentration in viable cells for further experiments.

2.2.6.1 Cytotoxicity assay

β-lap uncoated and ConA-Coated liposomes cytotoxicity was evaluated on MCF-7 cells using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium reduction assay (Alley et al., 1988). Briefly, cells were seeded onto 96-well culture plates (2 x 10^3 cell/well) and incubated at 37 °C in a 5% CO_2 for 24 h. Liposomes were diluted with culture media to make concentrations of β-lap ranging from 2.06 to 130 µM and then 250 µL were added to wells. After 24 h incubation, 20 µL of MTT (0.5 mg/mL) were added and incubated for further 2 h. The supernatants were removed and replaced by 200 µL of DMSO to solubilize the crystals of formazan, formed by living cells. Viable cells were quantified by recording the UV absorbance at 570 nm using a plate reader multi-well scanning spectrophotometer. Untreated cells were used as control. The cytotoxicity was expressed as

the concentration required to inhibit 50% of cell proliferation (IC_{50}). The assay was performed once in quadruplicate.

2.2.6.2. Cellular uptake of ConA-liposomes by fluorescence microscopy

Cellular uptake of liposomes was investigated on MCF-7 using a fluorescence microscopy. Briefly, 5×10^4 cells were seeded onto glass cover-slip placed in 24-well culture plate and incubated for 48 h. Then, liposomes dispersions were added to the cells and incubated for 15 and 60 minutes at 37 °C. Lately, the medium was removed and the cells were washed thrice with PBS aiming to removed the free rhodamine, and fixed for 20 min with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS) (w/v), following by washes with PBS. In order to block the reactivity of the aldehyde, 1 mL of 50 mM ammonium chloride (NH_4Cl) was added and incubated for at least 10 min. The cells were washed again with PBS. Finally, the nucleus was stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI blue), that was laid on a microscope glass slide and cover-slip with cells was overlaid on this medium and sealed with nail polish. The mounted cells were kept at 4 °C in the dark until observations. An optical and fluorescent microscopy (AXIO Imager M2m, Zeiss, Germany) was used to capture images of the intracellular environment and the sub-cellular localization of the fluorescent liposomes.

2.2.7. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using a two-tailed Student *t*-test at the $p < 0.05$ level. Experiments reported in this study were repeated at least three times and the data was represented as the mean ± standard deviation.

3. Results and Discussion

3.1 Preparation and Characterization of ConA liposomes

The development of site-specific liposomes is a promising approach to target anticancer drugs and improve their activity against cancer cells (Khan et al., 2015). In this work, Concanavalin A (ConA) lectin was used to prepare ConA-coated liposomes, as a site-specific system. To this aim, ConA was covalently coupled to different liposome formulations, encapsulating or not β-lapachone (β-lap), using linker-lipids with cyanuric chloride (trichloro-s-triazine; TsT) as a functionalized end group. TsT is a symmetrical heterocyclic compound containing three reactive acyl-like chlorines with a strong reactive graduation, and has been used in the coupling of amine-containing ligands. The first two chloride substitutions can be achieved upon reaction with nucleophiles under slight basic conditions. At further states, reactivity of the third chloride is strongly decreased (Hermanson, 2008). Literature describes few studies that use DPPE-Cyanur and DSPE-PEG-Cyanur (Boada, Gallardo, and Estelrich 1997; Gerd Bendas et al. 2003; Bakowsky et al. 2008; Lee et al. 2013), however, according to Bendas et al. (1999), the use of cyanuric chloride in the termination of functionalized lipid is a simple and fast procedure for the conjugation of proteins, such as antibodies and lectins, without prior derivatization via nucleophilic substitution in basic media.

The liposomal formulations were characterized in this study evaluating size distribution, zeta potential, percentage of conjugated protein and encapsulation efficiency (Table 1).

Table 1. Characterization of liposome formulations before and after ConA conjugation.

Liposomes	Mean diameter size (nm)	Zeta potential (mV)	Encapsulation efficiency (%)	Conjugated protein (%)
Unloaded liposomes				
Lipo-PEG	97.5 ± 2.0	- 7.4 ± 0.6	-	-
Lipo-Cyanur	135.1 ± 0.7	- 14.1 ± 0.5	-	-
Lipo-PEG-Cyanur	100.3 ± 2.8	- 9.8 ± 0.3	-	-
Lipo-ConA	148.5 ± 7.8	- 18.6 ± 0.4	-	99.4 ± 4.7
Lipo-PEG-ConA	126.1 ± 2.1	- 11.1 ± 1.1	-	96.9 ± 2.6
β-lap-loaded liposomes				
β-lap-Lipo-PEG	99.7 ± 5.4	- 6.8 ± 0.3	98.2 ± 1.0	-
β -lap-Lipo-Cyanur	142.5 ± 3.5	- 13.5 ± 0.5	96.7 ± 0.2	-
β -lap-Lipo-PEG-Cyanur	102.2 ± 3.0	- 7.7 ± 0.9	96.8 ± 0.3	-
β -lap-Lipo-ConA	152.2 ± 2.7	- 17.2 ± 0.6	95.1 ± 0.1	99.0 ± 4.2
β -lap-Lipo-PEG-ConA	123.9 ± 2.3	- 9.8 ± 0.3	97.3 ± 3.9	97.3 ± 4.5

Liposomes size and zeta potential were determined before and after the ConA conjugation. Prior to ConA coupling, the mean size diameter of 135.1 and 100.3 nm was determined for unloaded liposomes, Lipo-Cyanur and Lipo-PEG-Cyanur, respectively; and 142.5 and 102.2 nm for β-lap-loaded liposomes, β-lap-Lipo-Cyanur and β-lap-Lipo-PEG-Cyanur, respectively. After the coupling reaction, the mean diameter size increased around 10-20 nm, suggesting the presence of the lectin on the surface of the liposome ($p < 0.05$). Once ConA tetramer presents an approximated diameter of 10 nm (Lvov et al. 1995; Bakowsky et al. 2000). The data suggest that the increase of mean size could represent the conjugation of one or two lectins per liposomal diameter. Our results are in agreement with those reported by Bakowsky et al. (2008) and Santos et al. (2006) for ConA-conjugated liposomes, which had an increase of 20 and 30 nm, respectively.

Considering the Lipo-PEG as control, it was compared its zeta potential between both liposomes that present the functionalized linker-lipid with cyanuric chloride and also liposomes with ConA. It was observed a decreased on zeta potential compared to Lipo-Cyanur and Lipo-PEG-Cyanur due to the presence of chloride in terminal lipid portion. After ConA conjugation, zeta potential results showed a reduction of liposomes surface charge ($p < 0.05$), suggesting that the lectin was located on liposomes surface, once the charge of ConA in a tetramer form is -22.14 ± 0.79 mV.

Terminally PEG-coupled liposomes were prepared by using DSPE-PEG-Cyanur as a membrane anchor. To obtain an essential steric stabilization and prolonged circulation of Lipo-PEG-Cyanur and Lipo-PEG-ConA, 3 mol% DSPE-PEG-Cyanur plus 2 mol% DSPE-PEG_{2000} was incorporated at the lipid bilayer, allows efficient conjugation of the lectin, without steric hindrance during the binding process (Bendas et al., 1999). The determination of protein content revealed that almost 100% of ConA was conjugated to cyanur. Francis et al. (1992) and Santos et al. (2006) reported in their studies low values of ConA efficiency

conjugation achieving around 34% conjugated to a reactive lipid derivative (DPPE-MBS) and 25% to SATA, respectively.

High drug encapsulation efficiency in ConA-coated liposomes containing β-lap was obtained. This result revealed that ConA anchoring on liposomes did not influenced in drug entrapment efficiency when compared to plain uncoated liposomes containing β-lap ($p < 0.05$). Preformed hydrated vesicles were used for lectin anchoring, and this might presumably be the reason why insignificant changes recorded in the percentage of drug entrapment after coating. Cavalcanti et al. (2015) described a high β-lap encapsulation efficiency (> 97%), using 1 mg/mL, in stealth liposomes prepared with 117.6 mM of lipids. In our study, it was used the same molar ration of 1:30 (drug:lipid) described by Cavalcanti group, but ConA-coated liposomes were prepared using almost half amount of lipids (60 mM). Even with the presence of ligand (ConA), we still achieved a high drug encapsulation efficiency.

3.2 Binding affinity of ConA-coated liposome

ConA-coated liposomes were investigated for the functional affinity and activity of the coated ligand after anchoring on the liposomal surface by hemagglutination assay and isothermal titration calorimetry (ITC).

Lectins are well known for their ability to agglutinate red blood cells (Sharon and Lis, 2004). Thus, the affinity of lectin-carbohydrate interaction was evaluated on fresh human red blood cells by ConA-coated liposome to confirm the lectin carbohydrate binding property. Free ConA showed a hemagglutinating activity of 128^{-1} (0.91 µg/mL) and after conjugation with both Lipo-ConA and Lipo-PEG-ConA, it presents a hemagglutinating activity of 128^{-1} (0.91 µg/mL) and 256^{-1} (0.45 µg/mL), respectively. These results suggested that the binding procedure of ConA on the liposome surface did not affect its avidity and hemagglutination property. The sugar-binding activity of ConA-coated liposome was inhibited using glucose and

thus, led to the disappearance of the hemagglutinating activity, demonstrating that its carbohydrate-binding site was occupied with glucose, preventing the binding to the red blood cells.

The binding and activity of the ConA after anchoring on the liposomal surface were confirmed through the study of all interactions by ITC, once the hemagglutination assay is not able to chemically confirm the interactions.

ITC experiments were performed with ConA as a homotetramer at pH = 8.0 and 25 °C to elucidating the mechanism and thermodynamics of all binding interactions involving ConA with lipid-composed liposomes or methyl α-D-mannopyranoside (MeαMan). Initially, the interaction between ConA with DPPE-Cyanur lipid was studied. Posteriorly, the binding affinity of ConA-coated liposomes was determined using MeαMan as model due to its strong interaction with ConA (Kizhakkedathu et al., 2010). In addition, the binding interactions of free ConA with MeαMan were also analyzed. In this work, all experiment were conducted with ConA placed into cell which more ligand at the final stage were present in comparison with the ConA-receptor (Dam et al., 2000). A representative calorimetric titration profile of I) 0.3 mM of free ConA with 10 mM of DPPE-Cyanur lipid; II) 0.117 mM of ConA-coated liposomes with 2.925 mM of MeαMan; and III) 0.3 mM of free ConA with 5.85 mM of MeαMan are shown in Figure 2. Each peak in the binding isotherm represents a single injection of the titrant solutions into the cell-containing ConA (Figure 2- top). All titration profiles show that injection into cell containing-ConA provides exothermic heats of binding, which decrease in magnitude with subsequent injections, showing saturation behavior. All exothermic heat flows released after successive injections were integrated and expressed as a function of the molar ratio between the two reactants (Figure 2- down).

A standard non-linear least squares regression-binding model, based on the one-site binding model (1:1), was used to determine the stoichiometry interaction (n represents the

number of binding sites per ConA monomer), binding constant (K), change in enthalpy (ΔH), entropy (ΔS) and Gibbs free energy (ΔG) released upon the interaction between ConA and DPPE-cyanur, and ConA and MeαMan.

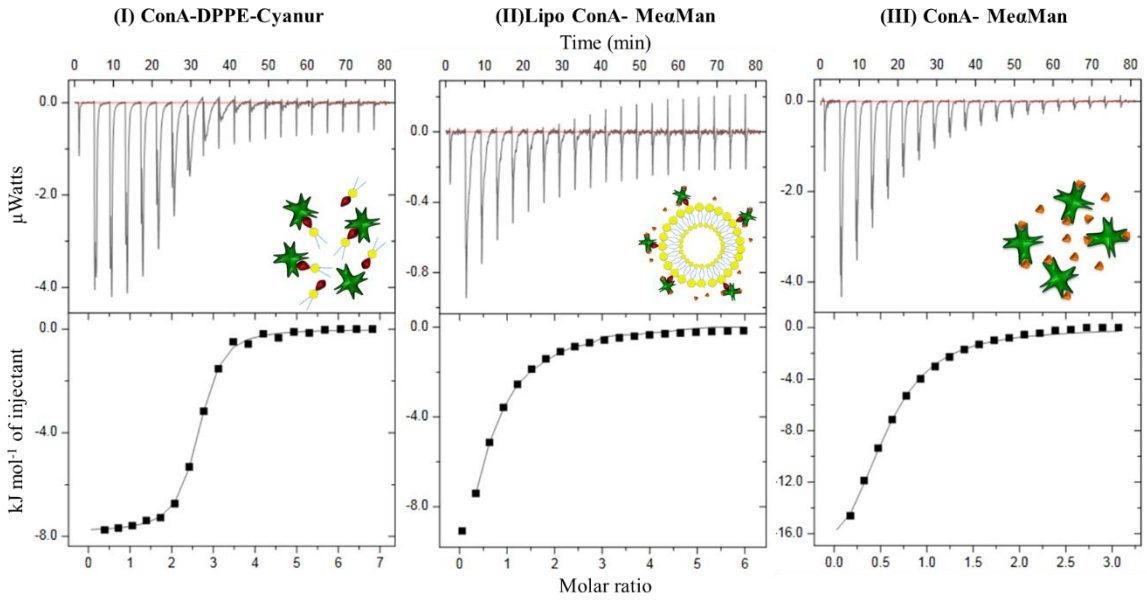


Figure 2. Typical ITC data corresponding to the binding interaction of I) 0.3 mM of free ConA with 10 mM of DPPE-Cyanur lipid; II) 0.117 mM of ConA-coated liposomes with 2.925 mM of MeαMan; and III) 0.3 mM of free ConA with 5.85 mM of MeαMan at pH 8.0 and 25 °C. Exothermic heat flows occurring upon successive injection of 2 µl aliquots of ligand into sample cell containing ConA-receptor (top). Down: Integrated heat profile of the calorimetric titration. The solid line represents the best nonlinear least squares fit to a single binding site model. Heat flows accounting for dilution effects of the ligand solution in the mPBS only were further subtracted from each experimental heat flow (down).

The stoichiometry of interaction between ConA and DPPE-Cyanur presented a molar ratio of 1.26 (± 0.02) binding site per ConA monomer. This indicates that each cyanuric chloride in the DPPE-terminus is able to couple one ConA monomer site onto amino groups via a nucleophilic substitution at a alkaline pH (Bakowsky et al., 2008). When analyzed the binding affinity of ConA-coated liposome with MeαMan (n = 1.06 ± 0.06), the number of

binding sites per ConA monomer is close to 1.0 similar binding to free ConA with MeαMan (n =1.14 ± 0.07). This result fits within the existing literature once various studies reports a stoichiometry of 1 for simple monosaccharide binding to ConA monomer lectin (Dam et al., 2000; Mandal et al., 1994; Naismith et al., 1994). Thus, the very close stoichiometry confirms the prominent position of the active terminal from ConA on the liposome surface capable to binding MeαMan. Bendas et al. (1997) has been also confirmed the presence of ConA on the liposome surface containing phospholipids endgroup-functionalized with cyanuric chloride by the Langmuir-technique.

ConA-DPPE-cyanur coupling showed higher binding constant ($K=1.13 \times 10^5\ M^{-1}$) than ConA-coated liposome-MeαMan ($K=1.56 \times 10^4\ M^{-1}$) and then free ConA- MeαMan ($K=1.47 \times 10^4\ M^{-1}$). The high K for ConA-DPPE-cyanur may be attributed to strong nucleophilic substitution of cyanur to ConA attachment at alkaline pH. In both II and III experiments, ConA lectin binding to simple monosaccharide presented the same K value indicating that ConA has the same saccharide binding affinity even after coating on the surface of liposomes. For ConA-MeαMan, Dam et al. (2000) and Kizhakkedathu et al. (2010) obtained K value of $1.2 \times 10^4\ M^{-1}$ and $1.03 \times 10^4\ M^{-1}$ to analysis performed at pH = 5.2 at 27 and 25 °C, respectively. In our study the assays were performed at pH = 8.0 because the alkaline pH is necessary for the cyanur coupling (Bendas et al., 1999). Although the K value in our work has been higher that K value reported by those authors, it is noteworthy that Mandal et al. (1994) reported K value ranging from 10^3 to $10^6\ M^{-1}$. Furthermore, the pH used was different to that reported in the literature, being a factor that could influence this different K values.

Thermodynamic parameters (ΔH, -TΔS and ΔG) are showed in the Figure 3. All interaction showed favorable enthalpy changes indicating exothermic process. However, looking both II and III results ($\Delta H \approx -20.3\ kJmol^{-1}$), ConA lectin binding to simple monosaccharide shows to be more exothermic than ConA-DPPE-cyanur. Favorable enthalpy

is derived from new noncovalent bond interactions, such as hydrogen bonds when the distance and angle between acceptors and donor molecules are optimal. Furthermore, hydrophobic interaction associated with the displacement of the water molecules from the molecule surface by the more hydrophobic ligand may still result in higher favorable enthalpy (Freire, 2008).

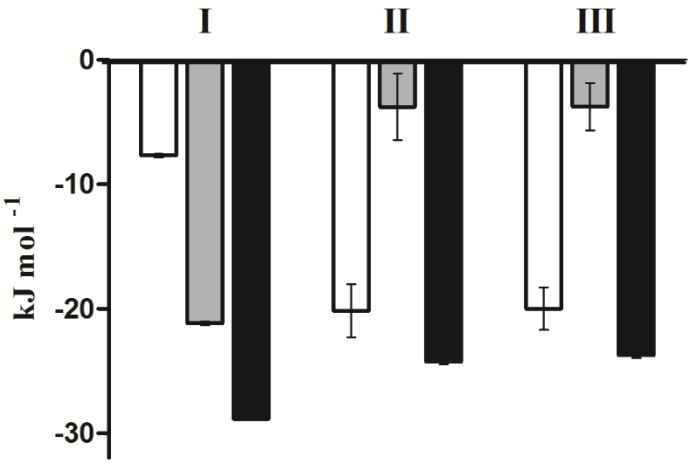


Figure 3. Thermodynamic signatures for three different ligand binding with ConA. I) 0.3 mM of free ConA with 10 mM of DPPE-cyanur lipid; II) 0.117 mM of ConA-coated liposome with 2.925 mM of MeαMan; and III) 0.3 mM of free ConA with 5.85 mM of MeαMan. White, grey and black represent enthalpy (ΔH), entropy effect (-TΔS) and Gibbs free energy (ΔG), respectively, according to a single binding site model.

The entropy effects (-TΔS) of all interactions were negatives. However, the entropy change was more favorable for ConA-DPPE-Cyanur (-TΔS = -21.17 $kJmol^{-1}$) than ConA-MeαMan. Thus, favorable ConA-DPPE-Cyanur binding was entropy-driven due to the hydrophobic interaction associated to desolvation of the hydrated molecules increasing solvent entropy from burial of hydrophobic groups and release of water upon binding, as well as minimal loss of conformational degrees of freedom (Huang and Lau, 2016; Luque and Ernesto, 2002).

Gibbs free energy (ΔG) measures the ability of a thermodynamic system to do maximum or reversible isothermic and isobaric works. ΔG is one of the most important thermodynamic quantities to characterize the driving forces of binding (Gilson and Zhou, 2007). All ΔG negative values indicate that the binding affinity of a ligand to a given acceptor is a spontaneous process, with more negative values of ΔG (-28.85 $kJmol^{-1}$) to ConA-DPPE-Cyanur favoring higher affinity binding (Figure 3). ConA-coated liposomes-MeαMan (II) and free ConA- MeαMan (III) showed the same ΔG values (≈ -23.11 $kJmol^{-1}$) corroborating with results previous reported (Dam et al., 2000; Kizhakkedathu et al., 2010).

Therefore, ITC results showed hydrophobic interactions, which ConA-DPPE-Cyanur binding is predominantly governed by entropy energy of desolvation molecules involved in the reaction; and ConA-saccharide binding is enthalpically driven by hydrogen bonds. Furthermore, the ConA-coated liposomes remains enabled for monosaccharide binding without changes in its thermodynamic parameters when compared to free ConA-MeαMan, confirming in that way the hemagglutination results.

3.3 Cytotoxicity assay

Generally, liposomes cytotoxicity depends on the amount of vesicles taken up by cells. In the present work, the cytotoxicity of ConA-coated liposomes encapsulating or not β-lapachone was evaluated after 24 h of incubation with MCF-7.

Comparing the cytotoxicity of uncoated and ConA-coated liposomes with β-lap, it was observed that the presence of ConA slightly increased the cytotoxicity (IC_{50} = 18.27 ± 0.25 and 16.83 ± 0.24 μg/mL, respectively) suggesting that the lectin influenced the uptake of liposomes, and as consequence, increased the amount of drug inside the cells.

3.4 Cellular uptake of ConA-liposomes by fluorescence microscopy

The rational behind the development of site-specific using ConA was to increase liposomes affinity for cancer cells thanks to carbohydrate interaction with ConA. The internalization of liposomes by MCF-7 cells was investigated by fluorescence microscopy (Figure 4). ConA-coated liposomes displayed higher fluorescence (Figure 4 B) than ConA-uncoated liposomes (Figure 4 A), after 15 min of incubation, indicating an increasing of ConA-coated liposomes uptake by MCF-7 cells. Interesting, even after 24 h of liposomes incubation, difference of fluorescence between uncoated and ConA-coated liposomes was still clearly observed, as verified in Figure 3 C and D, respectively. This can serve as indication of much more active uptake of ConA-coated liposomes, suggesting that ConA was avid after conjugationin liposomes, in accordance with ITC and hemmaglutination results. The presence of ConA lectin on vesicles surface influenced the uptake by MCF-7 cells.

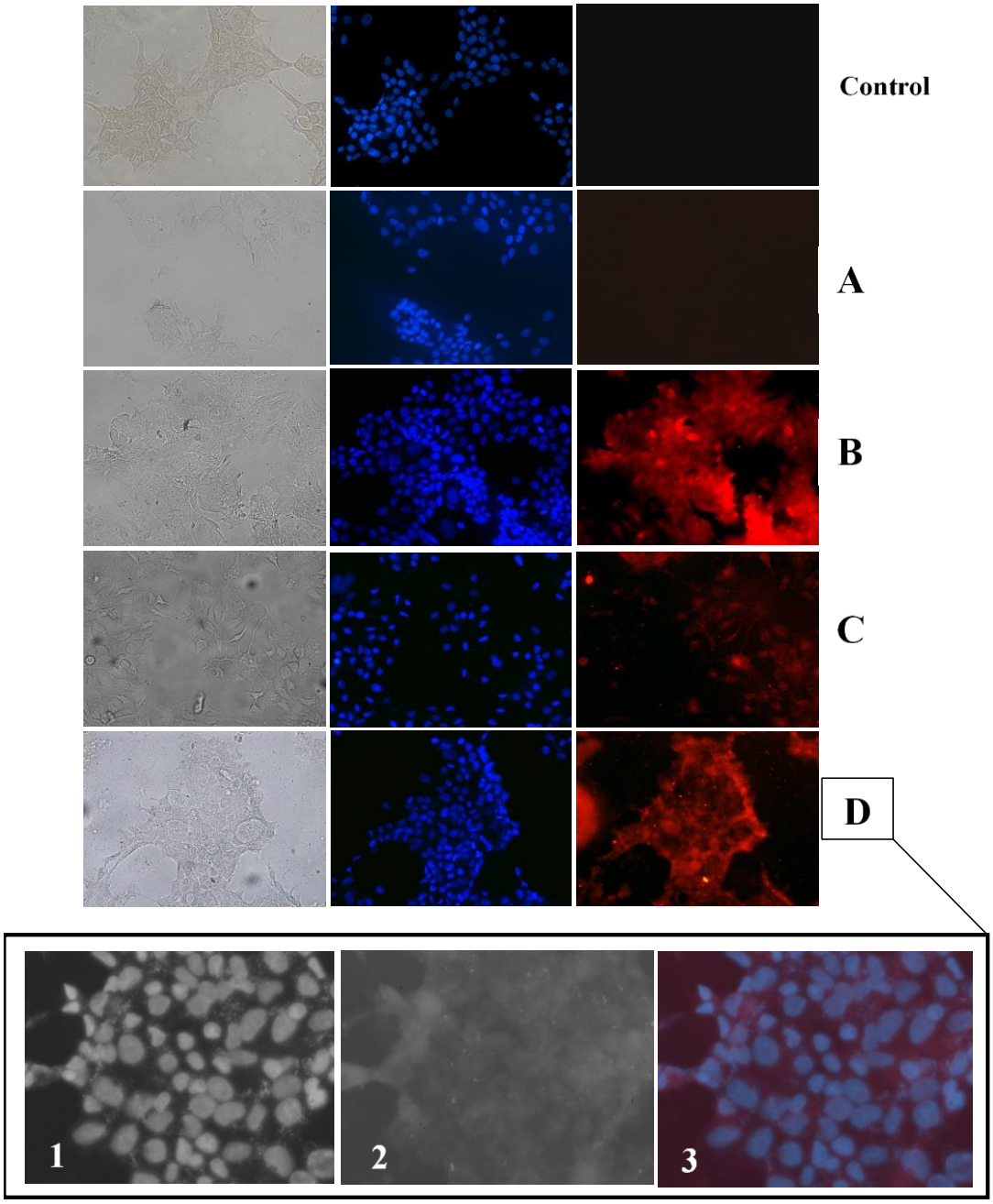


Figure 4. A-D) Fluorescence images (Magnification 20x) of MCF-7 cells treated with either Lipo-ConA or Lipo-Cyanur. From left to right: Visible Light, blue and red channels. Control cells without treatment; A) and B) MCF-7 cells treated with Lipo-Cyanur (A) and Lipo-ConA (B) for 15 minutes; C) and D) MCF-7 cells treated with Lipo-Cyanur (C) and Lipo-ConA (D) for 24 hours. D) Box: MCF-7 cells treated with Lipo-ConA for 24 hours (Magnification 40x) imaged in the Blue channel (1), red channel (2) and overlapped image. Blue: DAPI stained nuclei. Red: Rhodamine B stained cells.

4. Conclusions

This study shows the development of ConA-coated liposomes as a site-specific vehicle to target β-lapachone to human breast cancer cells (MCF-7). ConA-coated liposomes presented a mean diameter size in a nanoscale with negative surface charge and almost 100% of lectin conjugation and β-lap encapsulation efficiency. ConA conjugation and avidity was confirmed by both ITC and hemagglutination assay. The confirmation of lipid and ConA conjugation by thermodynamic parameters was determined by favorable entropy and spontaneous process. Finally, observations performed by fluorescence microscopy indicated that higher amount of ConA-coated liposomes was taken up by MCF-7 cells. Based on our results, it was led to infer that the presence of ConA on the surface of liposomes could influence in a positive manner MCF-7 uptake, in that way could be used as a site-specific system.

5. Acknowledgments

Costa-Franca extend her thanks to the Foundation for Science and Technology Development of the Pernambuco State of Brazil – FACEPE for a Ph.D. scholarship (IBPG #1159-2.08/1).

6. References

Aires, A. de L., Ximenes, E.C.P.A., Barbosa, V.X., Góes, A.J.S., Souza, V.M.O., Albuquerque, M.C.P.A., 2014. β-Lapachone: A naphthoquinone with promising antischistosomal properties in mice. European Journal of Integrative Medicine 21, 261–267. doi:10.1016/j.phymed.2013.08.012

Allen, T.M., Cullis, P.R., 2013. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. Advanced Drug Delivery Reviews 65, 36–48.

Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R., Boyd, M.R., 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. Cancer Research 48, 584–588.

Amin, A.R.M.R., Oo, M.L., Senga, T., Suzuki, N., Feng, G.S., Itamaguchi, M., 2003. SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase 2 regulates Concanavalin A-dependent secretion and activation of matrix metalloproteinase 2 via the extracellular signal-regulated kinase and p38 pathways. Cancer Research 63, 6334–6339.

Bakowsky, H., Richter, T., Kneuer, C., Hoekstra, D., Rothe, U., Bendas, G., Ehrhardt, C., Bakowsky, U., 2008. Adhesion characteristics and stability assessment of lectin-modified liposomes for site-specific drug delivery. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes 1778, 242–249. doi:10.1016/j.bbamem.2007.09.033

Bakowsky, U., Rettig, W., Bendas, G., Vogel, J., Bakowsky, H., Harnagea, C., Rothe, U., 2000. Characterization of the interactions between various hexadecylmannoside-phospholipid model membranes with the lectin Concanavalin A. Physical Chemistry Chemical Physics 2, 4609–4614. doi:10.1039/b003727n

Bendas, G., Krause, A., Bakowsky, U., Vogel, J., Rothe, U., 1999. Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique. International Journal of Pharmaceutics 181, 79–93.

Bendas, G., Rotheb, U., Scherphof, G.L., Kamps, J.A.A.M., 2003. The influence of repeated injections on pharmacokinetics and biodistribution of different types of sterically stabilized immunoliposomes. Biochimica et Biophysica Acta 1609, 63–70.

Bendas, G., Vogel, J., Bakowski, U., Krause, A., Müller, J., Rothe, U., 1997. A liposome-based model system for the simulation of lectin-induced cell adhesion. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes 1325, 297–308. doi:10.1016/S0005-2736(96)00268-4

Boada, J., Gallardo, M., Estelrich, J., 1997. Determination of polyethylene glycol activated with cyanuric chloride in liposomes. Analytical biochemistry 253, 33–6. doi:10.1006/abio.1997.2363

Cavalcanti, I.M.F., Mendonça, E. M., Lira, M.C.B., Honrato, S.B., Camara, C., Amorim, R.V.S., Mendes Filho, J., Rabello, M.M., Hernandes, M.Z., Ayala, A.P., Santos-Magalhães, N.S., 2011. The encapsulation of β-lapachone in 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex into liposomes: a physicochemical evaluation and molecular modeling approach. European Journal of Pharmaceutical Sciences 44, 332–340.

Cavalcanti, I.M.F., Pontes-Neto, J.G., Kocerginsky, P.O., Bezerra-neto, A.M., Lima, J.L.C., Lira-Nogueira, M.C.B., Maciel, M.A. V, Neves, R.P., Pimentel, M.F., Santos-Magalhaes, N.S., 2015. Antimicrobial activity of b -lapachone encapsulated into liposomes against meticillin-resistant Staphylococcus aureus and Cryptococcus neoformans clinical strains. Journal of Global Antimicrobial Resistance 3, 103–108.

Costa, L.C., Souza, B.N., Almeida, F.F., Lagranha, C.J., Cadena, P.G., Santos-Magalhaes, N.S., Lira-Nogueira, M.C., 2015. Glutamine-loaded liposomes: Preliminary investigation, characterization, and evaluation of neutrophil viability. AAPS PharmSciTech 17, 446–453.

Cunha-Filho, M.S.S., Alves, F.C., Alves, M.G.C., Monteiro, D.B., Medeiros, M.F.P., Neto, P.J.R., 2005. Beta-lapachona : desenvolvimento e validação de metodologia analítica para nova alternativa. Revista Brasileira de Farmácia . 86, 39–43.

Dam, T.K., Roy, R., Das, S.K., Oscarson, S., Brewer, C.F., 2000. Binding of multivalent

carbohydrates to concanavalin A and Dioclea grandiflora lectin. Thermodynamic analysis of the "multivalency effect." Journal of Biological Chemistry 275, 14223–14230.

Francis, S.E., Hutchinson, F.J., Lyle, I.G., Jones, M.N., 1992. The control of protein surface concentration on proteoliposomes. Colloids and Surfaces 62, 163–176. doi:10.1016/0166-6622(92)80049-8

Freire, E., 2008. Do Enthalpy and Entropy Distinguish First in Class From Best in Class? Drug Discov Today 13, 869–874. doi:10.1016/j.drudis2008.07.005.Do

Gilson, M.K., Zhou, H.-X., 2007. Calculation of protein-ligand binding affinities. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure 36, 21–42. doi:10.1146/annurev.biophys.36.040306.132550

Guimarães, T.T., Pinto, M.D.C.F.R., Lanza, J.S., Melo, M.N., Monte-Neto, R.L., Melo, I.M.M., Diogo, E.B.T., Ferreira, V.F., Camara, C.A., Valença, W.O., Oliveira, R.N., Frézard, F., Silva Júnior, E.N., 2013. Potent naphthoquinones against antimony-sensitive and -resistant Leishmania parasites: Synthesis of novel α- and nor-α-lapachone-based 1,2,3-triazoles by copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. European Journal of Medicinal Chemistry 63, 523–530. doi:10.1016/j.ejmech.2013.02.038

Hannigan, M.A., Gorski, S.M., 2009. Macroautophagy: The key ingredient to a healthy diet? Autophagy 5, 140–151. doi:10.1167/iovs.07-1072.Complement-Associated

Huang, R., Lau, B.L.T., 2016. Biomolecule-nanoparticle interactions: Elucidation of the thermodynamics by isothermal titration calorimetry. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects 1860, 945–956. doi:10.1016/j.bbagen.2016.01.027

Khan, D.R., Webb, M.N., Cadotte, T.H., Gavette, M.N., 2015. Use of Targeted Liposome-based Chemotherapeutics to Treat Breast Cancer. Breast cancer:basic and clinical research 9, 1–5. doi:10.4137/BCBCR.S29421

Kizhakkedathu, J.N., Creagh, A.L., Shenoi, R.A., Rossi, N.A.A., Brooks, D.E., Chan, T., Lam, J., Dandepally, S.R., Haynes, C.A., 2010. High molecular weight polyglycerol-based multivalent mannose conjugates. Biomacromolecules 11, 2567–2575. doi:10.1021/bm1004788

Lamberti, M.J., Vittara, N.B.R., Silva, F. de C., Ferreira, V.F., Rivarola, V.A., 2013. Phytomedicine Synergistic enhancement of antitumor effect of β -Lapachone by photodynamic induction of quinone oxidoreductase (NQO1). Phytomedicine 20, 1007–1012. doi:10.1016/j.phymed.2013.04.018

Lee, H.Y., Mohammed, K.A., Kaye, F., Sharma, P., Moudgil, B.M., Clapp, W.L., Nasreen, N., 2013. Targeted delivery of let-7a microRNA encapsulated ephrin-A1 conjugated liposomal nanoparticles inhibit tumor growth in lung cancer. International Journal of Nanomedicine 8, 4481–4494. doi:10.2147/IJN.S41782

Li, C.J., Li, Y.Z., Pinto, A. V, Pardee,A. B., 1999. Potent inhibition of tumor survival in vivo by beta-lapachone plus taxol: combining drugs imposes different artificial checkpoints. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96, 13369–74. doi:10.1073/pnas.96.23.13369

Li, C.-Y., Xu, H.-L., Liu, B., Bao, J.-K., 2010. Concanavalin A, from an old protein to novel candidate anti-neoplastic drug. Current molecular pharmacology 3, 123–128. doi:EPub-

Abstract-CMP-10

Li, W.-W., Yu, J.-Y., Xu, H.-L., Bao, J.- K., 2011. Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. Biochemical and Biophysical Research Communications 414, 282–286. doi:10.1016/j.bbrc.2011.09.072

Li, Y., Li, C.J., Yu, D., Pardee, A.B., 2000. Potent induction of apoptosis by β-lapachone in human multiple myeloma cell lines and patient cells. Molecular Medicine 6, 1008–1015.

Lira, M.C.B., Ferraz, M.S., Silva, D.G.V.C., Cortes, M.E., Teixeira, K.I., Caetano, N.P., Sinisterra, R.D., Ponchel, G., Santos-Magalhães, N.S., 2009. Inclusion complex of usnic acid with β-cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry 64, 215–224. doi:10.1007/s10847-009-9554-5

Luque, I., Ernesto, F., 2002. Structural parameterization of the binding enthalpy of small ligands. Proteins: Structure, Function and Genetics 49, 181–190. doi:10.1002/prot.10206

Lvov, Y., Ariga, K., Ichinose, I., Kunitake, T., 1995. Layer-by-layer architectures of concanavalin a by means of electrostatic and biospecific interactions. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications 22, 2313–2314.

Mandal, D.K., Kishore, N., Brewer, C.F., 1994. Thermodynamics of lectin-carbohydrate interactions. Titration microcalorimetry measurements of the binding of N-linked carbohydrates and ovalbumin to concanavalin A. Biochemistry 33, 1149–56. doi:10.1021/bi00171a014

Mauceri, A., Borocci, S., Galantini, L., Giansanti, L., Mancini, G., Martino, A., Salvati Manni, L., Sperduto, C., 2014. Recognition of concanavalin a by cationic glucosylated liposomes. Langmuir 30, 11301–11306. doi:10.1021/la502946t

Medeiros, C.S., Pontes-Filho, N.T., Camara, C.A., Lima-Filho, J. V., Oliveira, P.C., Lemos, S.A., Leal, A.F.G., Brandão, J.O.C., Neves, R.P., 2010. Antifungal activity of the naphthoquinone betalapachone against disseminated infection with cryptococcus neoformans var. neoformans in dexamethasone-immunosuppressed Swiss mice. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 43, 345–349. doi:10.1590/S0100-879X2010007500012

Moreno, E., Schwartz, J., Larrea, E., Conde, I., Font, M., Sanmart, C., Irache, J.M., Espelas, S., 2015. Assessment of β-lapachone loaded in lecithin-chitosan nanoparticles for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis in L. major infected BALB/c mice. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 11, 2003–2012. doi:10.1016/j.nano.2015.07.011

Naismith, J.H., Emmerich, C., Habash, J., Harrop, S.J., Helliwell, J.R., Hunter, W.N., Raftery, J., Kalb, A.J., Yariv, J., 1994. Refined structure of concanavalin A complexed with methyl alpha-D-mannopyranoside at 2.0 A Resolution and comparison with the saccharide-free structure. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 50, 847–858. doi:10.1107/S0907444994005287

Nakamura, H., Jun, F., Maeda, H., 2015. Development of next-generation macromolecular drugs based on the EPR effect: challenges and pitfalls. Expert opinion on drug delivery 12, 53–64. doi:10.1517/17425247.2014.955011

Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. Analytical Biochemistry 83, 346–356. doi:10.1016/0003-2697(77)90043-4

Santos, H.M.L.R., Queiroz, F.B., Maior, R.M.S., Nascimento, S.C., Santos-Magalhães, N.S., 2006. Cytotoxicity of Doxorubicin-Loaded Con A-Liposomes. Drug Development Research 67, 430–437. doi:10.1002/ddr

Sharma, P., Wollenberg, K., Sellers, M., Zainabadi, K., Galinsky, K., Moss, E., Nguitragool, W., Neafsey, D., Desai, S.A., 2013. An epigenetic antimalarial resistance mechanism involving parasite genes linked to nutrient uptake. Journal of Biological Chemistry 288, 19429–19440. doi:10.1074/jbc.M113.468371

Sharon, N., Lis, H., 2004. History of lectins : from hemagglutinins to biological recognition molecules. Glycobiology 14, 53–62. doi:10.1093/glycob/cwh122

Sina, A., Proulx-Bonneau, S., Roy, A., Poliquin, L., Cao, J., Annabi, B., 2010. The lectin concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKKγ/NF-κB-dependent pathway. Journal of Cell Communication and Signaling 4, 31–38. doi:10.1007/s12079-009-0084-0

Turek M, Krzyczmonik M, Balczewski P. 2016. "New hopes in cancer battle - a review of new molecules and treatment strategies." Medicinal Chemistry 12, 700-719.

Woo, H.J., Choi, Y.H., 2005. Growth inhibition of A549 human lung carcinoma cells by beta-lapachone through induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity. International Journal of Oncology 26, 1017–1023.

Yu, H.Y., Kim, S.O., Jin, C., Kim, G., Kim, W., Yoo, Y.H., Choi, Y.H., 2014. β -lapachone-induced apoptosis of human gastric carcinoma AGS cells is caspase-dependent and regulated by the PI3K / Akt pathway. Biomolecules & Therapeutics 22, 184–192.

CONCLUSÕES FINAIS

5 CONCLUSÕES FINAIS

- Os lipossomas preparados utilizando o lipídio funcionalizado DPPE-Cianur apresentaram um tamanho de 135,70 ± 0,70 nm, e após a conjugação com a ConA este aumentou aproximadamente 12 nm. O potencial zeta apresentou uma pequena variação, passando de -14.13 ± 0.47 à - 18.57 ± 0.40. As varrições encontradas sugerem a conjugação da ConA a superfície lipossomal, uma vez que a unidade tetrâmera da molécula apresenta 10 nm e potencial zeta de -22.14 ± 0.79 mV;
- Da mesma forma, os lipossomas PEGuilados e sítio-específicos preparados utilizando o lipídio funcionalizado DSPE-PEG-Cianur conjugado à ConA apresentaram um aumento no seu tamanho de aproximadamente 26 nm em comparação ao lipossoma não revestido, assim como no potencial zeta, sugerindo a conjugação da ConA à superfície dos lipossomas;
- As formulações sítio-específicas foram obtidas com aproximadamente 100% de conjugação, demostrando que a utilização do lipídio funcionalizado com o grupamento cloreto cianúrico terminal permitiu um excelente rendimento de reação;
- Valores acima de 95% de eficiência de encapsulação da β-lapachona foram obtidos em todas as formulações preparadas, sugerindo assim ser um sistema adequado para encapsulação da β-lap;
- A conjugação da ConA aos lipossomas e a sua atividade biológica foram confirmados pelos ensaios de hemaglutinação e calorimetria de titulação isotérmica. A atividade hemaglutinante da lectina foi preservada após a sua conjugação na superfície dos lipossomas.
- Os resultados obtidos no ITC mostraram que a ligação ConA-manose (MeαMan) é entalpicamente conduzida por ligações de hidrogénio, e que a ConA, após conjugação com os lipossomas, permaneceu viável para a interação com carboidratos, confirmando os resultados da hemaglutinação.
- Neste trabalho foi descrito os parâmetros termodinâmicos (ΔH, ΔS e ΔG) da interação da ConA ao lipídeos funcionalizado com o grupamento cloreto cianúrico terminal, mostrando que é uma ligação forte e ocorre possivelmente por interações hidrofóbicas de dessolvatação;
- A microscopia de fluorescência indicou uma maior captura dos lipossomas revestido com a ConA por células MCF7, demostrando que após 15 minutos de incubação as formulações sítio-específica já são capturadas. Confirmando *in vitro*, a funcionalidade da lectina após conjugação;
- Os resultados obtidos demostram que os sistemas desenvolvidos apresentam-se como uma estratégia promissora para a vetorização da β-lap às células tumorais. Além disso, os

nanocarreadores propostos poderão ser utilizados para a encapsulação de fármacos anticancerígenos, bem como, servir como modelo para a utilização de outros tipos de lectinas sinalizadoras.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, B. B.; GOLDSTEIN, I. J. Specific binding of concanavalin A to cross-linked dextran gels. **The Biochemical Journal**, v. 96, n. 3, p. 23–25, 1965.

AIRES, A. DE L. et al. β-Lapachone: A naphthoquinone with promising antischistosomal properties in mice. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 21, n. 3, p. 261–267, 2014.

ALCAÍN, F. J.; VILLALBA, J. M. NQO1-directed antitumour quinones. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 17, n. 6, p. 649–666, 2007.

ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 1, p. 36–48, 2013.

ALLEN, T. M.; HANSEN, C. B.; MENEZES, D. E. L. Pharmacokinetics of long-circulating liposomes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, n. 2–3, p. 267–284, 1995.

ALMEIDA, E. R. et al. Toxicological Assessment of Beta-lapachone on Organs from Pregnant and Non-pregnant Rats. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1276–1280, 2009.

ALVES, G. M. C. et al. Purificação e caracterização da β-lapachona e estudo de estabilidade dos cristais em diferentes condições de armazenamento. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 413–416, 2008.

AMBROSI, M.; CAMERON, N. R.; DAVIS, B. G. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycocode. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 3, p. 1593–1608, 2005.

ANDREWS, F. J.; GRIFFITHS, R. D. Glutamine: essential for immune nutrition in the critically ill. **British Journal of Nutrition**, v. 87, n. S1, p. S3, 9 Mar. 2007.

ARAÚJO, E. L.; ALENCAR, J. R. B.; NETO, P. J. R. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 57–59, 2002.

BAE, Y. H. Drug targeting and tumor heterogeneity. **Journal of Controlled Release**, v. 133, n. 1, p. 2–3, 2009.

BAKKER-WOUDENBERG, I. A. J. M. et al. Liposomes as carriers of antimicrobial agents or immunomodulatory agents in the treatment of infections. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. S61–S67, 1993.

BAKOWSKY, H. et al. Adhesion characteristics and stability assessment of lectin-modified liposomes for site-specific drug delivery. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1778, n. 1, p. 242–249, 2008.

BALZARINI, J.; LAETHEM, K. VAN. Profile of resistance of human immunodeficiency virus to mannose-specific plant lectins. **Journal of Virology**, v. 78, n. 19, p. 10617–10627, 2004.

BANERJEE, D.; SENGUPTA, S. Nanoparticles in cancer chemotherapy. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 104, p. 489–507, 2011.

BANG, W. et al. β -lapachone suppresses the proliferation of human malignant melanoma cells by targeting specificity protein 1. **Oncology Reports**, v. 35, p. 1109–1116, 2016.

BANGHAM, A. D. et al. The diffusion of ions from a phospholipid model membrane system. **Protoplasma**, v. 63, n. 1, p. 183–187, 1967.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 238–252, 1965.

BARENHOLZ, Y. Doxil- The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. **Journal of Controlled Release**, v. 160, n. 2, p. 117–134, 2012.

BARRAJÓN-CATALÁN, E. et al. Selective death of human breast cancer cells by lytic immunoliposomes: Correlation with their HER2 expression level. **Cancer Letters**, v. 290, n. 2, p. 192–203, 2010.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 167–179, 2007.

BÉDUNEAU, A. et al. Design of targeted lipid nanocapsules by conjugation of whole antibodies and antibody Fab' fragments. **Biomaterials**, v. 28, n. 33, p. 4978–4990, 2007.

BENDAS, G. et al. Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 181, n. 1, p. 79–93, 1999.

BENTLE, M. S. et al. New tricks for old drugs : the anticarcinogenic potential of DNA repair inhibitors. **Journal of Molecular Histology**, v. 37, p. 203–218, 2006a.

BENTLE, M. S. et al. Calcium-dependent Modulation of Poly (ADP-ribose) Polymerase-1 Alters Cellular Metabolism and DNA Repair. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 44, p. 33684–33696, 2006b.

BERGERS, J. J. et al. Liposomes as delivery systems in the prevention and treatment of infectious diseases. **Pharmacy World & Science**, v. 17, n. 1, p. 1–11, 1995.

BEY, E. A. et al. Catalase Abrogates b -Lapachone – Induced PARP1 Hyperactivation – Directed Programmed Necrosis in NQO1-Positive Breast Cancers. **Cancer Therapeutics Insights Molecular**, v. 12, n. 10, p. 2110–2121, 2013.

BIAN, J. et al. Lewis acid mediated highly regioselective intramolecular cyclization for the synthesis of β-lapachone. **Tetrahedron Letters**, v. 55, p. 1475–1478, 2014.

BIES, C.; LEHR, C.; WOODLEY, J. F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 425–435, 2004.

BLANCO, E. et al. β-Lapachone-containing PEG-PLA polymer micelles as novel nanotherapeutics against NQO1-overexpressing tumor cells. **Journal of Controlled Release**, v. 122, n. 3, p. 365–374, 2007.

BONDURANT, B. et al. Optical and scanning probe analysis of glycolipid reorganization upon concanavalin a binding to mannose-coated lipid bilayers. **Langmuir**, v. 19, n. 5, p. 1829–1837, 2003.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e Farmacologia de Quimioterápicos Antineoplásicos Derivados de Plantas. **Quimica Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010.

BRANDL, M.; GREGORIADIS, G. Biophysica BB Entrapment of haemoglobin into liposomes by the behaviour. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1196, p. 65–75, 1994.

BRILHANTE, R. S. N. et al. Terpinen-4-ol, tyrosol, and B-lapachone as potential antifungals against dimorphic fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 917–924, 2016.

BYRNE, J. D.; BETANCOURT, T.; BRANNON-PEPPAS, L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1615–1626, 2008.

CARACCIOLO, G. Liposome-protein corona in a physiological environment: Challenges and opportunities for targeted delivery of nanomedicines. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 11, n. 3, p. 543–557, 2015.

CASTRO, S. L. et al. European Journal of Medicinal Chemistry Synthesis of quinoidal molecules : Strategies towards bioactive compounds with an emphasis on lapachones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 69, p. 678–700, 2013.

CAVADA, B. S. et al. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current protein & peptide science**, v. 2, n. 2, p. 123–135, 2001.

CAVALCANTI, I. M. F. et al. The encapsulation of β-lapachone in 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex into liposomes: a physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 3, p. 332–340, 9 Oct. 2011.

CAVALCANTI, I. M. F. et al. Antimicrobial activity of b -lapachone encapsulated into liposomes against meticillin-resistant Staphylococcus aureus and Cryptococcus neoformans clinical strains. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 3, p. 103–108, 2015.

CHATTERJEE, A.; MANDAL, D. K. Quaternary association and reactivation of dimeric concanavalin A. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 35, n. 1–2, p. 103–109, 2005.

CHIARUGI, A. Poly(ADP-ribose) polymerase: Killer or conspirator? The "suicide hypothesis" revisited. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 3, p. 122–129, 2002.

CHIU, S. J.; UENO, N. T.; LEE, R. J. Tumor-targeted gene delivery via anti-HER2 antibody

(trastuzumab, Herceptin®) conjugated polyethylenimine. **Journal of Controlled Release**, v. 97, n. 2, p. 357–369, 2004.

CHOUAI, A.; SIMANEK, E. E. Kilogram-scale synthesis of a second-generation dendrimer based on 1,3,5-triazine using green and industrially compatible methods with a single chromatographic step. **Journal of Organic Chemistry**, v. 73, n. 6, p. 2357–2366, 2008.

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram qunatities of the galactose-specific lectin from the leaves of Bauhinia Monandra. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n. 5, p. 295–300, 2000.

COLEMAN, W. B.; TSONGALIS, G. J. Molecular mechanisms of human carcinogenesis. **Cancer: Cell Structures, Carcinogens and Genomic Instability**, v. 96, p. 321–349, 2006.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; MARTÍNEZ-PACHECO, R.; LANDIN, M. Effect of storage conditions on the stability of β-lapachone. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, p. 798–806, 2013.

DAVIS, B. G.; ROBINSON, M. A. Drug delivery systems based on sugar-macromolecule conjugates. **Current opinion in drug discovery & development**, v. 5, n. 2, p. 279–288, 2002.

DEAMER, D. W. From "banghasomes" to liposomes: a memoir of Alec Bangham, 1921-2010. **The FASEB journal**, v. 24, n. 5, p. 1308–1310, 2010.

DOMÍNGUEZ, A.; SUÁREZ-MERINO, B.; GOÑI-DE-CERIO, F. Nanoparticles and blood-brain barrier: the key to central nervous system diseases. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 766–779, 2014.

DONG, Y. et al. NIH Public Access. **Clinical Lymphoma**, v. 9, n. 1, p. 19–22, 2009.

DOS ANJOS, D. O. et al. Effects of a novel β-lapachone derivative on Trypanosoma cruzi: Parasite death involving apoptosis, autophagy and necrosis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 6, n. 3, p. 207–219, 2016.

DUNCAN, R.; GASPAR, R. Nanomedicine(s) under the Microscope. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 6, p. 2101–2141, 2011.

EDWARDS, K. A.; BAEUMNER, A. J. Liposomes in analyses. **Talanta**, v. 68, n. 5, p. 1421–1431, 2006.

EGUSQUIAGUIRRE, S. P. et al. Nanoparticle delivery systems for cancer therapy: Advances in clinical and preclinical research. **Clinical and Translational Oncology**, v. 14, n. 2, p. 83–93, 2012.

ERMAK, G.; DAVIES, K. J. A. Calcium and oxidative stress : from cell signaling to cell death. v. 38, n. 2001, p. 713–721, 2002.

ESTANQUEIRO, M. et al. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: The state of the art. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 126, p. 631–648, 2015.

FARRELL, D. et al. Nanotechnology-based cancer therapeutics - Promise and challenge - Lessons learned through the NCI alliance for nanotechnology in cancer. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 2, p. 273–278, 2011.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide : Sources , methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer Cancer**, v. 136, p. E359–E386, 2015.

GABIZON, A.; PAPAHADJOPOULOS, D. The role of surface charge and hydrophilic groups on liposome clearance in vivo. **BBA - Biomembranes**, v. 1103, n. 1, p. 94–100, 1992.

GADELHA, C. A. D. A. et al. Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of Canavalia maritima. **Journal of Structural Biology**, v. 152, n. 3, p. 185–194, 2005.

GLORIEUX, C. et al. Overexpression of NAD(P)H : quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and genomic gain of the NQO1 locus modulates breast cancer cell sensitivity to quinones. **Life Sciences**, v. 145, p. 57–65, 2016.

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of atp-D dependent transporters. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 1, p. 48–58, 2002.

GREGORIADIS, G. The carrier potential of liposomes in biology and medicine. **The New England Journal of Medicine**, v. 295, n. 13, p. 704, 1976.

GRIMM, J.; SCHEINBERG, D. A. Will nanotechnologyi influence targeted cancer therapy? **Seminars in Radiation Oncology**, v. 21, n. 2, p. 80–87, 2011.

GUIMARÃES, T. T. et al. Potent naphthoquinones against antimony-sensitive and -resistant Leishmania parasites: Synthesis of novel α- and nor-α-lapachone-based 1,2,3-triazoles by copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 523–530, 2013.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HANSEN, C. B. et al. Attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes: evaluation, comparison and optimization of coupling procedures. **BBA - Biomembranes**, v. 1239, n. 2, p. 133–144, 1995.

HUANG, L.; KENNEL, S. J. Binding of immunoglobulin G to phospholipid vesicles by sonication. **Biochemistry**, v. 18, n. 9, p. 1702–7, 1979.

IDIL, N. et al. Concanavalin A immobilized magnetic poly(glycidyl methacrylate) beads for prostate specific antigen binding. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 134, p. 461–468, 2015.

IMMORDINO, M. L.; DOSIO, F.; CATTEL, L. Stealth liposomes: Review of the basic science,

rationale, and clinical applications, existing and potential. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 3, p. 297–315, 2006.

IMURA, Y. et al. Thrombolytic and pharmacokinetic properties of an immunoconjugate of single-chain urokinase-type plasminogen activator (u-PA) and a bispecific monoclonal antibody against fibrin and against u-PA in baboons. **Blood**, v. 79, n. 9, p. 2322–9, 1992.

INA, C. et al. Screening for and purification of novel self-aggregatable lectins reveal a new functional lectin group in the bark of leguminous trees. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1726, n. 1, p. 21–27, 2005.

INCA. **ABC DO CÂNCER: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2011.

INCA, J. A. G. D. S. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. 2016. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

IVEY, A. J. W. et al. Improving cancer therapies by targeting the physical and chemical hallmarks of the tumor microenvironment. 2015.

JACQUES, A. V. et al. Lectin from Canavalia brasiliensis (ConBr) protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/Akt pathway. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 6, p. 836–842, 2013.

JAIN, D. et al. Structural basis of functional mimicry between carbohydrate and peptide ligands of con A. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 272, p. 843–849, 2000.

JEMAL, A.; BRAY, F.; FERLAY, J. Global cancer statistics. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69–90, 2011.

JURCA, G. et al. Integrating text mining , data mining , and network analysis for identifying genetic breast cancer trends. **BMC Research Notes**, v. 9, n. 236, p. 1–35, 2016.

KENNEDY, J. F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, n. 3, p. 219–230, 1995.

KIRPOTIN, D. B. et al. Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. **Cancer Research**, v. 66, n. 13, p. 6732–6740, 2006.

KOREN, E.; TORCHILIN, V. P. Drug carriers for vascular drug delivery. **IUBMB Life**, v. 63, n. 8, p. 586–595, 2011.

KOZLOWSKA, D. et al. Molecular and magnetic resonance imaging: The value of immunoliposomes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 15, p. 1402–1411, 2009.

KUBOTA, T. et al. Targeting Cancer Chemotherapy Using a Monoclonal Antibody (NCC-LU-243) Conjugated With Mitomycin C. **Journal of Surgical Oncology**, v. 80, p. 75–80, 1992.

KUMAR, K. K. et al. Biological role of lectins: A review. **Journal of Orofacial Sciences**, v. 4, n. 1, p. 20, 2012.

KUNG, H.-N. et al. In vitro and in vivo wound healing-promoting activities of human cathelicidin LL-37. **The Journal of investigative dermatology**, v. 128, n. 1, p. 223–36, 2008.

LAMBERTI, M. J. et al. Synergistic enhancement of antitumor effect of B-Lapachone by photodynamic induction of quinone oxidoreductase (NQO1). **Phytomedicine**, v. 20, n. 11, p. 1007–12, 2013a.

LAMBERTI, M. J. et al. Phytomedicine Synergistic enhancement of antitumor effect of β - Lapachone by photodynamic induction of quinone oxidoreductase (NQO1). **Phytomedicine**, v. 20, n. 11, p. 1007–1012, 2013b.

LAVANYA LATHA, V.; NAGENDER RAO, R.; NADIMPALLI, S. K. Affinity purification, physicochemical and immunological characterization of a galactose-specific lectin from the seeds of Dolichos lablab (Indian lablab beans). **Protein Expression and Purification**, v. 45, n. 2, p. 296–306, 2006.

LAVERMAN, P. et al. Liposomes for scintigraphic detection of infection and inflammation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 37, n. 1–3, p. 225–235, 1999.

LEE, H. et al. Endoplasmic reticulum stress-induced JNK activation is a critical event leading to mitochondria-mediated cell death caused by β-lapachone treatment. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e21533, 2011.

LESERMAN, L. D. et al. Specific interaction of myeloma tumor cells with hapten-bearing liposomes containing methotrexate and carboxyfluorescein. **Cancer Research**, v. 40, n. 12, p. 4768–4774, 1980.

LI, C. J. et al. Potent inhibition of tumor survival in vivo by beta-lapachone plus taxol: combining drugs imposes different artificial checkpoints. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 23, p. 13369–74, 1999.

LI, C.-Y. et al. Concanavalin A, from an old protein to novel candidate anti-neoplastic drug. **Current molecular pharmacology**, v. 3, n. 3, p. 123–128, 2010.

LI, L. S. et al. Modulating endogenous NQO1 levels identifies key regulatory mechanisms of action of β-lapachone for pancreatic cancer therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 2, p. 275–285, 2011a.

LI, W. WEN et al. Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 414, n. 2, p. 282–286, 2011b.

LI, Y. et al. Potent Induction of Apoptosis by ␣ -Lapachone in Human Multiple Myeloma Cell Lines and Patient Cells. **Molecular Medicine**, v. 6, n. 12, p. 1008–1015, 2000.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 2, p. 637–674, 1998.

LIU, B. et al. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 482, n. 1–2, p. 1–6, 2009.

LIU, Z. et al. Could plant lectins become promising anti-tumour drugs for causing autophagic cell death? **Cell Proliferation**, v. 46, n. 5, p. 509–515, 2013.

LOURENÇO, A. L. et al. Identification of Nor-β-Lapachone derivatives as potential antibacterial compounds against Enterococcus faecalis clinical strain. **Current Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 684–689, 2011.

LU, J. et al. Quinones derived from plant secondary metabolites as anti-cancer agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 456–463, 2013.

MA, X. et al. Nanotechnology-enabled delivery of NQO1 bioactivatable drugs. **Journal of Drug Targeting**, v. 23, n. 7, p. 672–680, 2015.

MA, Y. et al. NQO1 overexpression is associated with poor prognosis in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **BMC Cancer**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2014.

MAEDA, H. Macromolecular therapeutics in cancer treatment: The EPR effect and beyond. **Journal of Controlled Release**, v. 164, n. 2, p. 138–144, 2012.

MANJAPPA, A. S. et al. Antibody derivatization and conjugation strategies: Application in preparation of stealth immunoliposome to target chemotherapeutics to tumor. **Journal of Controlled Release**, v. 150, n. 1, p. 2–22, 2011.

MAUCERI, A. et al. Recognition of concanavalin a by cationic glucosylated liposomes. **Langmuir**, v. 30, n. 38, p. 11301–11306, 2014.

MCNEIL, S. E. Nanoparticle therapeutics: A personal perspective. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 1, n. 3, p. 264–271, 2009.

MISHRA, B.; PATEL, B. B.; TIWARI, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 9–24, 2010.

MITCHELL, S. W.; REICHERT, E. T. **Venoms of Poisonous Serpents**. Washington: The Smithsonian Institution, 1886.

MITCHELL, W. **Venom of the Rattlesnake**. Washington: Smithsonian Institution, 1860.

MOHANTY, C. et al. Receptod mediated tumor targeting: An emerging approach for cancer therapy. **Current Drug Delivery**, v. 8, p. 45–58, 2011.

MONKS, T. J. et al. Quinone chemistry and toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 6, n. 2, p. 2–16, 1992.

MOREIRA, J. N. . B et al. A growth factor antagonist as a targeting agent for sterically

stabilized liposomes in human small cell lung cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1514, n. 2, p. 303–317, 2001.

MORENO, E. et al. Assessment of β-lapachone loaded in lecithin-chitosan nanoparticles for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis in L. major infected BALB/c mice. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 11, n. 8, p. 2003–2012, 2015.

MOZAFARI, M. R. et al. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. **Journal of liposome research**, v. 18, p. 309–327, 2008.

MU, L.; SPRANDO, R. L. Application of nanotechnology in Cosmetics. **Pharmacy Research**, v. 27, n. 1, p. 1746–1749, 2010.

NASONGKLA, N. et al. Enhancement of solubility and bioavailability of β-Lapachone using cyclodextrin inclusion complexes. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 10, p. 1626–1633, 2003.

NAZIR, S. et al. Nanomaterials in combating cancer: Therapeutic applications and developments. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 10, n. 1, p. 19–34, 2014.

NCI. **Defining Cancer, National Cancer Institute at Institutes of Health**. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>. Acesso em: 15 dec. 2016.

NIELSEN, U. B. et al. A novel assay for monitoring internalization of nanocarrier coupled antibodies. **BMC Immunology**, v. 7, p. 24, 2006.

NOBILI, S. et al. Natural compounds for cancer treatment and prevention. **Pharmacological Research**, v. 59, n. 6, p. 365–378, 2009.

NOBLE, G. T. et al. Ligand-targeted liposome design: Challenges and fundamental considerations. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 32–45, 2014.

NOBS, L. et al. Current methods for attaching targeting ligands to liposomes and nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 8, p. 1980–1992, 2004.

O'BRIEN, P. J. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 80, p. 1–41, 1991.

OH, E.; PARK, H. J. Implications of NQO1 in cancer therapy. **BMB Reports**, v. 48, n. 11, p. 609–617, 2015.

OLIVEIRA, P. A. et al. Chemical carcinogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 4, p. 593–616, 2007.

OUGH, M. et al. Efficacy of beta-lapachone in pancreatic cancer treatment: exploiting the novel, therapeutic target NQO1. **Cancer Biology & Therapy**, v. 4, n. 1, p. 102–109, 2005.

PANDEY, H.; RANI, R.; AGARWAL, V. Liposome and their applications in cancer therapy human & animal health. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, p. 1–10, 2016.

PARDEE, A. B.; LI, Y. Z.; LI, C. J. Cancer therapy with ß-Lapachone. **Current Cancer Drug Targets**, v. 2, n. 3, p. 227–242, 2002.

PARHI, P.; MOHANTY, C.; SAHOO, S. K. Nanotechnology-based combinational drug delivery : an emerging approach for cancer therapy. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 17–18, p. 1044–1052, 2012.

PARK, E. J.; CHOI, K. S.; KWON, T. K. B-Lapachone-induced reactive oxygen species (ROS) generation mediates autophagic cell death in glioma U87 MG cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 189, n. 1–2, p. 37–44, 2011.

PARK, H. J. et al. Cancer Therapy : Preclinical Heat-Induced Up-Regulation of NAD (P) H : Quinone Oxidoreductase Potentiates Anticancer Effects of β -Lapachone. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 24, p. 8866–8871, 2005.

PARK, J. W. et al. Tumor targeting using anti-her2 immunoliposomes. **Journal of Controlled Release**, v. 74, n. 1–3, p. 95–113, 2001.

PARK, J. W. et al. Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced anticancer efficacy due to targeted delivery. **Clinical Cancer Research**, v. 8, p. 1172–1181, 2002.

PAROOEI, M. et al. **Preparation and physicochemical characterization of immunoliposome nanoparticles as a vaccine delivery system: Leishmaniasis as a modelClinical Biochemistry**Elsevier B.V., , 2011. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000991201102426X>

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S. K. Nanoparticles: A boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 8, n. 2, p. 147–166, 2012.

PENNING, T. D. et al. Discovery of the Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitor 2- [(R)-2-methylpyrrolidin-2-yl]-1 H-benzimidazole-4-carboxamide (ABT-888) for the treatment. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, p. 514–523, 2009.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant physiology**, v. 109, n. 2, p. 347–352, 1995.

PINK, J. J. et al. Activation of a cysteine protease in MCF-7 and T47D breast cancer cells during β-Lapachone-mediated apoptosis. **Experimental Cell Research**, v. 255, p. 144–155, 2000.

PINTO-ALPHANDARY, H.; ANDREMONT, A.; COUVREUR, P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: Research and applications. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 13, n. 3, p. 155–168, 2000.

RÍOS-LUCI, C. et al. European Journal of Medicinal Chemistry b -Lapachone analogs with enhanced antiproliferative activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 264–274, 2012.

RODON, J.; PEREZ, J.; KURZROCK, R. Combining targeted therapies: practical issues to consider at the bench and bedside. **The Oncologist**, v. 15, n. 1, p. 37–50, 2010.

ROGERS, C.; LOUIS, S. Hepatic uptake of proteins coupled to fetuin glycopeptide. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 45, n. 3, p. 622–629, 1971.

ROY, B. et al. Role of PI3K/Akt/mTOR and MEK/ERK pathway in concanavalin A induced autophagy in HeLa cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 210, n. 1, p. 96–102, 2014.

SAKATA, S. et al. Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signals using sensor and electroresponsive hydrogel. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 76, n. 4, p. 733–737, 2007.

SALIM, M. et al. Amphiphilic designer nano-carriers for controlled release: from drug delivery to diagnostics. **Medicinal Chemical Communications**, v. 5, n. 11, p. 1602–1618, 2014.

SANTOS, H. M. L. R. et al. Cytotoxicity of doxorubicin-loaded Con A-Liposomes. **Drug Development Research**, v. 67, p. 430–437, 2006.

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: A bala mágica acertou? **Quimica Nova**, v. 25, n. 6, p. 1181–1185, 2002.

SAPRA, P. et al. Improved therapeutic responses in a xenograft model of human B lymphoma (Namalwa) for liposomal vincristine versus liposomal doxorubicin targeted via anti-CD19 IgG2a or Fab′ fragments. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 3, p. 1100–1111, 2004.

SAPRA, P.; ALLEN, T. M. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. **Progress in Lipid Research**, v. 42, n. 5, p. 439–462, 2003.

SAPRA, P.; TYAGI, P.; ALLEN, T. M. Ligand-targeted liposomes for cancer treatment. **Current Drug Delivery**, v. 2, p. 369–381, 2005.

SAWANT, R. R.; TORCHILIN, V. P. Challenges in development of targeted liposomal therapeutics. **The AAPS journal**, v. 14, n. 2, p. 303–15, 2012.

SEN, K.; MANDAL, M. Second generation liposomal cancer therapeutics : Transition from laboratory to clinic. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 448, n. 1, p. 28–43, 2013.

SEOANE, S. et al. Administration of the optimized β-Lapachone – poloxamer – cyclodextrin ternary system induces apoptosis , DNA damage and reduces tumor growth in a human breast adenocarcinoma xenograft mouse model. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, n. 3, p. 497–504, 2013.

SHARMA, A.; SHARMA, U. S. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 154, n. 2, p. 123–140, 1997.

SHARMA, P. et al. An epigenetic antimalarial resistance mechanism involving parasite genes linked to nutrient uptake. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 27, p. 19429–19440, 2013.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins : from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53–62, 2004.

SHI, M.; LU, J.; SHOICHET, M. S. Organic nanoscale drug carriers coupled with ligands for targeted drug delivery in cancer. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 31, p. 5485, 2009.

SHMEEDA, H. et al. Her2-targeted pegylated liposomal doxorubicin: Retention of target-specific binding and cytotoxicity after in vivo passage. **Journal of Controlled Release**, v. 136, n. 2, p. 155–160, 2009.

SILVA, F. D. C.; FERREIRA, V. F. Natural naphthoquinones with great importance in medicinal chemistry. **Current Organic Synthesis**, v. 13, n. 3, p. 334–371, 2016.

SILVA, F. O. et al. Antiproliferative effect of Canavalia brasiliensis lectin on B16F10 cells. **Research in Veterinary Science**, v. 96, n. 2, p. 276–282, 2014.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, C. B. V. DE. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -Lapachona e derivados. **Quimica Nova**, v. 26, n. 3, p. 407–416, 2003.

SINHA, S. et al. Subunit assembly of plant lectins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 17, n. 5, p. 498–505, 2007.

SLAMON, D. J. et al. Studies of the HER-2 / neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. **American Association for the Advancement of Science**, v. 244, n. 4905, p. 707–712, 1989.

SOUSA, E. T.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Quimica Nova**, v. 39, n. 4, p. 486–495, 2016.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. **World Cancer Report 2014**. Lyon:International Agency for Research on Cancer,WHO, 2014.

STORM, G.; CROMMELIN, D. J. A. Liposomes: Quo vadis? **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v. 1, n. 1, p. 19–31, 1998.

SUDHEESH, M. S. et al. Development and characterization of lectin-functionalized vesicular constructs bearing amphotericin B for bio-film targeting. **Journal of drug targeting**, v. 17, n. February, p. 148–158, 2009.

SUN, X. et al. Selective induction of necrotic cell death in cancer cells by beta-lapachone through activation of DNA damage response pathway. **Cell Cycle**, v. 5, n. 17, p. 2029–35, 2006.

SUSEELAN, K. N. et al. Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (Helianthus tuberosus L.) tubers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 407, n. 2, p. 241–247, 2002.

TAGLIARINO, C. et al. μ-calpain activation in β-Lapachone-mediated apoptosis colleen. **Cancer Biology & Therapy**, v. 2, p. 141–152, 2003.

TARBELL, J. M.; CANCEL, L. M. The glycocalyx and its significance in human medicine. **Journal of Internal Medicine**, v. 280, n. 1, p. 97–113, 2016.

TORCHILIN, V. P. et al. p-nitrophenylcarbonyl-PEG-PE-liposomes: Fast and simple attachment of specific ligands, including monoclonal antibodies, to distal ends of PEG chains via p-nitrophenylcarbonyl groups. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1511, n. 2, p. 397–411, 2001.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Reviews Drug discovery**, v. 4, n. 2, p. 145–60, 2005.

TORCHILIN, V. P. Passive and active drug targeting: Drug delivery to tumors as an example. In: **Drug Delivery**. Heidelberg: Springer, 2010. v. 1p. 3–53.

TORCHILIN, V. P. Multifunctional nanocarriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 302–315, 2012.

TORRE, L. A. et al. Global cancer incidence and mortality rates and trends--An update. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 25, n. 1, p. 1–12, 2015.

VAN DAMME, E. J. M. et al. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 6, p. 575–692, 1998.

VAN DAMME, E. J. M.; LANNOO, N.; PEUMANS, W. J. Chapter 3 Plant lectins. **Advances in Botanical Research**, v. 48, n. 8, p. 107–209, 2008.

VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1538–1550, 2011.

VEMURI, S.; RHODES, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 70, n. 2, p. 95–111, 1995.

VICO, R. V.; VOSKUHL, J.; RAVOO, B. J. Multivalent interaction of cyclodextrin vesicles, carbohydrate guests, and lectins: A kinetic investigation. **Langmuir**, v. 27, n. 4, p. 1391–1397, 2011.

VITETTA, E. S. et al. Immunotoxins : A new approach to cancer therapy. **Science**, v. 219, n. 4585, p. 644–650, 1983.

WANG, A.; LANGER, R. S.; FAROKHZAD, O. Nanoparticle delivery of cancer drugs. **Annual Review of Medicine**, v. 63, n. 1, p. 85–98, 2011.

WANG, H. X.; NG, T. B. Concurrent isolation of a Kunitz-type trypsin inhibitor with antifungal activity and a novel lectin from Pseudostellaria heterophylla roots. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 342, n. 1, p. 349–353, 2006.

WANG, M.; THANOU, M. Targeting nanoparticles to cancer. **Pharmacological Research**, v. 62, n. 2, p. 90–99, 2010.

WANG, X. et al. Direct measurement of glyconanoparticles and lectin interactions by isothermal titration calorimetry. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 10, p. 4248–4252, 2012.

WATKINS, W. M.; MORGAN, W. T. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. **Nature**, v. 169, n. 4307, p. 825–826, 1952.

WEISSMANN, G. et al. A general method for the introduction of enzymes, by means of immunoglobulin-coated liposomes, into lysosomes of deficient cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 72, n. 1, p. 88–92, 1975.

WOO, H. J.; CHOI, Y. H. Growth inhibition of A549 human lung carcinoma cells by beta-lapachone through induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity. **International Journal of Oncology**, v. 26, n. 4, p. 1017–1023, 2005.

YANG, T. et al. Antitumor effect of paclitaxel-loaded PEGylated immunoliposomes against human breast cancer cells. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 12, p. 2402–2411, 2007a.

YANG, T. et al. Preparation and evaluation of paclitaxel-loaded PEGylated immunoliposome. **Journal of Controlled Release**, v. 120, n. 3, p. 169–177, 2007b.

YANG, Y. et al. Clinical implications of high NQO1 expression in breast cancers. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 33, n. 1, p. 1–9, 2014a.

YANG, Z. et al. Evaluating the potential of cubosomal nanoparticles for oral delivery of amphotericin B in treating fungal infection. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 327–336, 2014b.

YOSHIZAWA, Y. et al. PEG liposomalization of paclitaxel improved its in vivo disposition and anti-tumor efficacy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 412, n. 1–2, p. 132–141, 2011.

YU, B. et al. Receptor-targeted nanocarriers for therapeutic delivery to cancer. **Molecular Membrane Biology**, v. 27, n. 7, p. 286–298, 2010.

YU, H. Y. et al. β -lapachone-induced apoptosis of human gastric carcinoma ags cells is caspase-dependent and regulated by the PI3K / Akt pathway. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 22, n. 3, p. 184–192, 2014.

YU, S.-W. et al. Mediation of poly(ADP-Ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. **Science**, v. 297, p. 259–263, 2002.

ZAMBONI, W. C. Liposomal, nanoparticle, and conjugated formulations of anticancer agents. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 23, p. 8230–8234, 2005.

ZHAO, R. et al. Cell surface glycoprotein PZR is a major mediator of concanavalin A-induced cell signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 10, p. 7882–7888, 2002.

ZHAORIGETU, S. et al. Delivery of negatively charged liposomes into the atherosclerotic plaque of apolipoprotein E-deficient mouse aortic tissue. **Journal of Liposome Research**, v. 24, n. 3, p. 182–190, 2014.

ZHU, H.; LI, Y. NAD (P) H : Quinone oxidoreductase 1 and its potential protective role in cardiovascular diseases and related conditions. **Cardiovascular Toxicology**, v. 12, p. 39–45, 2012.

.

ANEXO

ANEXO A – Artigo publicado

Glutamine-Loaded Liposomes: Preliminary Investigation, Characterization, and Evaluation of Neutrophil Viability

Artigo publicado na AAPS PharmSciTech (ISSN: 1530-9932) em 2016

Qualis 2015 em Ciências Biológicas I: B2.

Fator de impacto 2015: 1.954

AAPS PharmSciTech, Vol. 17, No. 2, April 2016 (© 2015)
DOI: 10.1208/s12249-015-0375-0

Research Article

Glutamine-Loaded Liposomes: Preliminary Investigation, Characterization, and Evaluation of Neutrophil Viability

Larissa Chaves Costa,[1,4] Bárbara Nayane Rosário Fernandes Souza,[1] Fábio Fidélis Almeida,[1] Cláudia Jacques Lagranha,[2] Pabyton Gonçalves Cadena,[1,3] Nereide Stela Santos-Magalhães,[1,4] and Mariane Cajubá de Britto Lira-Nogueira[1,2,5]

Received 27 March 2015; accepted 16 July 2015; published online 31 July 2015

Abstract. Glutamine has received attention due to its ability to ameliorate the immune system response. Once conventional liposomes are readily recognized and captured by immune system cells, the encapsulation of glutamine into those nanosystems could be an alternative to reduce glutamine dosage and target then to neutrophils. Our goals were to nanoencapsulate glutamine into conventional liposomes (Gln-L), develop an analytical high-performance liquid chromatography (HPLC) method for its quantification, and evaluate the viability of neutrophils treated with Gln-L. Liposomes were prepared using the thin-film hydration technique followed by sonication and characterized according to pH, mean size, zeta potential, and drug encapsulation efficiency (EE%). We also aimed to study the effect of liposomal constituent concentrations on liposomal characteristics. The viability of neutrophils was assessed using flow cytometry after intraperitoneal administration of free glutamine (Gln), Gln-L, unloaded-liposome (UL), and saline solution as control (C) in healthy Wistar rats. The selected liposomal formulation had a mean vesicle size of 114.65±1.82 nm with a polydispersity index of 0.30±0.00, a positive surface charge of 36.30±1.38 mV, and an EE% of 39.49±0.74%. The developed chromatographic method was efficient for the quantification of encapsulated glutamine, with a retention time at 3.8 min. A greater viability was observed in the group treated with glutamine encapsulated compared to the control group (17%), although neutrophils remain viable in all groups. Thus, glutamine encapsulated into liposomes was able to increase the number of viable neutrophils at low doses, thereby representing a promising strategy for the treatment of immunodeficiency conditions.

KEY WORDS: cell viability; glutamine; liposomes; neutrophils.

INTRODUCTION

Glutamine (Gln) is the most abundant free amino acid in plasma and muscle tissue and can also be found at relatively high concentrations in other tissues (1). The synthesis of this amino acid occurs primarily in skeletal muscle, as well as in the lung, liver, and brain. However, its consumption occurs primarily in the kidney, immune system, and gastrointestinal tract cells. The liver is the only organ able to consume and synthesize glutamine (2). Despite being classified as nonessential, glutamine is currently considered to be conditionally essential; in specific critical contexts, such as surgery, trauma, and exhaustive exercise, the synthesis of glutamine does not supply the demand required by the body, resulting in immunocompetence and an increased incidence of infections (3–5).

Glutamine plays a major role in cell proliferation particularly in the immune system, in which it has been used at high rates by lymphocytes as a source of energy, providing an ideal condition for the biosynthesis of nucleotides and thus cell replication (6). Regarding leukocytes, they are largely dependent on skeletal muscle glutamine synthesis and are also released into the blood to satisfy their metabolic requirements. This is due to the absence of glutamine synthetase, which catalyzes the synthesis of glutamine from ammonia and glutamate (7).

Neutrophils constitute 60% of circulating leukocytes and act as the first line of defense in the plasma and perform phagocytosis either alone or in cooperation with antigen-specific defenses. Processes of endocytosis, secretion of active compounds, and generation of reactive oxygen species are mostly dependent on glutamine metabolism in neutrophils (8).

Because neutrophils use glutamine at high rates compared to other cells of the immune system, researchers have investigated the effect of this amino acid on the cell parameters of human and rat neutrophils (9,10).

[1] Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.
[2] Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua do Alto do Reservatório s/n, Bela Vista, CEP: 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil.
[3] Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.
[4] Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.
[5] To whom correspondence should be addressed. (e-mail: marianelira@gmail.com)

Moreover, glutamine is a component of proteins, it transports ammonia between tissues, is a source of carbon skeleton for gluconeogenesis, contributes to acid-base balance, and participates in the synthesis of nucleotides and nucleic acids (4,11); thus, it is of great importance for the maintenance and proper functioning of an organism.

The events of metabolic stress or diseases, such as dengue, cancer, AIDS, burns, surgeries, and intense and prolonged exercise, are some situations in which there is an excessive consumption of glutamine, surpassing its synthesis by the body (12). Previous studies have demonstrated that a decrease in the intramuscular and plasma concentrations of glutamine may be partially responsible for the depression of immunological function and the administration of glutamine may reduce this state (13–15), thereby providing an improved recovery of patients with such diseases (16,17).

Despite presenting significant benefits in some situations, previous studies have reported that glutamine supplementation can promote renal failure and may exacerbate the clinical situation of chronic kidney disease, particularly in diabetic patients (11,18,19). Moreover, it has a solubility in water of 48 g/l at 30°C (pKa_1=2.17 and pKa_2=9.13) and is unstable in solution, which may undergo breakdown depending on temperature, pH, and anion concentration (20,21). An approach to overcome these physicochemical limitations and to reduce adverse effects, while increasing its therapeutic effect, is the development of a pharmaceutical dosage form that is able to target the bioactive compound to a specific site of action, thereby increasing therapeutic efficacy. Thus, drug delivery systems, such as liposomes, may offer advantages to overcome these limitations.

Liposomes are spherical vesicles consisting of one or more concentric bilayers of phospholipids that isolate one or more aqueous inner compartments of the external environment (22). Liposomes are classified as conventional and consist of phospholipids and cholesterol; this type is quickly recognized and taken up by the immune system and is ideal for carrying drugs to neutrophils (23). We propose that the use of glutamine-loaded conventional liposomes could be a promising approach to target this amino acid to neutrophils, thereby enhancing their activity.

Within this framework, the goal of this research was to first develop conventional liposomes containing glutamine and to select a typical formulation after experimental design. Second, we aimed to develop an analytical method to determine and quantify the nanoencapsulated glutamine using high-performance liquid chromatography (HPLC), and finally, we evaluated the neutrophil viability, after the administration of glutamine-loaded conventional liposomes in Wistar rats.

MATERIAL AND METHODS

Reagents

L-Glutamine (Gln≥99%), cholesterol (Chol), stearylamine (SA), glycogen from oyster type II, and propidium iodide were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). 98% Soya phosphatidylcholine (PC) was obtained from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Solvents and other chemicals were supplied by Merck (Darmstadt, Germany).

Methodology

Experimental Design

First, a two-level 2^{4-1} fractional experimental design was performed to study the effect of constituent concentrations on the properties of liposomes. Four formulation factors, which mainly affect liposome physicochemical characteristics, were evaluated at two levels and a central point. The factors were defined as follows: A [PC]=15.63, 31.27, and 46.91 mM; B [Chol]=4.42, 8.84, and 13.26 mM; C [SA]=0, 4.19, and 8.38 mM; and D [Gln]=27.37, 41.05, and 54.74 mM.

The pH, mean size of the vesicles, polydispersity index (PDI), zeta potential, (ζ, mV), and drug encapsulation efficiency (EE%) of the liposomes were analyzed, as described below, and used as the response variables of the design study.

Next, a two-level 2^2 full experimental design was performed to study the effect of PC and Chol concentrations, as well as their second-order interactions, on the physicochemical characteristics. The design was performed using a matrix of seven experiments with a central point, and the factors defined were as follows: A [PC]=31.27, 39.09, and 46.91 mM and B [Chol]=8.84, 11.05, and 13.26 mM.

The same response variables of the fractional design study were used to analyze the full experimental design study.

Preparation of Glutamine-Loaded Conventional Liposomes

Glutamine-loaded liposomes were prepared using the modified thin-lipid-film method (24). Briefly, lipids consisting of soya phosphatidylcholine and cholesterol, with or without stearylamine, a positive charged lipid, were dissolved in a mixture of $CHCl_3$:MeOH (3:1 *v/v*) under magnetic stirring. The solvents were removed under pressure at 37±1°C, 80 rpm for 60 min, forming a thin lipid film. This film was then hydrated with 10 ml of phosphate buffer solution at pH 7.4, containing glutamine (27.37, 41.05, and 54.74 mM) that had been previously dissolved, resulting in the formation of multilamellar liposomes. Finally, the liposomal suspension was sonicated (Vibra Cell, Branson, USA) at 200 W and 40 Hz for 400 s under low temperature (4°C) to form small unilamellar liposomes.

Physicochemical Characterization of Glutamine-Loaded Conventional Liposomes

Liposome formulations were characterized by the measurement of pH, mean hydrodynamic diameter, PDI, and surface charge (zeta potential) of vesicles. The pH of the liposome dispersions was measured using a digital pH meter (Micronal B474, São Paulo, SP, Brazil) at 25°C. The polydispersity index and diameter of the liposomes were quantified using photon correlation spectroscopy (Delsa™ Nano S Particle analyzer, Beckman Coulter, Brea, CA, USA), at 25°C at a fixed angle of 90°. For the analysis, the samples were adequately diluted using 300 µl of liposomes and 700 µl of purified water. The zeta potential (ζ, mV) was measured at 25°C using the electrophoresis technique (Malvern Zetasizer Nano ZS90,

Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). In these analyses, liposome dispersions (50 µl) were diluted with 950 µl of purified water. The results represent the average of three determinations.

The drug EE% was determined using the ultrafiltration/ultracentrifugation technique with Ultrafree® units (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) (24). Liposomal samples (400 µl) were inserted into the filtration unit and subjected to centrifugation (Ultracentrifuge KT-20000, Kubota, Japan) at 8776×*g* for 1 h at 4°C. The content of Gln in the supernatant was measured using the HPLC method as detailed below.

Extraction and Determination of the Glutamine Content into Conventional Liposomes

The method for glutamine extraction was developed according to the two-phase system previously described by Bligh and Dyer (25), which obtained the organic (lipids) and aqueous (glutamine) phases. Briefly, for Gln extraction, 200 µl of liposomes was diluted into 400 µl of a mixture of $CHCl_3$:MeOH (1:1) and subsequently sonicated for 3 min. Next, 1 and 1.7 ml of chloroform and methanol, respectively, were added and sonicated for more than 3 min. For the two-phase system formation, purified water was added to a final volume of 5 ml. After visual separation, the aqueous fraction was filtered and analyzed, to determine the glutamine content, using the HPLC method.

The HPLC method for determining and quantifying the glutamine content into liposomes was performed using a liquid chromatographer (Waters Alliance e2695-2998, Waters, Milford, MA, USA) coupled with a photodiode array detector and operated by Empower™ software. The chromatographic run was performed using a reversed-phase Waters C18 XBridge® column (4.6×250 mm i.d. particle 3.5 µm) with 50 µl of sample injection volume at 37°C. HPLC analysis of Gln was performed using a mobile phase consisting of methanol and double-deionized water (6:4 *v*/*v*) at a flow rate of 0.7 ml/min and detection at 204 nm. Standard curves were assayed using glutamine solutions at concentrations ranging from 80 to 400 µg/ml. The assays were performed in triplicate.

In Vivo Experiment

Animals

The *in vivo* study was performed according to Lagranha and co-workers (10). This study was performed according to the Ethics Committee for Experiments on Animals of the Federal University of Pernambuco (CEUA-UFPE, Recife, Brazil) with protocol approval (#23076.013231/2012-47). Female Wistar rats (200±20 g) were maintained in collective cages until the day of the experiment, at a temperature of 22 ±2°C and relative humidity of 60% and under a cycle of 12 h light/12 h darkness with unrestricted access to water and food (commercial chow). The animals were randomly divided into five following groups of three rats each: Gln-IP (glutamine in solution by intraperitoneal route), Gln-GAV (glutamine in solution by gavage), Gln-L (glutamine-loaded liposomes), UL (unloaded liposomes), and C (control/saline as placebo). The rats did not present a metabolic disorder, such as diabetes, and were not subjected to intense exercise or surgical procedures.

Recruitment of Neutrophils

With the purpose of causing an inflammatory stimulus and the substantial migration of neutrophils into the intraperitoneal cavity, 15 ml of sterile oyster glycogen solution type II (1%) in PBS was administered intraperitoneally to the rats prior to the experiments.

Treatment

After 2 h of neutrophil recruitment, the rats received free Gln, Gln-L, UL, and saline solution as the C. Glutamine in its free form was administered *via* two different routes: orally (1 g/kg) according to Lagranha and colleagues (10,26) and intraperitoneally (0.06 g/kg). Gln-L (0.06 g/kg), UL, and saline solution were administered intraperitoneally (2 ml each, with the same volume, which corresponded to the glutamine-loaded liposomes).

Collecting Neutrophils

Rats were anesthetized with Urethane® (1.25 g/kg) and sacrificed by cervical dislocation 2 h after treatment. Neutrophils were obtained by intraperitoneal (i.p.) lavage with 40 ml sterile phosphate-buffered saline. The cells were centrifuged (1000×*g* for 10 min), washed twice with PBS, and then quantified in a Neubauer chamber using the Trypan Blue solution (1% in PBS) and optical microscopy (Olympus, USA).

Neutrophil Viability Assay

The viability of neutrophils was assessed using a flow cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson Systems, San Jose, CA, USA). The percentage of viable cells in each sample was determined using propidium iodide staining (solution at 0.05% in PBS) to identify dead cells. Data of 15.000 events were analyzed per sample. The fluorescence of the propidium iodide was detected at 630/622 nm.

Statistical Analysis

Experimental designs were performed in a random order. Statistical analyses were achieved using the OriginPro Academic 2015 (Origin Lab., Northampton, MA, USA). Statistically significant differences were determined using the Tukey multiple comparisons test, with p values less than 0.05 as the minimal level of significance.

RESULTS AND DISCUSSION

Experimental Design of Liposomal Formulations

Several factors related to the development of nanosystems may affect their characteristics, and a small change in even one factor may significantly change the properties of the entire system. According to the strategy of Cadena and colleagues (27), two experimental designs were performed aimed to study the effect of four factors in the formulation, *i.e.*, the

concentration of constituents on the physicochemical properties of Gln-L, thereby obtaining optimized formulations.

The experiments were randomly assayed to nullify the effect of inappropriate nuisance variables in both experimental designs. The nine runs of the two-level 2^{4-1} fractional experimental design and their response variables are shown in Table I. Each response variable was individually analyzed, and it was observed that a lower level of stearylamine (SA) and a higher level of soya phosphatidylcholine (PC) reduced the mean size of the vesicles (runs 2 and 4). However, a higher level of SA increased the pH (runs 5 and 8) and a higher level of SA, PC, and Chol reduced the PDI values (run 8). It was also observed that a higher level of SA increased the zeta potential (runs 5 and 8). The glutamine encapsulation efficiency (EE%) was not affected by the factors studied ($p<0.05$). The higher Gln level (54.74 mM) and central point (41.05 mM) presented no statistically significant difference on the EE% of 43.20±0.86 and 38.74±0.78%, respectively. However, run 8 had a mean size of 315.71±16.2, which is higher than the run found in the central point (177.7 ±7.8 nm). Thus, a concentration of 41.05 mM Gln was used in further experiments due to the smaller size of liposomes.

A scatterplot (Fig. 1) was used to identify the best liposomal formulation obtained in the fractional experimental design study, in which the central point (run 9) showed a zeta potential of 32.73±0.63 mV, an EE% of 38.74±0.78, and a mean vesicle size of 177.7±7.76, and maintained its stability in suspension for at least 45 days. Finally, run 9 was used as the typical formulation for the new experimental design.

The two-level 2^2 full experimental design was developed to study the effect of PC and Chol concentrations and their interactions on liposomal characteristics, once they are the main relevant lipids, which directly affected the physicochemical parameters studied above.

The concentration of SA (4.19 mM) was maintained because it did not statistically demonstrate significant differences ($p<0.05$) between the higher level and central point in the zeta potential, reducing the amount of SA used. Secondly, the presence of SA promoted a zeta potential value above

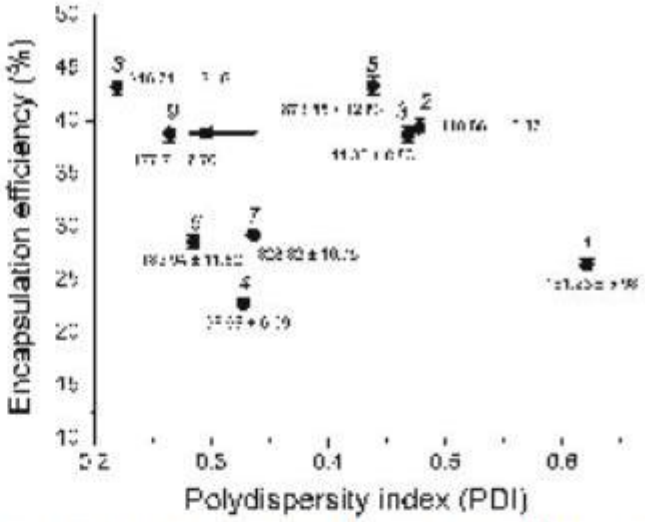


Fig. 1. Scatterplot of the formulations produced using a 2^{4-1} fractional experimental design and the effects of response variables: polydispersity index (PDI) and drug encapsulation efficiency (%). The *arrow* points the best liposomal formulation. Formulation run numbers and the mean size (nm) of liposomes are indicated *above each point*

30 mV (runs 5–9), which, as reported in the literature, is an ideal value (even negative or positive) to avoid vesicle aggregation by electrostatic repulsion (28).

Table I shows the results obtained in the design study. It was observed that only the mean size was significantly affected by PC and Chol concentrations ($p<0.05$), where the PC had the main statistically significant negative effect, and the higher level of PC (46.91 mM) decreased the mean size of the liposomes. The second-order interactions between the PC and CH concentration values had a positive effect, meaning that the main mean size was slightly enhanced by raising the levels of the two factors together. The results are shown in Table II.

With regard to the hydrophilic drug EE%, previous studies have reported values at approximately 14 to 23% as described by Wieber and colleagues (29), when encapsulating a

Table I. Experimental Design and Physicochemical Properties of Glutamine-Loaded Liposomes

Runs	PC (mM)	Chol (mM)	SA (mM)	Gln (mM)	pH	Size (nm)	PDI	ζ (mV)	EE (%)
A. Two-level 2^{4-1} fractional experimental design									
1	15.63	4.42	0	27.37	7.49	161.23±5.98	0.621±0.00	0.01±0.07	26.37±0.53
2	46.91	4.42	0	54.74	7.43	118.86±10.37	0.478±0.03	−14.73±1.19	39.30±0.79
3	15.63	13.26	0	54.74	7.49	144.36±8.83	0.469±0.04	1.94±0.14	38.66±0.77
4	46.91	13.26	0	27.37	7.54	99.68±5.66	0.328±0.01	5.73±0.30	22.68±0.45
5	15.63	4.42	8.38	54.74	7.58	873.55±12.83	0.438±0.01	31.96±1.35	43.25±0.87
6	46.91	4.42	8.38	27.37	7.62	185.94±11.82	0.285±0.02	33.73±1.58	28.53±0.57
7	15.63	13.26	8.38	27.37	7.65	328.82±10.75	0.336±0.01	31.40±1.21	29.14±0.58
8	46.91	13.26	8.38	54.74	7.68	315.71±16.16	0.220±0.01	33.20±1.25	43.20±0.86
9 (cp)	31.27	8.84	4.19	41.05	7.54	177.7±7.76	0.265±0.01	32.73±0.63	38.74±0.78
B. Two-level 2^2 full experimental design									
1	31.27	8.84	4.19	41.05	7.74	165.66±3.09	0.297±0.01	39.50±1.91	44.67±0.26
2	31.27	13.26	4.19	41.05	7.76	130.36±3.42	0.307±0.01	36.30±0.10	32.91±0.34
3	46.91	8.84	4.19	41.05	7.75	85.51±2.80	0.294±0.00	32. 93±1.01	7.35±1.00
4	46.91	13.26	4.19	41.05	7.75	96.16±1.23	0.274±0.01	36.90±1.50	28.29±0.07
5 (cp)	39.09	11.05	4.19	41.05	7.69	114.65±1.82	0.300±0.00	36.30±1.38	39.49±0.74

PC phosphatidylcholine, *Chol* cholesterol, *SA* stearylamine, *Gln* glutamine, *PDI* polydispersity index, ζ surface charge, *EE* encapsulation efficiency

Table II. ANOVA Table for the Full Experimental Design

Factors	Sums of square	Degrees of freedom	Mean square	*F*	*p* value
(1) PC (mM)[a]	3268.98	1	3268.98	122.87	0.008041
(2) Chol (mM)	151.90	1	151.90	5.71	0.139429
1 by 2[a]	527.85	1	527.85	19.84	0.046887
Error	133.13	1	133.13	5.00	0.154750
Total	53.21	2	26.60		

PC phosphatidylcholine, *Chol* cholesterol
[a] Significant response

decapeptide with a concentration varying from 0.25 to 0.75 mg/ml. Xu and colleagues (2012) also demonstrated a low encapsulation efficiency for hydrophilic compounds, such as the drug tenofovir (Mw 287.2113). The authors varied the lipid concentrations and observed that lowering the amount of lipids promoted low drug encapsulation, while very high lipid concentrations (152.9 mM) showed an EE% of 9 to 45% using a drug concentration of 0.5, 1, 2.5, and 6.9 mg/ml. Importantly, a high amount of some lipids, particularly stearylamine, in liposome formulations could be toxic for cells (30). Our results corroborate with previous work in this field, in which we also obtained low encapsulation efficiency. However, in contrast to other studies that used a low drug concentration, we varied the glutamine concentration from 4 to 8 mg/ml, thereby obtaining a maximum encapsulation efficiency of 44%, which is a significant result.

On the basis of the results obtained in the two-level 2^2 full experimental design, specifically related to EE%, the central point (run 5 and EE% of 39.49±0.74%) was selected for the *in vivo* experiments, which had the lowest size (114.65 ±1.82 nm) and an acceptable PDI (0.300±0.00). After 45 days, in suspension form under low temperature (4°C), the formulation presented a mean size of 180±4.90 nm (PDI=0.30± 0.01).

Determination of Glutamine Content into Liposomes

In our study, as the glutamine was encapsulated into liposomes, which contained lipids, it was necessary to develop an efficient extraction method in parallel to an HPLC method, which would be able to quantify the glutamine without lipid interference, at a wavelength ranging from 190 to 210 nm (31). Thus, an extraction method based on the two-phase liquid-liquid system was first obtained to separate the aqueous and organic phases of the liposomes, which contained glutamine and lipids, respectively. Samples from the aqueous phase were withdrawn and analyzed using HPLC according to the parameters previously described. The chromatograms of glutamine, glutamine-loaded liposomes, and unloaded liposomes are shown in Fig. 2a, b. The standard curve of glutamine was plotted with nine concentrations and Gln peak areas allowing a following regression linear equation: $A=16348.56\times[Gln_{\mu g/ml}]-19853.12$; $r^2=0.99514$.

As observed, free glutamine had a retention time of approximately 3.80 min, and the same retention time was observed in the glutamine-loaded liposome chromatogram. Compared to the unloaded liposomes, no peak was observed at this retention time (3.8 min), and any peak related to lipids suggested an adequate separation of glutamine, which enabled its quantification of liposome formulations.

Amino acid analysis by HPLC presents limitations that are specifically related to sensitive and selective detection, in addition to a wide range of wavelengths varying from 205 to 230 nm (32). For this reason, studies related to the development of an adequate HPLC method, aimed to analyze glutamine in different systems, were widely found in the literature. Snowden and

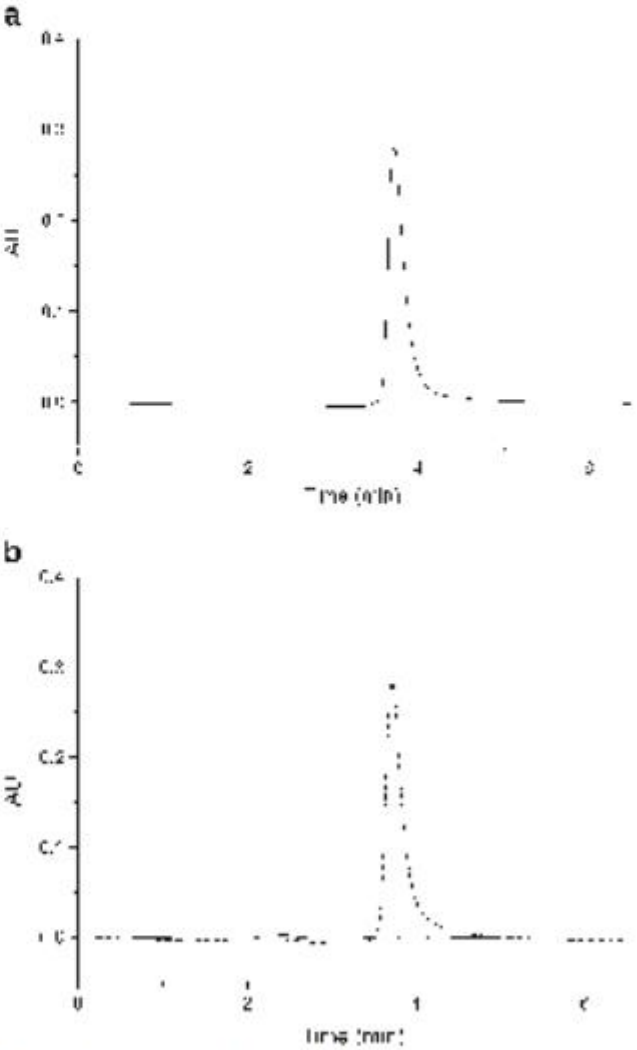


Fig. 2. Chromatographic detection of free and nanoencapsulated glutamine. Glutamine in a solvent mixture of H_2O:MeOH with a retention time of 3.8 min (**a**). Comparison between glutamine-loaded liposomes (*broken line*) and unloaded liposomes (*solid line*) (**b**)

co-workers (33) described a HPLC method using 214 nm as an ideal wavelength to quantify glutamine and *N*-acetylglutamine in an aqueous solution and liquid nutritional products. Another method was the one recently described by Chorilli *et al.* (34). They published a different method to analyze amino acids using ion exchange chromatography followed by post-column derivatization. Using this method, they were able to detect glutamine outside the usual wavelength, at 530 nm and at a retention time of 10 min. The extraction and quantification methods were developed, as previously described, once the methods described in the literature were not able to quantify glutamine in the liposomal form.

Thus, the extraction method was efficient and the HPLC developed method was used to determine the glutamine encapsulated into liposomes consisting of soya phosphatidylcholine, cholesterol, and stearylamine.

Neutrophil Viability Assay

Several studies have been performed to indicate the effectiveness of glutamine in increasing the immunity of rats immunosuppressed by intense and prolonged exercise. In studies developed by Lagranha *et al.* (26,35), they demonstrated that a single bout of exercise induced the apoptosis of rat neutrophils and oral glutamine supplementation (1 g/kg) prevented this effect, by promoting an increase in neutrophil phagocytosis and oxidative capacity from both exercised and rested rats.

Despite the efficacy related to neutrophil activation, glutamine at high concentrations can promote nephrotoxicity, particularly in diabetic patients (18,19). Thus, the use of glutamine encapsulated into nanostructured delivery systems, such as conventional liposomes, could decrease the dose as well as the toxicity, once conventional liposomes are able to target the encapsulated compound directly to neutrophils. This study describes for the first time the analysis of neutrophil viability in rats after the administration of glutamine-loaded conventional liposomes. Our results showed that all rat groups investigated presented a high percentage of intact plasma membrane as observed in Fig. 3, once the animals were considered healthy, which means they did not present a metabolic disorder, such as diabetes, and were not subjected to intense exercise or surgical procedures.

Regarding unloaded liposomes, a high rate of neutrophil viability (87±2.7%) was observed compared to the control group. Because liposomes are formed by phospholipid bilayers, it has been reported that these vesicles are able to mimic the shape and size of pathogenic microorganisms (36) and consequently promote an increase in the immune response of animals (37). Thus, unloaded liposomes may be recognized as a foreign body and stimulate the immune response, explaining the increased value of neutrophils in the treated animals.

Peritoneal administration of glutamine-loaded conventional liposomes (Gln-L) and unloaded liposomes presented a viability of 94±0.2 and 87±2.7%, respectively. Those data demonstrate that Gln-L promoted an increase in neutrophil viability of 21 and 8.2% compared to the control and unloaded-liposomes groups (Fig. 3).

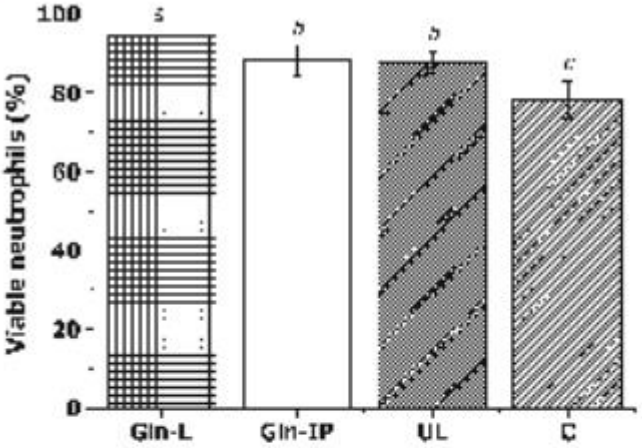


Fig. 3. Effect of glutamine on neutrophil membrane integrity. The percentage of viable neutrophils in response to different treatments *via* the intraperitoneal route. These values are presented as the mean ±SD of three experiments (n=3). *Average data with different letters* are significantly different using the Tukey test (p<0.05). *Gln-L* glutamine-loaded liposomes, *Gln* glutamine in solution, *UL* unloaded liposomes, *C* control group

Interestingly, when comparing the Gln-L with the Gln group, an increase in cell viability (7.3%) was observed, demonstrating a positive effect when glutamine was encapsulated into liposomes. This remarkable finding was related to nonviable neutrophils, once the Gln-L group presented the lowest percentage (5±0.5%), thereby confirming that this system did not cause cellular damage.

A comparison between free Gln administered using two different routes, oral and intraperitoneal, showed no statistical differences in the percentage of viable cells (87±6.4 and 88 ±3.8%, respectively) and nonviable cells (9±1.2 and 5±1.4%, respectively) (Fig. 4). This finding indicates that a reduced dosage of 17-fold *via* the intraperitoneal route achieved the same effect as a higher dosage *via* oral supplementation (10,14,35).

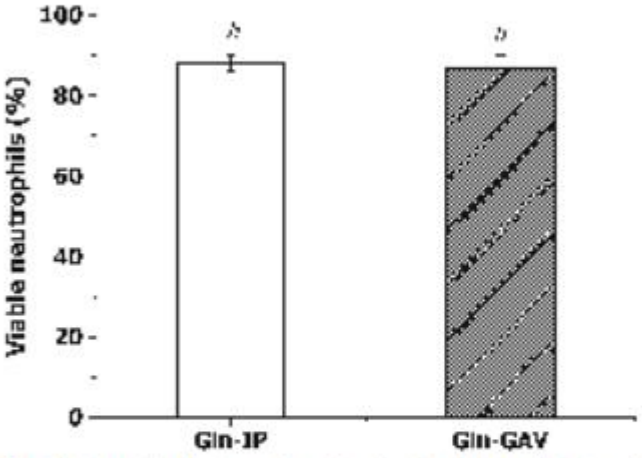


Fig. 4. Comparison between free glutamine in solution administered *via* the oral (*Gln-GAV*) and intraperitoneal (*Gln-IP*) routes. The values are presented as the mean±SD of three experiments (n=3). *Average data with different letters* are significantly different using the Tukey test (p<0.05)

CONCLUSIONS

Glutamine-loaded liposomes were obtained and presented desirable physicochemical characteristics, such as pH, mean size, polydispersity index, zeta potential, and drug encapsulation efficiency. The experimental factorial designs performed indicated the ideal concentration of the formulation constituents and ideal formulation.

This study also described for the first time a sufficient HPLC method for the quantification of glutamine encapsulated into liposomes. Glutamine-loaded liposomes administered *via* the i.p. route were able to increase neutrophil viability with very low nonviable cells in healthy animals. On the basis of these findings, this study encourages the use of formulations developed in further studies using immunosuppressed animals, which are aimed to increase immunological function.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Brazilian National Council for Research (CNPq) for financial support (#484574/2011-6) and the Foundation for Science and Technology of Pernambuco (FACEPE). Thanks are also due to the Keizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA).

REFERENCES

1. Newsholme P, Lima MMR, Procopio J, Pithon-Curi TC, Doi SQ, Bazotte RB, *et al.* Glutamine and glutamate as vital metabolites. Braz J Med Biol Res. 2003;36:153–63.
2. Labow BI, Souba WW. Glutamine. World J Surg. 2000;24:1503–13. doi:10.1007/s002680010269.
3. Albino Junior W, Alberto C, Taliari K, Cancelliero KM. Suplementação com glutamina melhora as reservas de glicogênio de músculos de ratos tratados com dexametasona. Rev Bras Educ Fis Esp. 2004;18:283–91.
4. Cruzat VF, Petry ER, Tirapegui J. Glutamina : aspectos bioquímicos, metabólicos, moleculares e suplementação. Rev Bras Med Esporte. 2009;15:392–7.
5. Harris RC, Hoffman JR, Allsopp A, Routledge NBH. L-glutamine absorption is enhanced after ingestion of L-alanylglutamine compared with the free amino acid or wheat protein. Nutr Res. 2012;32:272–7. doi:10.1016/j.nutres.2012.02.003.
6. Gleeson M. Dosing and efficacy of glutamine supplementation in human exercise and sport training. J Nutr. 2008;138:2045S–9S.
7. Ardawi MSM, Newsholme EA. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. Biochem J. 1983;212:835–42.
8. Curi TCP, Melo MP, Azevedo RB, Zorn TMT, Curi R. Glutamine utilization by rat neutrophils: presence of phosphate-dependent glutaminase. Am J Physiol Cell Physiol. 1997;273:1124–9.
9. Pithon-Curi TC, Schumacher RI, Freitas JJS, Lagranha C, Newsholme P, Palanch AC, *et al.* Glutamine delays spontaneous apoptosis in neutrophils. Am J Physiol Cell Physiol. 2003;284:C1355–61. doi:10.1152/ajpcell.00224.2002.
10. Lagranha CJ, Senna SM, Lima TM, Silva EPP, Doi SQ, Curi R, *et al.* Beneficial effect of glutamine on exercise-induced apoptosis of rat neutrophils. Med Sci Sports Exerc. 2004;36:210–7. doi:10.1249/01.MSS.0000113490.98089.B1.
11. Curi R, Lagranha CJ, Doi SQ, Sellitti DF, Procopio J, Pithon-Curi TC, *et al.* Molecular mechanisms of glutamine action. J Cell Physiol. 2005;204:392–401. doi:10.1002/jcp.20339.
12. Lacey JM, Wilmore DW. Is glutamine a conditionally essential amino acid? Nutr Rev. 1990;48:297–309.
13. Furst P. New developments in glutamine delivery. J Nutr. 2001;131:2562–8.
14. Lagranha CJ, Levada-Pires AC, Sellitti DF, Procopio J, Curi R, Pithon-Curi TC. The effect of glutamine supplementation and physical exercise on neutrophil function. Amino Acids. 2008;34:337–46. doi:10.1007/s00726-007-0560-x.
15. Fan Y, Yu J, Kang W, Zhang Q. Effects of glutamine supplementation on patients undergoing abdominal surgery. Chin Med Sci J. 2009;24:55–9. doi:10.1016/S1001-9294(09)60060-2.
16. Wilmore DW. The effect of glutamine supplementation in patients following elective surgery and accidental injury. J Nutr. 2001;131:2543–9.
17. Flöring UB, Rooyackers OE, Wernerman J, Hammarqvist F. Glutamine attenuates post-traumatic glutathione depletion in human muscle. Clin Sci (Lond). 2003;104:275–82. doi:10.1042/CS20020198.
18. Alba-Loureiro TC, Ribeiro RF, Zorn TMT, Lagranha CJ. Effects of glutamine supplementation on kidney of diabetic rat. Amino Acids. 2010;38:1021–30. doi:10.1007/s00726-009-0310-3.
19. Galera SC, Fechine FV, Teixeira MJ, Coelho ZCB, Vasconcelos RC, Vasconcelos PRL. The safety of oral use of L-glutamine in middle-aged and elderly individuals. Nutrition. 2010;26:375–81. doi:10.1016/j.nut.2009.05.013.
20. D'Souza R, Powell-Tuck J. Glutamine supplements in the critically ill. J R Soc Med. 2004;97:425–7. doi:10.1258/jrsm.97.9.425.
21. O'Neil MJ. The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 6th ed. New Jersey: Merck; 2006.
22. Brandl M, Gregoriadis G. Entrapment of haemoglobin into liposomes by the behaviour. Biochim Biophys Acta. 1994;1196:65–75.
23. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. Nat Rev Drug Discov. 2005;4:145–60. doi:10.1038/nrd1632.
24. Lira MCB, Ferraz MS, Silva DGVC, Cortes ME, Teixeira KI, Caetano NP, *et al.* Inclusion complex of usnic acid with β-cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes. J Incl Phenom Macrocycl Chem. 2009;64:215–24. doi:10.1007/s10847-009-9554-5.
25. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol. 1959;37:911–7.
26. Lagranha CJ, Alba-Loureiro TC, Martins EF, Pithon-Curi TC, Curi R. Neutrophil fatty acid composition: effect of a single session of exercise and glutamine supplementation. Amino Acids. 2008;35:243–5. doi:10.1007/s00726-007-0561-9.
27. Cadena PG, Pereira MA, Cordeiro RBS, Cavalcanti IMF, Barros Neto B, Pimentel MDCCB, *et al.* Nanoencapsulation of quercetin and resveratrol into elastic liposomes. Biochim Biophys Acta. 2013;1828:309–16. doi:10.1016/j.bbamem.2012.10.022.
28. Caddeo C, Teskac K, Sinico C, Kristl J. Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells. Int J Pharm. 2008;363:183–91. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.07.024.
29. Wieber A, Selzer T, Kreuter J. Physico-chemical characterisation of cationic DOTAP liposomes as drug delivery system for a hydrophilic decapeptide before and after freeze-drying. Eur J Pharm Biopharm. 2012;80:358–67. doi:10.1016/j.ejpb.2011.11.008.
30. Mendonça EAM, Lira MCB, Rabello MM, Cavalcanti IMF, Galdino SL, Pitta IR, *et al.* Enhanced antiproliferative activity of the new anticancer candidate LPSF/ACD4 in cyclodextrin inclusion complexes encapsulated into liposomes. AAPS PharmSciTech. 2012;13:1355–66. doi:10.1208/s12249-012-9853-9.
31. Hamilton JG, Comai K. Separation of neutral lipids and free fatty acids by high-performance liquid chromatography using low wavelength ultraviolet detection. J Lipid Res. 1984;25:1142–8.
32. Koller M, Eckert H. Derivatization of peptides for their determination by chromatographic methods. Anal Chim Acta. 1997;352:31–59.
33. Snowden MK, Baxter JH, Bergana MM, Reyzer I, Pound V. Stability of n-acetylglutamine and glutamine in aqueous solution and in a liquid nutritional product by an improved HPLC method. J Food Sci. 2002;67:384–9.
34. Chorilli M, Salgado HRN, Santo FDS, Silva LM. Validation of a HPLC method for determination of glutamine in food additives using post-column derivatization. AJAC. 2012;3:113–7. doi:10.4236/ajac.2012.32016.
35. Lagranha CJ, Lima TM, Senna SM, Doi SQ, Curi R, Pithon-Curi TC. The effect of glutamine supplementation on the function of

neutrophils from exercised rats. Cell Biochem Funct. 2005;23:101–7. doi:10.1002/cbf.1192.
36. Szebeni J, Muggia F, Gabizon A, Barenholz Y. Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: prediction and prevention. Adv Drug Deliv Rev. 2011;63:1020–30. doi:10.1016/j.addr.2011.06.017.
37. Newsholme P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? J Nutr. 2001;131:2515–22.