



Universidade de Brasília
Universidade de Brasília
Pós-Graduação em Patologia Molecular

Avaliação *in vitro* da atividade de NLS-DTX em câncer de mama triplo negativo

Aluna: Karen Letycia Rodrigues de Paiva

**Brasília, DF
2021**

Karen Letycia Rodrigues de Paiva

Avaliação *in vitro* da atividade de NLS-DTX em câncer de mama triplo negativo

Orientadora: Sônia Nair Bão

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília.

**Brasília, DF
2021**

"A imaginação muitas vezes nos leva a mundos que nunca existiram. Mas sem ela não vamos a lugar nenhum."

(Carl Sagan)

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais que sempre me deram apoio em todas as minhas escolhas e em toda a minha vida.

Aos meus amigos que me deram força ao longo da minha jornada.

A minha orientadora, professora Sônia por ter me acolhido e por ter dado a oportunidade de me aperfeiçoar como aluna e ser humano, por todas as lições e conhecimentos repassados.

Aos professores do departamento de Biologia Celular. O professor Tatsuya Nagata que sempre esteve disposto responder todos os meus questionamentos. Os professores Bergmann Moraes Ribeiro e Ricardo Henrique Krüger por disponibilizarem os equipamentos usados no desenvolvimento do projeto.

E a todos os alunos do Laboratório de Microscopia Eletrônica: Giovanna (Amada), Marina Mesquita (Jovem), Ana Brígida, Ana Luisa, Marina Radicchi, Ingrid, Melissa, Karine, Lais, Guilherme. A Bruna e a Márcia que me ajudaram muito a desenvolver o projeto. Quero levar a amizade de vocês para toda a vida.

À Universidade de Brasília; as agências de fomento CNPq, pela bolsa de mestrado, a CAPES, FINEP, FAPDF, e ao Programa de Pós graduação em Patologia Molecular pelo financiamento.

Resumo

O câncer é uma das doenças que mais matam no mundo, desenvolvimento e aprimoramento dos tratamentos utilizados nas terapias contra o câncer são extremamente relevantes para uma melhor qualidade de vida dos pacientes. Tendo em vista os atuais problemas na administração de fármacos como a baixa solubilidade e os efeitos adversos, foi analisada a atividade de uma nanopartícula lipídica sólida contendo docetaxel (NLS-DTX), um fármaco já usado nas terapias convencionais, em uma linhagem (MDA-MB-231) de um dos tipos de câncer de mama mais agressivos e que possuem os piores prognósticos, o câncer de mama triplo negativo. Os testes de viabilidade indicaram que a NLS-DTX tem uma maior dependência quanto a dose do tratamento quando comparada ao fármaco livre o que indica uma liberação mais controlada do fármaco. As análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET), confocal e microscopia de luz indicaram que após o tratamento as células entram em catástrofe mitótica, característica de fármacos antimitóticos que levam as células geralmente a morte ou a senescência. As células tratadas tanto com DTX como com NLS-DTX apresentaram significativa inibição na mobilidade e proliferação, características que são muito relevantes no desenvolvimento e progressão do tumor. A NLS-DTX aumentou significativamente a apoptose em células tumorais e também apresentou uma maior fragmentação nuclear (sub-G1) quando comparadas ao controle o que demonstrou seu grande potencial como nanocarreador ao manter e aprimorar a ação do fármaco na linhagem MDA-MB-231.

Abstract

Cancer is one of the most killing diseases in the world, development and improvement of treatments used in cancer therapies are extremely relevant for a better quality of life for patients. In view of the current problems in drug administration such as low solubility and adverse effects, the activity of a solid lipid nanoparticle containing docetaxel (NLS-DTX), a drug already used in conventional therapies, in a cell line (MDA- MB-231) of one of the most aggressive types of breast cancer with the worst prognosis, triple negative breast cancer. Viability tests indicated that NLS-DTX has a greater dependence on the treatment dose when compared to the free drug, which indicates a more controlled release of the drug. Transmission electron microscopy (TEM), confocal and light microscopy analyzes indicated that after treatment the cells enter into a mitotic catastrophe, characteristic of antimitotic drugs that usually lead to death or senescence. Cells treated with both DTX and NLS-DTX showed significant inhibition of mobility and proliferation, characteristics that are very relevant in tumor development and progression. NLS-DTX significantly increased apoptosis in tumor cells and also showed greater nuclear fragmentation (sub-G1) when compared to the control, which demonstrated its great potential as a nanocarrier by maintaining and improving the drug's action in MDA-MB-231 cell line.

Índice de figuras

Figura 1: Características fundamentais para o desenvolvimento do câncer.....	12
Figura 2: Número de mortes causados por câncer em 2020.....	13
Figura 3: Principais tipos de novos casos de câncer e taxa de morte estimados para 2020	13
Figura 4: Análise da viabilidade celular da MDA-MB-231 por MTT tratadas com DTX, NLS-DTX, NLS-BRANCA e Etanol, após 24h, 48h e 72h.....	28
Figura 5: Análise da viabilidade celular dos fibroblastos por MTT tratadas com DTX, NLS-DTX, NLS-BRANCA e Etanol, após 24h, 48h e 72h.....	30
Figura 6: Avaliação morfológica da linhagem MDA-MB-231 após 24h, 48h e 72h de tratamento com NLS-DTX e DTX por microscopia de luz.....	32
Figura 7: Avaliação morfológica da linhagem MDA-MB-231 após 72h de tratamento com NLS-DTX e DTX por microscopia de luz das células coradas com hematoxilina e eosina.....	33
Figura 8: Microscopia eletrônica de varredura das células MDA-MB-231 após 72h de tratamento com NLS-DTX e seu controle.....	34
Figura 9: Microscopia eletrônica de transmissão das células MDA-MB-231 após 3h e 6h de tratamento com NLS-DTX.	35
Figura 10: Microscopia eletrônica de transmissão da MDA-MB-231 após 72h de tratamento com NLS-DTX.	36
Figura 11: Imunomarcagem de beta-tubulina em MDA-MB-231 após 72 horas de tratamento.....	37
Figura 12: Análise de ciclo celular da MDA-MB-231 após tratamentos.....	38
Figura 13: Análise de wound healing de MDA-MB-231.....	39
Figura 14: Análise de tipo de morte celular.....	40
Figura 15: Análise de proliferação da MDA-MB-231 tratada com NLS-DTX, DTX e colchicina por CFSE.....	41

Índice de tabelas

Tabela 1: Subtipos de câncer de mama.....	14
Tabela 2: Reagentes usados na execução do projeto.....	21

Índice de Abreviaturas

BL1 – Basal Like 1

BL2 – Basal Like 2

CFSE - Carboxyfluorescein succinimidyl ester

CO₂ - Dióxido de Carbono

DMEM - Dubelcco's Modified Eagle Medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – Deoxyribonucleic acid

DAPI - 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride

DTX – Docetaxel

ER – Estrogen Receptore

HER2 – Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

L-15 - Leibowitz medium

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MDA-MB-231- Linhagem celular de adenocarcinoma mamário

NLS – Nanopartículas lipídicas sólidas

NLS-Branca – Nanopartícula lipídica sólida sem o fármaco

NLS-DTX – Nanopartículas lipídicas sólidas com docetaxel

PR – Progesterone Receptor

SFB -Soro Fetal Bovino

TNBC – Triple Negative Breast Cancer

Sumário

1. Introdução.....	11
1.1 Câncer.....	11
1.2 Câncer de mama.....	13
1.3 Câncer de mama triplo negativo.....	14
1.4 Tratamentos.....	15
1.5 Docetaxel.....	16
1.6 Nanopartículas.....	17
1.7 Nanopartículas lipídicas sólidas.....	18
2. Justificativa	19
3. Objetivos gerais.....	20
4. Objetivos específicos.....	20
5. Materiais e métodos.....	21
5.1 Reagentes.....	21
5.2 Nanopartículas lipídicas sólidas.....	21
5.3 Manutenção das linhagens celulares.....	21
5.4 Ensaio de viabilidade celular.....	22
5.5 Alterações morfológicas por microscopia de luz.....	22
5.6 Alterações morfológicas e internalização por MET.....	22
5.7 Análise de alterações morfológicas por MEV.....	23
5.9 Ciclo celular.....	24
5.10 Proliferação celular.....	24
5.11 Wound healing.....	25
5.12 Morte celular.....	25
5.13 Análise estatística.....	26
6. Resultados.....	27
7. Discussão.....	42
8. Conclusão.....	45
9. Perspectivas.....	46
10. Bibliografia.....	47

1. Introdução

1.1 Câncer

Câncer é um termo genérico para um conjunto de mais de 277 doenças relacionadas, que têm em comum o crescimento desordenado das células que invadem tecidos e órgãos. O câncer surge a partir de uma mutação genética, ou seja, de uma alteração no DNA da célula, que passa a receber instruções erradas para as suas atividades, especialmente as relacionadas a crescimento e divisão. Essas células alteradas tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, e seu crescimento desordenado determina a formação de tumores que podem crescer além de seus limites habituais, e assim adquirem a capacidade de invadir partes adjacentes do corpo e se espalhar para outras estruturas do organismo em um processo conhecido como metástase, sendo esta a principal causa de mortes por câncer¹⁻⁴.

Apesar do recente avanço em estudos com alterações não mutacionais (epigenética) o câncer é reconhecido por ser uma doença de caráter genético. Apenas 10-30% dos fatores de risco para que essas mutações ocorram são intrínsecos, a maioria das alterações é decorrentes de fatores externos. Dentre os fatores externos que mais contribuem para as mutações estão: idade, consumo de álcool, substâncias carcinogênicas, inflamação crônica, dieta, hormônios, imunossupressão, agentes infecciosos, obesidade, radiação, luz solar, e consumo de tabaco. Após suas alterações é importante reconhecer quais são os padrões necessários para sua progressão. As principais características adquiridas pela célula tumoral ao longo do seu desenvolvimento foram descritas por Hanahan and Weinberg⁵ e podem ser conferidas na Figura 1^{3,6,7}.



Figura 1: Características fundamentais para o desenvolvimento do câncer. A figura apresenta os principais fatores relacionados ao desenvolvimento do câncer e eles são: indução da angiogênese, ativação da invasão e metástase, inflamação promovida pelo tumor, capacidade de imortalidade replicativa, evitar a destruição imune, evasão dos supressores de tumor, sinalização proliferativa sustentada, desregulação do metabolismo energético, resistência a morte celular e a instabilidade genômica e mutação. (Adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011)

Há uma estimativa de que 19.3 milhões de novos casos de câncer ocorreram em 2020. Apesar dos avanços nos tratamentos, atualmente o câncer ainda é uma das principais causas de morte no mundo, e foi responsável por cerca de 10 milhões de mortes no mesmo ano (Figura 2)⁸.

Números de mortes em 2020, ambos sexos, todas as idades

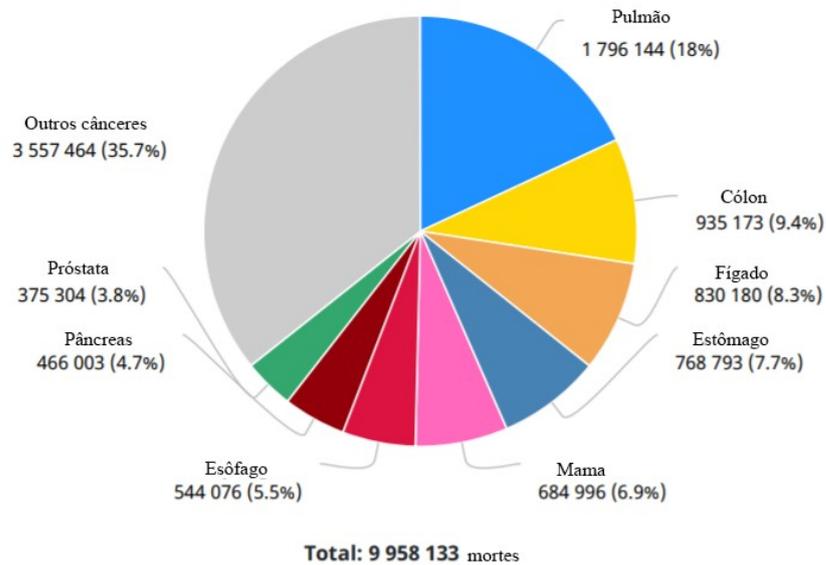


Figura 2: Número de mortes causados por câncer em 2020. Números totais óbitos por câncer em 2020 em ambos os sexos e todas as idades. Divididos pelas quantidades totais de cada tipo de câncer (Adaptado de Globocan, 2020).

No Brasil está estimado para o triênio 2020-2022 que a incidência anual será de 625 mil novos casos de câncer. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é o câncer mais frequente entre as mulheres sendo que no mesmo triênio são previstos 66.280 novos casos a cada ano (Figura 3)⁹.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 3: Principais tipos de novos casos de câncer e taxa de morte estimados para 2020 (INCA, 2020)

1.2 Câncer de mama

O câncer de mama é uma das doenças mais frequentes entre as mulheres representando cerca de 29.7% de todos os tipos de câncer no Brasil, correspondendo a uma incidência de 43.7 a cada

100 mil mulheres. Em 2017, foram 16.724 mortes em decorrência do câncer de mama, correspondendo a uma taxa de mortalidade de 16.1 a cada 100 mil mulheres^{9,10}.

O câncer de mama possui uma grande heterogeneidade a nível molecular e é frequentemente dividido em subgrupos. Uma dessas classificações os divide em três subtipos, sendo estes: os que expressam receptores de hormônio [receptor de estrógeno (ER⁺) ou receptor de progesterona (PR⁺)], os que expressam receptor epidermal humano 2 (HER2⁺) e o câncer de mama triplo negativo (TNBC) (ER⁻, PR⁻, HER2⁻). A classificação dos subtipos é extremamente significativa para o diagnóstico, prognóstico e qual terapia cada subtipo é submetido, bem como as alterações na sua frequência que podem ser observados na Tabela 1¹⁰⁻¹³.

Baseado na presença ou ausência desses três marcadores primários o câncer de mama também pode ser classificado em seis subtipos intrínsecos que incluem luminal A, luminal B, HER2 enriquecido, similar a basal, similar ao normal e o com baixa expressão de claudina¹⁴.

Tabela 1: Subtipos de câncer de mama

Subtipos	Receptores	Frequência
Hormônio positivo	ER ⁺ ou PR ⁺	60%
HER2 positivo	HER2 ⁺	20%
Câncer de mama triplo negativo	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	10-20%

1.3 Câncer de mama triplo negativo

O câncer de mama triplo negativo tem como uma de suas principais características a ausência de receptores de hormônio e de HER2 em sua membrana. Apesar de ser alocado em um único grupo o câncer de mama triplo negativo (TNBC) é muito diverso, sendo pontuado como uma das razões para as diferentes respostas tanto para os tratamentos tradicionais quanto para as novas terapias, com relevante discrepância entre os tempos de sobrevida¹⁵.

Para a compreensão de sua discrepância molecular o TNBC foi subclassificado por Lehmann¹³ em 7 distintos subtipos moleculares: imunomodulador, mesenquimal, célula-tronco mesenquimal, luminal com receptor de andrógeno, instável, e dois subtipos similares a basal (BL1 e BL2). Após análise do perfil de expressão genética, das células tumorais e seus componentes auxiliares, ocorreu o refinamento da classificação anterior a apenas quatro subtipos dos seis propostos anteriormente foram mantidos: os similares a basal (BL1 e BL2), mesenquimal e luminal com receptor de andrógeno^{13,16}.

Como anteriormente apresentado o TNBC representa aproximadamente 15-20% de todos os casos de câncer de mama, geralmente ocorre em mulheres jovens com menos de 40 anos antes da menopausa. Comparado com outros subtipos de câncer de mama o TNBC possui uma sobrevida menor e uma taxa de mortalidade muito elevada, chegando a cerca de 40% nos primeiros 5 anos. O tempo médio de reincidência de TNBC ocorre entre 19-40 meses, enquanto em pacientes com outros subtipos esse tempo varia entre 35-67 meses. O TNBC é muito invasivo e cerca de 46% dos pacientes terão metástase. A metástase nesses casos geralmente envolve o cérebro e órgãos viscerais e tendem a ter uma recaída precoce se espalhando para os pulmões, fígado e sistema nervoso central. A média de sobrevivência após a metástase é de apenas 13,3 meses e a recorrência após a cirurgia é elevada, com taxas que chegam a 25%^{15,17}.

1.4 Tratamentos

No tratamento de tumores sólidos a quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia, individualmente ou combinados, são os tratamentos tradicionais contra tumores agressivos. A cirurgia e a radioterapia são efetivos no tratamento de tumores locais e não metastáticos, não sendo eficientes nos casos em que o câncer já se espalhou para órgãos e tecidos adjacentes. O uso de fármacos com administração sistêmica, como a quimioterapia e a hormonioterapia, são as opções atuais para o tratamento do câncer metastático, pois o fármaco têm a capacidade de atingir todos os órgãos através da corrente sanguínea^{18,19}.

Para o câncer de mama não metastático, os principais objetivos da terapia são erradicar o tumor e prevenir a metástase. A terapia não sistêmica geralmente consiste em ressecção cirúrgica, com tratamento com radiação pós-operatória. Já a terapia sistêmica pode ser pré-operatória (neoadjuvante), pós-operatória (adjuvante) ou ambas. Para os subtipos de câncer que tem receptores de hormônio positivos há o uso de terapia endócrina, as pacientes com expressão positiva para os receptores HER2 são tratadas com trastuzumab (anticorpo monoclonal que se liga ao receptor HER2 e inibe sua ação) e lapatinib (inibidor de tirosina quinase) em conjunto com quimioterapia, já o TNBC é geralmente tratado apenas com quimioterapia. Para o câncer de mama metastático, os objetivos terapêuticos são prolongar a vida e atenuar os sintomas. Atualmente, o câncer de mama metastático permanece incurável em praticamente todos os pacientes afetados. As mesmas categorias básicas de terapia sistêmica são usadas no câncer de mama metastático e nas abordagens neoadjuvantes / adjuvantes^{11,20}.

O câncer de mama triplo negativo possui opções limitadas de tratamento pois o mesmo não possui expressão positiva para os principais alvos terapêuticos. Com os avanços no desenvolvimento de terapias, os inibidores de PARP (olaparib e talazoparib) são fármacos usados no

tratamento contra o câncer de mama triplo negativo que possuem mutações no gene BRCA. Mas apesar de possuir uma terapia com alvo específico nem todas os casos se incluem nos critérios para o uso do medicamento. O atual tratamento para os casos em que os inibidores de PARP não são usados segue sendo a quimioterapia.^{15,21}

1.5 Docetaxel

Docetaxel (DTX) é um composto semissintético da família dos taxanos, componente extraído da árvore *Taxus baccata*, também conhecida como teixo. O principal mecanismo antitumoral do DTX é a de conter a despolimerização e a desmontagem das ligações dos microtúbulos e assim mantendo sua estabilização, o que a princípio induz a parada do ciclo celular do tumor durante a mitose²².

Os microtúbulos são estruturas componentes do citoesqueleto, são muito dinâmicas com papéis essenciais na divisão celular e outras funções celulares, como movimento celular, transporte intracelular e diferenciação. O principal componente estrutural dos microtúbulos é a proteína tubulina. E são os alvos na terapia do câncer, os antimetabólitos têm como alvo as tubulinas e outros componentes dos microtúbulos e estão entre os agentes quimioterápicos mais importantes²³.

As funções biológicas dos microtúbulos em todas as células são reguladas por sua dinâmica de polimerização. A polimerização dos microtúbulos ocorre por um mecanismo de nucleação-alongamento pela adição reversível e não covalente de dímeros de tubulina α e β em ambas as extremidades dos microtúbulos. O DTX altera a reversibilidade do processo ao se ligar na β tubulina estabilizando a proteína e impedindo sua despolimerização, e assim alterando o seu rearranjo celular^{24,25}.

Os taxanos são usados no tratamento de diversos cânceres. O DTX foi utilizado inicialmente para o tratamento do câncer de mama e posteriormente as indicações foram expandidas para o tratamento de câncer de pulmão, próstata, gástrico, de cabeça/pescoço, entre outros. DTX é um importante medicamento antitumoral na clínica e comercializado em todo o mundo com o nome de Taxotere e sua venda anual em 2010 foi de 2,122 bilhões de euros. E isso se deve a uma combinação de características, um mecanismo de ação único associado à capacidade de modular vários processos celulares relacionados ao crescimento e metabolismo tumoral (apoptose, angiogênese, estresse oxidativo) e eficácia sobre tumores sólidos e disseminados. Os taxanos são principalmente conhecidos como antimetabólitos; no entanto, atuam de forma complexa, dificultando diferentes processos e vias fisiológicas oncogênicas na célula. No tratamento do câncer de mama triplo negativo os taxanos são usados em diferentes regimes de combinação com antraciclinas, ciclofosfamida, cisplatina e fluorouracila^{15,22,26}.

Além disso o DTX exibiu citotoxicidade mais potente contra diferentes tumores do que o paclitaxel em estudos *in vitro* e *in vivo*. O DTX é um pouco mais ativo como estabilizador da polimerização da tubulina, é mais potente na inibição da replicação celular e é cerca de cinco vezes mais potente em células resistentes quando comparado ao paclitaxel, e também mostrou melhores efeitos terapêuticos do que o paclitaxel em alguns ensaios clínicos²².

A baixa solubilidade e a hidrofobicidade do DTX implica em dificuldades na administração e diluição do fármaco. Além disso, a quimioterapia convencional, como o DTX, entrega o fármaco indiscriminadamente nas regiões de tecido tumoral e sadio provocando efeitos adversos ao organismo. Dentre esses efeitos adversos estão anemia, náuseas, vômitos, diarreia, estomatite, distúrbios do paladar, toxicidades gastrointestinais, neutropenia, reações de hipersensibilidade, retenção de líquidos, toxicidades ungueais, neuropatia e astenia²⁷.

1.6 Nanopartículas

A nanotecnologia é usada na nanomedicina com o objetivo de trazer melhorias aos cuidados com a saúde. E isso envolve o uso das propriedades dos materiais em nanoescala, que podem ser extraordinariamente diferentes dos mesmos materiais em larga escala. Eles podem diferir de seus componentes da escala macroscópica, além do tamanho, em reatividade química, mobilidade, absorção de energia, entre outras características^{28,29}.

As nanopartículas podem ser definidas como partículas que apresentam entre 1 e 1000 nm. As nanopartículas tendem a ser mais eficientes que as quimioterapias regulares, reduzindo os efeitos colaterais indesejados, tem uma menor necessidade de doses altas, como menos interações inespecíficas e podem atuar tanto como agentes de diagnóstico como agentes para o tratamento de tumores^{28,30}.

O aprimoramento na entrega de nanopartículas era atribuído ao efeito EPR, de permeabilidade e retenção aprimorada, devido à anormalidade no desenvolvimento dos vasos sanguíneos no tumor as nanopartículas tendem a se acumular na região. Mas ao longo dos últimos anos esse efeito vem sendo questionado, pois o efeito EPR é observado em uma pequena porcentagem da nanopartículas testadas. Com isso, outras abordagens de como as nanopartículas estariam sendo direcionadas ao tumor foram estabelecidas. Devido à heterogeneidade do tumor o efeito EPR também não seria uniforme, então é difícil afirmar que o efeito não está ocorrendo ou se apenas uma parte do tumor está suscetível ao mesmo. Além disso, foi observado o processo ativo de transporte de nanopartículas para a região tumoral a partir da transcitose, indicando assim que o direcionamento de nanopartículas não ocorre apenas por transporte passivo³¹.

1.7 Nanopartículas lipídicas sólidas

Nanopartículas baseadas em lipídios, como lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) e carreadores de lipídios nanoestruturados, têm recebido grande atenção na descoberta de medicamentos e no tratamento do câncer³².

As SLNs são consideradas um novo sistema de entrega de drogas coloidal que combina com sucesso as qualidades do lipossoma e das nanopartículas poliméricas. Os SLNs têm a capacidade de fornecer estabilidade do núcleo sólido e também biocompatibilidade de nanocarreadores de lipídios, evitando as limitações relacionadas a lipossomas e nanopartículas poliméricas, como estabilidade de longo prazo, toxicidade, esterilização e aumento de escala³³.

Essas nanopartículas também oferecem propriedades únicas, incluindo tamanho pequeno, grande área de superfície, alta carga de droga, eficácia terapêutica aprimorada da droga carregada, biocompatibilidade, estabilidade química e mecânica, facilidade de funcionalização. Ainda, elas podem transportar moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas, apresentam toxicidade muito baixa ou nenhuma toxicidade, aumentam o tempo de ação do fármaco por meio de meia-vida prolongada. Em particular, o núcleo de lipídeo fisiológico dentro de SLNs pode proteger as drogas encapsuladas da degradação química e aumentar sua estabilidade física. Além disso, foi relatado que os SLNs modulam a cinética de liberação, melhoram o tempo de circulação sanguínea e aumentam a eficácia terapêutica geral dos medicamentos anticâncer^{32,34,35}.

2. Justificativa

A cada ano as terapias contra o câncer vêm avançando cada vez mais. Infelizmente elas ainda não atingiram um patamar satisfatório no combate ao câncer que ainda é um grave problema de saúde pública em todo o mundo por ter uma alta incidência, com altas taxas de mortalidade e os medicamentos utilizados no tratamento dessas doenças provocam uma série de reações adversas.

O DTX é um componente dessas terapias e ele vem sendo muito utilizado por sua eficácia, principalmente em casos de câncer de mama, mas assim como outros fármacos o paciente enfrenta efeitos adversos e pode adquirir resistência ao tratamento.

Dessa forma, o tratamento convencional permanece insatisfatório. Mas o sistema de entrega de drogas por meio de nanopartículas aparece como alternativa por proporcionar o direcionamento destes fármacos para tecidos tumorais. Dentre eles as nanopartículas lipídicas sólidas se destacam por terem uma matriz lipídica que possui afinidade com os fármacos lipofílicos como o DTX. Além de melhorar sua solubilidade e reduzir a quantidade de fármaco a ser utilizado possibilitando uma redução dos custos e um melhor direcionamento para a região do tumor atenuando possíveis reações adversas.

3. Objetivos gerais

Avaliar os efeitos do tratamento com a nanopartículas lipídicas sólidas contendo docetaxel na linhagem MDA-MB-231.

4. Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade celular da célula MDA-MB-231;
- Avaliar a morte e o ciclo celular das células MDA-MB-231 tratadas com NLS-DTX;
- Estudar a internalização em células MDA-MB-231 e suas alterações morfológicas e ultraestruturais após tratamento com a NLS-DTX;
- Avaliar a alteração na estrutura dos microtúbulos (β -tubulina) após o tratamento nas células MDA-MB-231;
- Avaliar a capacidade de proliferação e migração das células MDA-MB-231 após o tratamento com NLS-DTX.

5. Materiais e métodos

5.1 Reagentes

Os reagentes utilizados nos experimentos realizados seguem listados abaixo.

Tabela 2: Reagentes usados na execução do projeto.

Reagentes	Fabricante
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM); Soro Fetal Bovino (SFB)	GIBCO, EUA
Leibovitz (L15); Streptomina; Penicilina DMSO; Docetaxel Triidratado; Hematoxilina	Sigma-Aldrich, EUA
Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT); Iodeto de Propídeo; Cell Proliferation Kit (CFSE); Anexina-V cj FITC; Alexa-488	Invitrogen, EUA
Etanol	Neon, Brasil
Paraformaldeído; Acetona	Dinâmica, Brasil
Tampão Fosfato Salino (PBS)	Laborclin, Brasil
Antifade, glutaraldeído, tetróxido de ósmio, tampão cacodilato de sódio, resina Spurr	Electron Microscopy Science, EUA

5.2 Nanopartículas lipídicas sólidas

As nanopartículas utilizadas durante o projeto foram preparadas de acordo com o processo descrito por Rocha, 2020. Nanopartículas lipídicas sólidas foram preparadas pelo método de alta energia. Compritol foi selecionado como o lipídio sólido, e os surfactantes selecionados foram Span 80 e Pluronic F127³⁶. E foram analisadas em dois diferentes grupos, nanopartículas lipídicas sólidas com docetaxel (NLS-DTX) e nanopartículas lipídicas sólidas sem docetaxel (NLS-BRANCA).

5.3 Manutenção das linhagens celulares

As linhagens celulares utilizadas durante o projeto foram a MDA-MB-231 e fibroblastos. Sendo que as células MDA-MB-231 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro e os fibroblastos foram extraídos de polpa dental humana, formando o grupo controle de células de cultura primária. Os fibroblastos foram cultivados em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) e foram mantidos à 37°C com 5% de CO₂. As células MDA-MB-231 foram cultivadas em meio Leibovitz (L15) à 37° na ausência de CO₂. Ambos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) e com 1% de solução antibiótica (100 unidades/mL de penicilina e 100 mg/mL estreptomina).

5.4 Ensaio de viabilidade celular

Para o ensaio de viabilidade das células MDA-MB-213 e das células de cultura primária dos fibroblastos, as mesmas foram tratadas com as duas nanopartículas, NLS-DTX e NLS-BRANCA e também com o DTX e seu diluente o etanol. A viabilidade foi determinada pelo ensaio padrão por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) segundo as recomendações do fabricante. Um total de 3×10^3 células MDA-MB-231 ou fibroblastos, por poço, foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas overnight a 37°C. Após sua adesão, as células foram tratadas com diferentes concentrações de 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL dos diferentes tratamentos e no caso do etanol do respectivo volume usado pelas células tratadas com DTX ou foram mantidas apenas com meio de cultivo. Após o período de tratamento de 24h, 48h e 72h, os poços foram incubados por 4h, no escuro e a 37°C, com 150 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultura) e em seguida esta solução foi retirada e 200 µL de DMSO foram adicionados em cada um dos poços para a dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas no espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices – USA). O ensaio de MTT foi feito em triplicata para cada composto e concentração utilizada e três experimentos independentes foram realizados. A porcentagem de inibição foi determinada comparando a densidade celular das células tratadas com as células controle no mesmo período de incubação.

$$\% \text{ inibição} = \left(\frac{(1 - \text{densidade de células tratadas})}{\text{densidade de células controle}} \right) \times 100$$

5.5 Alterações morfológicas por microscopia de luz

Para avaliar as alterações morfológicas nas células MDA-MB-231, 5×10^4 foram semeadas em placas de 24 poços, as análises realizadas em 24h, 48h e 72h após os tratamentos nas concentrações de 1 µg/mL para cada tratamento (NLS-DTX e DTX), análises foram realizadas por microscopia de luz no Microscópio Evos (Thermo Fisher Scientific, USA) com magnificação de 10x e 20x. Para avaliar as estruturas das células, 5×10^4 foram semeadas sobre lamínulas redondas em placas de 24 poços, após 72h de tratamento com NLS-DTX e DTX na concentração de 1 µg/mL, as células foram fixadas com etanol 95% por 1 minuto, e foram coradas com hematoxilina por 1 minuto e eosina por 45 segundos, foram lavadas com etanol 95% por 1 minuto, seguidas de duas lavagens com etanol 100% por 1 minuto e duas lavagens de xilol por 2 minutos. E foram observadas por microscopia de luz no Microscópio Axiophot (Zeiss, Alemanha).

5.6 Alterações morfológicas e internalização por MET

Nos experimentos para observar a internalização da NLS-DTX 1×10^6 células foram plaqueadas em placas de 6 poços e foram tratadas com NLS-DTX na concentração de 1 µg/mL por 3 e 6 horas. Para a análise ultraestrutural ocasionada em decorrência do tratamento com a

nanopartícula, 2×10^6 células foram plaqueadas em placas de 6 poços e as após a adesão, as células receberam o tratamento com NLS-DTX na concentração de $1 \mu\text{g/mL}$ por 72h. As células foram desaderidas dos poços com tripsina, lavadas com PBS e fixadas por 1 hora em fixador Karnovisk (contendo glutaraldeído 2% , paraformaldeído 2% e sacarose 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2). Posteriormente, as células foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% e ferricianeto de potássio 0,8% por 1 hora. O material foi lavado com tampão cacodilato de sódio e contrastado durante 24 horas com acetato de uranila 0,5% a 4°C . Em seguida, as células foram lavadas, desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30%-100%) e embebidas em resina Spurr. Secções ultrafinas de 50 nm a 60 nm foram obtidas com facas de diamante em ultramicrotomo (Leica Microsystems, Áustria). As secções foram montadas em telas de cobre e examinadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol 1011 (Jeol, USA) a uma tensão de aceleração de 80 kV.

5.7 Análise de alterações morfológicas por MEV

Para visualizar as possíveis alterações na forma e superfície das células após os tratamentos por 72h na concentração do IC50, as células MDA-MB-231 foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV). 5×10^5 células foram semeadas sobre lamínulas 18x18mm colocadas no fundo da placa de 6 poços. Após adesão, as células receberam ou não o tratamento por 72h com o NLS-DTX nas concentrações de $1 \mu\text{g/mL}$. Em seguida, o meio de cultivo foi descartado, as células foram lavadas duas vezes com PSB 1X, e depois fixadas com a solução fixadora Karnovisky (contendo glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2% e sacarose 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2), overnight. No dia seguinte, o fixador foi descartado e as células foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2. As lamínulas foram incubadas no vapor de tetróxido de ósmio 2% por 30 minutos e depois foram lavadas com água destilada. Foi feita a desidratação em série crescente com acetona (50-100%) e, por último, a secagem ao ponto crítico CPD 030 (BALZERS, EUA) e metalização SCD 500 (LEICA, Germany) para serem analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura JSM 7001F (15 kV) (Jeol – Japão).

5.8 Imunomarcação beta-tubulina

Para analisar a interferência do tratamento na estrutura do alvo terapêutico do docetaxel, a beta-tubulina, foi feita a marcação das células com anticorpo anti- β -tubulina. 1×10^5 células MDA-MB-231 foram semeadas sobre lamínulas redondas em placas de 24 poços. Após a adesão, as células receberam ou não o tratamento por 72h com DTX e NLS-DTX na concentração de $1 \mu\text{g/mL}$. Após o tempo de tratamento as células foram lavadas com PBS, fixadas com formaldeído 3,7% por 30 min e permeabilizadas com triton X-100 0,1% por 20 min. A solução de bloqueio (leite

desnatado 1%, albumina sérica bovina (BSA) 2,5%, soro fetal bovino (SFB) 8% em PBS) foi adicionada e deixada por 20 min e logo após, as células foram incubadas com anticorpo primário de camundongo anti- β -tubulina, overnight a 4°C. Os poços foram lavados com PBS e o anticorpo secundário Alexa-488 anticamundongo (5 g/mL) foi adicionado por 1h a 37°C protegido da luz. Os poços foram então lavados com PBS e incubados por 5 min com DAPI (300 nM) para marcação do DNA celular. Então os poços foram lavados com PBS e as lâminas foram montadas com ProLong Gold Antifade e analisadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser TCS SP5 (Leica Microsystems, Alemanha).

5.9 Ciclo celular

Foi feita a análise do DNA com a marcação intracelular com Iodeto de Propídio (PI) em células MDA-MB-231. O PI é um marcador intercalante de DNA, portanto a marcação presente na célula é diretamente proporcional à quantidade de DNA que a célula possui. Este experimento tem como objetivo quantificar as células que estão em G1 (2N de DNA); G2/M (4N de DNA); as fases S (quantidades intermediárias de DNA) ou as células que apresentam o DNA fragmentado em um pico de sub-G1. As células MDA-MB-231 foram semeadas com 1×10^5 em placas de 12 poços. Depois de sua adesão, as células receberam o tratamento com NLS-DTX ou docetaxel na concentração de 1 μ g/mL ou apenas meio de cultivo por 72 horas. Após o período de tratamento, o sobrenadante foi coletado, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas. Então, o pellet de células de cada grupo foi lavado com PBS e fixado com etanol 70% gelado por duas horas a 4°C. As células foram lavadas com PBS e resuspendidas em solução de iodeto de propídio (10 μ g/mL PI, 100 μ g/mL de DNase free RNase e 0.1% Triton X-100) diluído em PBS, por 10 minutos a 37°C. Após o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas, resuspendidas em PBS e 20.000 eventos de cada amostra foram analisados por citometria de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson). Foram feitos três experimentos independentes. O conteúdo de DNA das células nas diferentes fases do ciclo celular foi determinado utilizando a plataforma de ciclo celular do software FlowJo.

5.10 Proliferação celular

As MDA-MB-231 tratadas e controle foram analisadas por citometria de fluxo por meio da marcação com CFSE (carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster) na concentração final de 10 μ M (diluído em PBS/BSA 0,1%) segundo as recomendações do fabricante. As células previamente marcadas foram colocadas em cultura na concentração de 1×10^5 células por poço em placas de 12 poços. Após sua adesão, as células receberam o tratamento com 1 μ g/mL (NLS-DTX e DTX) por

72h, ou receberam apenas meio de cultivo. Para o controle experimental de células que não proliferaram, um grupo foi tratado com 10 μ M de colchicina por 1h a 37°C e, em seguida, os poços foram lavados com meio suplementado e deixados em cultura pelo mesmo tempo que todos os outros grupos experimentais. Após 72h de tratamento, as células foram removidas da placa e 20.000 eventos foram analisados em citômetro de fluxo.

5.11 Wound healing

Para a avaliação da capacidade de mobilidade das células foi realizado o experimento de wound healing. As células MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 24 poços 5 x 10⁴ células por poço. Então foi usada a ponta de uma ponteira de 200 μ l para retirar as células de forma uniforme. Cada poço foi lavado 3 vezes com PBS e então 3 poços receberam os tratamentos com 1 μ g/ml de DTX e de NLS-DTX ou apenas o meio de cultivo como controle. Após 24h, 48h e 72h foram registradas as imagens de cada tratamento no Microscópio Axiovert 100 (Zeiss, Alemanha). Para a análise das imagens foi utilizado o Software ImageJ para calcular a área sem células, para cada tempo foram utilizadas 3 imagens para cada tratamento.

5.12 Morte celular

Na análise do tipo de morte induzida pelos tratamentos após 72 horas com NLS-DTX e DTX, as células MDA-MB-231 foram marcadas com Anexina V-FITC e Iodeto de propídio (PI). Este teste permite a identificação e quantificação de subpopulações de células em apoptose inicial, apoptose tardia ou necrose e também as células viáveis. As células MDA-MB-231 foram semeadas com 1x10⁵ em placas de 12 poços. Após 72h, as células foram tratadas com NLS-DTX e DTX na concentração 1 μ g/mL ou receberam apenas meio de cultivo (controle). Antes de completar as 72 horas de tratamento com as NLS-DTX e o DTX, o grupo controle de apoptose foi tratado com peróxido de hidrogênio. Após isso, tanto as células aderentes como as flutuantes foram recolhidas e centrifugadas a 500g por 5 min para a retirada do meio. O pellet foi lavado com PBS e as células foram centrifugadas. Os pellets foram resuspendidos em 100 μ L de tampão de ligação de anexina V (10 mM HEPES, 140 mM NaCl e 2,5 mM de CaCl₂ – pH 7,4) e o grupo controle de necrose foi aquecido à 60°C. Foram adicionados 3 μ L de anexina-V nas amostras e depois incubadas por 15 min à temperatura ambiente e protegidas da luz. Após este período, 400 μ L do tampão de ligação da Anexina V foram adicionados e os tubos a partir desse momento foram mantidos no gelo, seguido da adição de 500 μ L da solução de PI (PBS e Iodeto de Propídio – para concentração final de 2 μ g/mL). O grupo controle de apoptose foi marcado somente com anexina-V e o grupo controle de necrose somente com PI. As células foram incubadas por mais 5 minutos no gelo, lavadas com PBS

e a aquisição dos dados foi feita no citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson). As análises foram realizadas a partir de 3 experimentos independentes.

5.13 Análise estatística

Os dados das análises foram submetidos à análise de variância (one way - ANOVA). As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o Software GraphPad Prism 9 e os resultados com a média + SEM. Os valores de $P < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

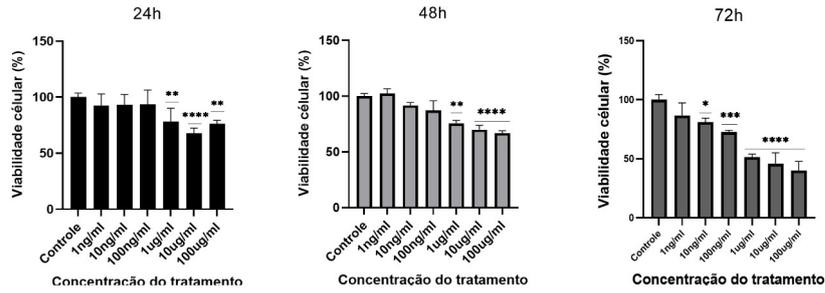
6. Resultados

A fim de avaliar a citotoxicidade da NLS-DTX e do DTX foram realizados ensaios de MTT em MDA-MB-231 e em fibroblastos. O ensaio também foi realizado com seus respectivos veículos, sendo eles, a NLS-BRANCA e o etanol. As células foram tratadas com diferentes concentrações de 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL dos diferentes tratamentos em 24h, 48h e 72h. Os histogramas representam o percentual da viabilidade celular para cada linhagem após os tratamentos nas concentrações representadas.

Na figura 4 é possível observar que a linhagem MDA-MB-231, quando tratada com NLS-DTX tem a redução da viabilidade são tempo e dose dependente. No tratamento com DTX também há uma relação entre a viabilidade e o tempo de tratamento, mas em tempos superiores ao tratamento de 24h a variação na concentração apresenta uma uniformidade quanto a viabilidade das células. E no tempo de tratamento de 72h e a concentração de 1 µg/mL as células apresentaram uma viabilidade aproximada de 50% em ambos os tratamentos, então essa concentração foi usada nos tratamentos posteriores pois permitiria avaliar a diferença entre os diferentes tratamentos. Já os tratamentos realizados tanto com a NLS-BRANCA quanto com o etanol não apresentaram uma variação estatisticamente significativa nem quanto a variação nas concentrações utilizadas nem quanto a variação de tempo de tratamento.

MDA-MB-231

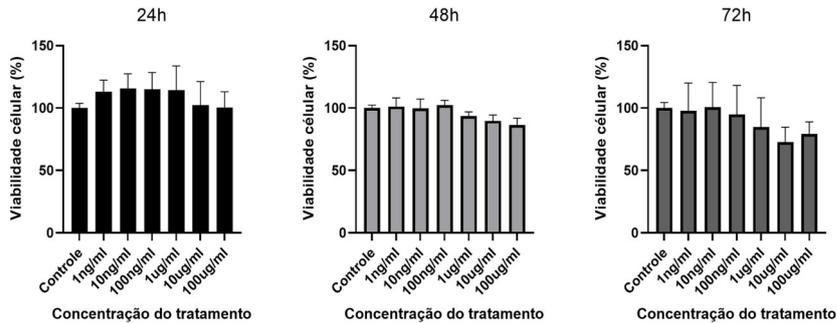
NLS-DTX



DTX



NLS-BRANCA



Etanol

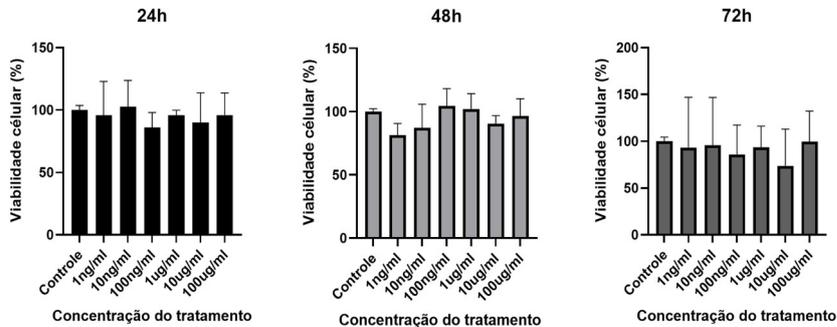
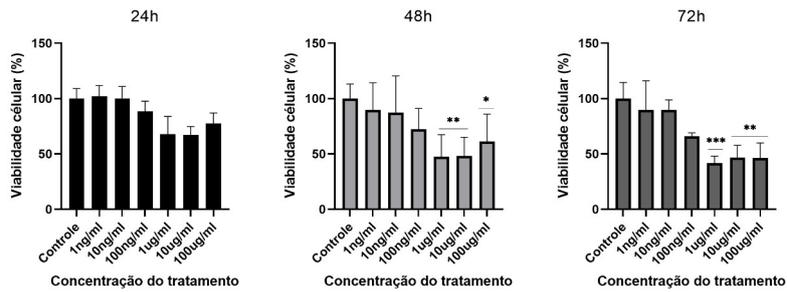


Figura 4: Análise da viabilidade celular da MDA-MB-231 por MTT tratadas com DTX, NLS-DTX, NLS-BRANCA e Etanol, após 24h, 48h e 72h. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ comparados ao controle não tratado.

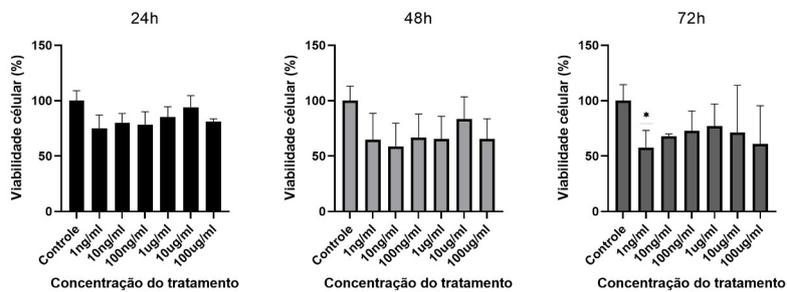
Na figura 5 pode ser analisado que a viabilidade dos fibroblastos foi afetada tanto pelo tratamento com NLS-DTX quanto com o tratamento por DTX. Sendo que a NLS-DTX reduziu a viabilidade dos fibroblastos nos tempos de 48h e 72h nas três maiores concentrações. Sendo que nos dois tratamentos a linhagem tumoral foi mais sensível que a linhagem não tumoral. Assim como, os respectivos tratamentos da NLS-BRANCA e do etanol na MDA-MB231, os fibroblastos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos e o controle. Nem com a variação nas concentrações nem com a variação do tempo.

Fibroblasto

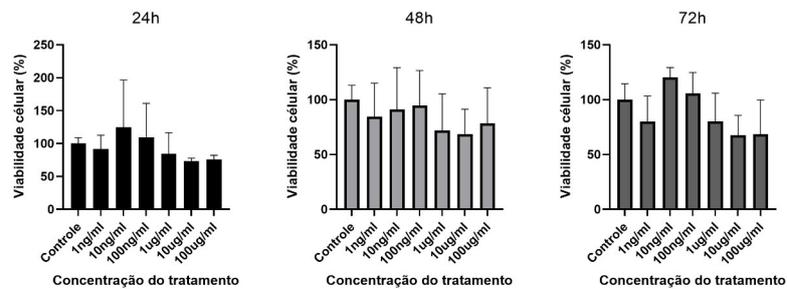
NLS-DTX



DTX



NLS-BRANCA



Etanol

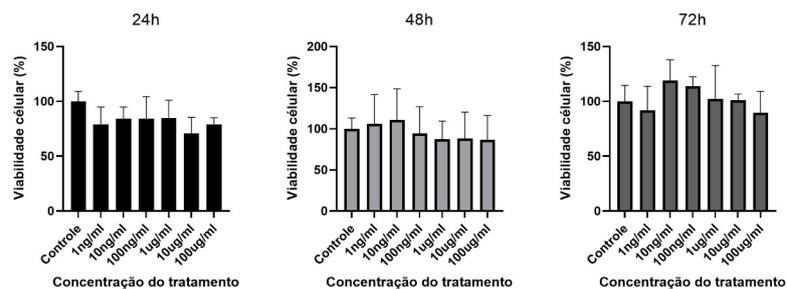


Figura 5: Análise da viabilidade celular dos fibroblastos por MTT tratadas com DTX, NLS-DTX, NLS-BRANCA e Etanol, após 24h, 48h e 72h. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ comparados ao controle não tratado.

Com a avaliação por microscopia de luz, na Figura 6 foi possível observar que as células do controle mantêm sua morfologia inalterada ao longo do tempo. As células possuem um formato fusiforme bem característico, há o aumento da densidade de células quando comparado ao tempo inicial e elas se mantêm aderidas.

Já com o tratamento com a NLS-DTX as células perdem sua morfologia padrão e se tornam mais arredondadas, com muitas delas perdendo sua adesão e reduzindo de tamanho. A densidade de células também é consideravelmente inferior ao controle.

As características alteradas com o tratamento com o DTX são similares as que ocorreram após o tratamento com a NLS-DTX, com algumas células apresentando um citoplasma mais expandido, comportamento que é observado na figura 7.

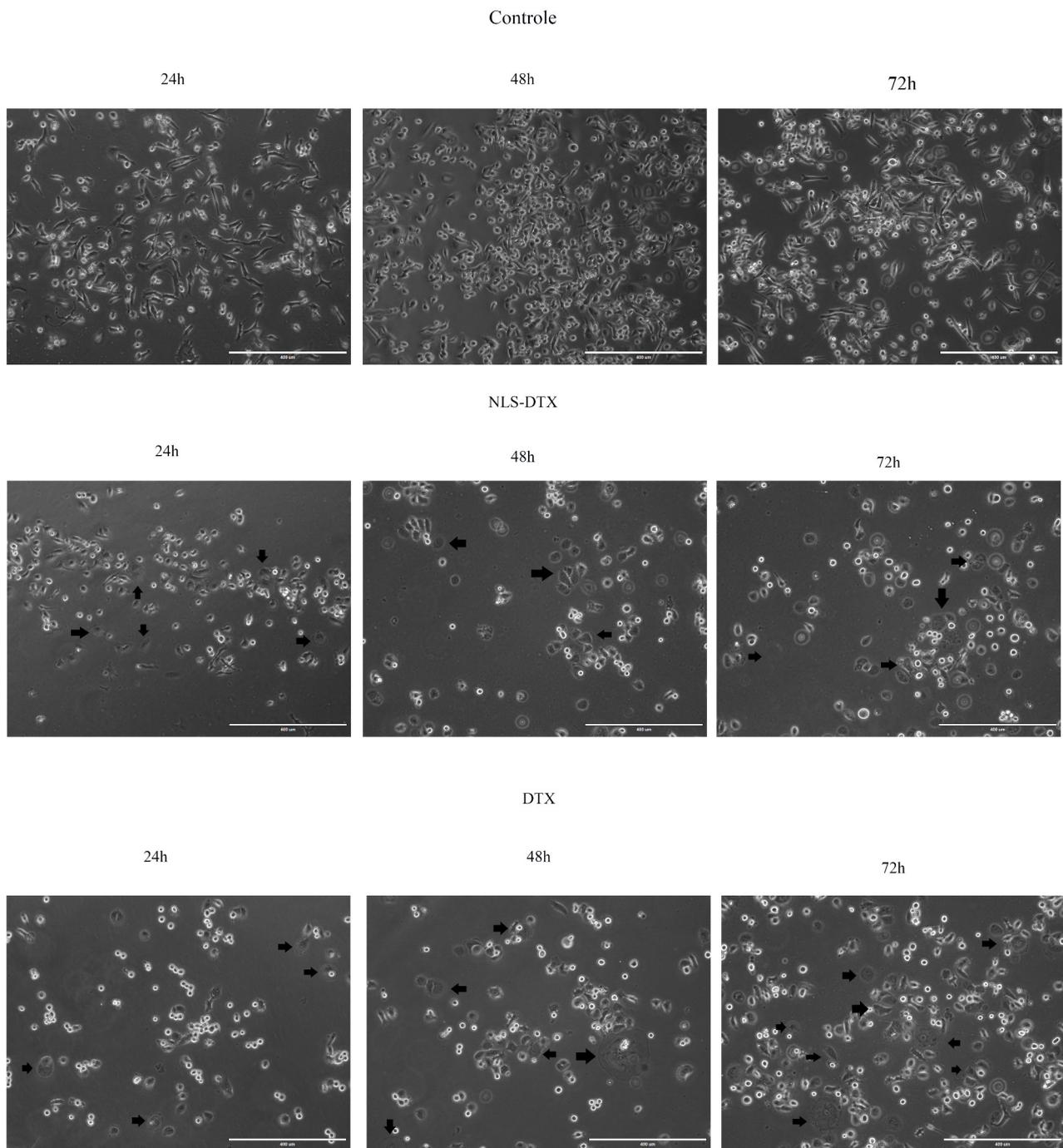


Figura 6: Avaliação morfológica da linhagem MDA-MB-231 após 24h, 48h e 72h de tratamento com NLS-DTX e DTX por microscopia de luz. Setas indicam as células tratadas que apresentam alterações no citoplasma.

Para observar melhor as alterações causadas pelo tratamento as células foram coradas com HE. E é possível observar na Figura 7 que há relevantes alterações no citoplasma, que ou as células reduzem drasticamente ou o expandem de forma exacerbada. Também é possível notar que o núcleo das células tratadas se torna segmentado após ambos tratamentos.

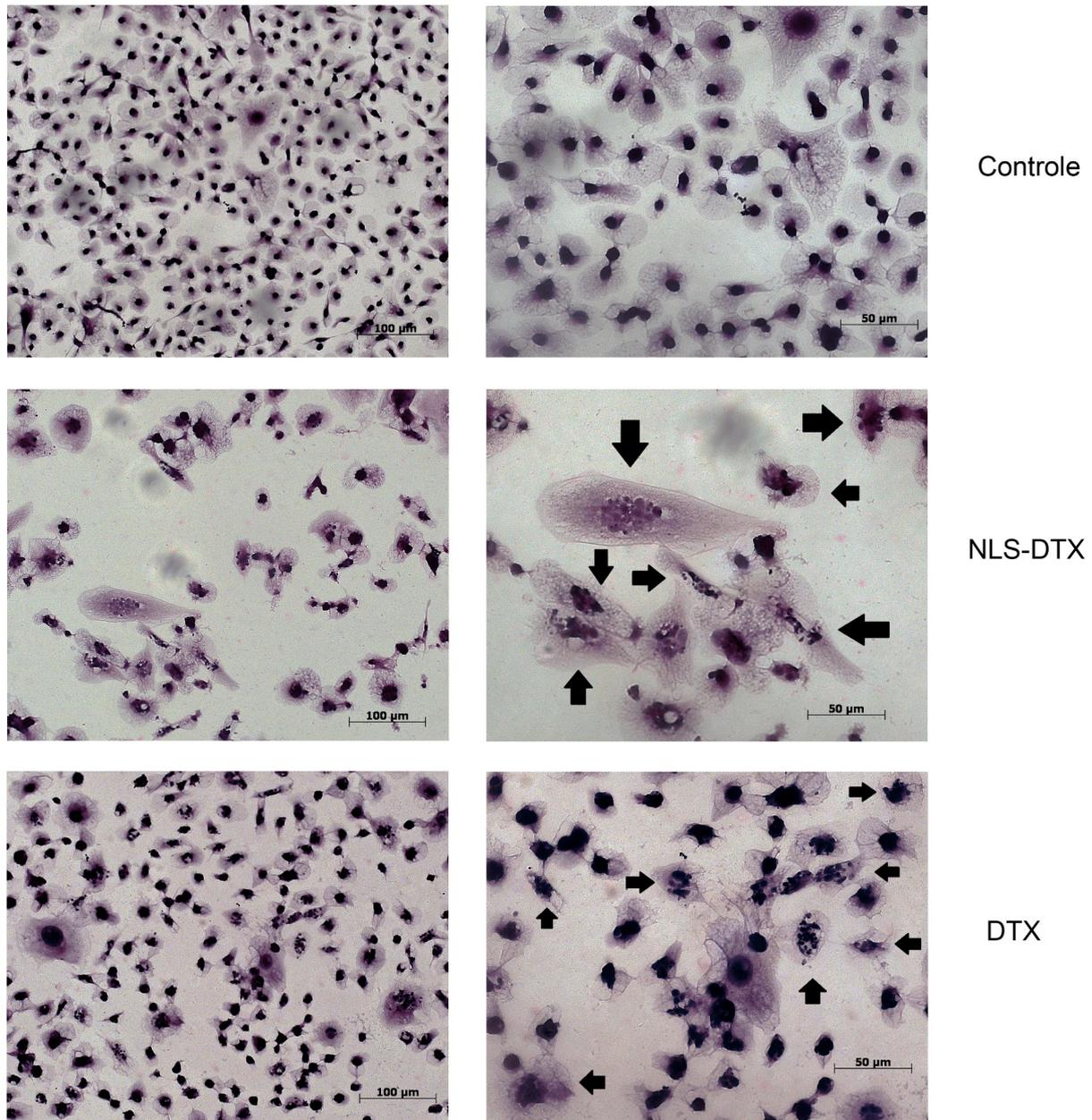


Figura 7: Avaliação morfológica da linhagem MDA-MB-231 após 72h de tratamento com NLS-DTX e DTX por microscopia de luz das células coradas com hematoxilina e eosina. As setas indicam as células que apresentam o núcleo alterado, com uma multinucleação em ambos os tratamentos.

As alterações observadas por microscopia de luz são enfatizadas ao se analisar por microscopia eletrônica de varredura (Figura 8), a estrutura da superfície da célula é muito alterada após o tratamento com a NLS-DTX. Além da redução da densidade das células é possível observar as mudanças na estrutura da membrana. A membrana da célula tratada se torna mais rugosa, com vilosidades, há a redução dos prolongamentos muito característicos da célula.

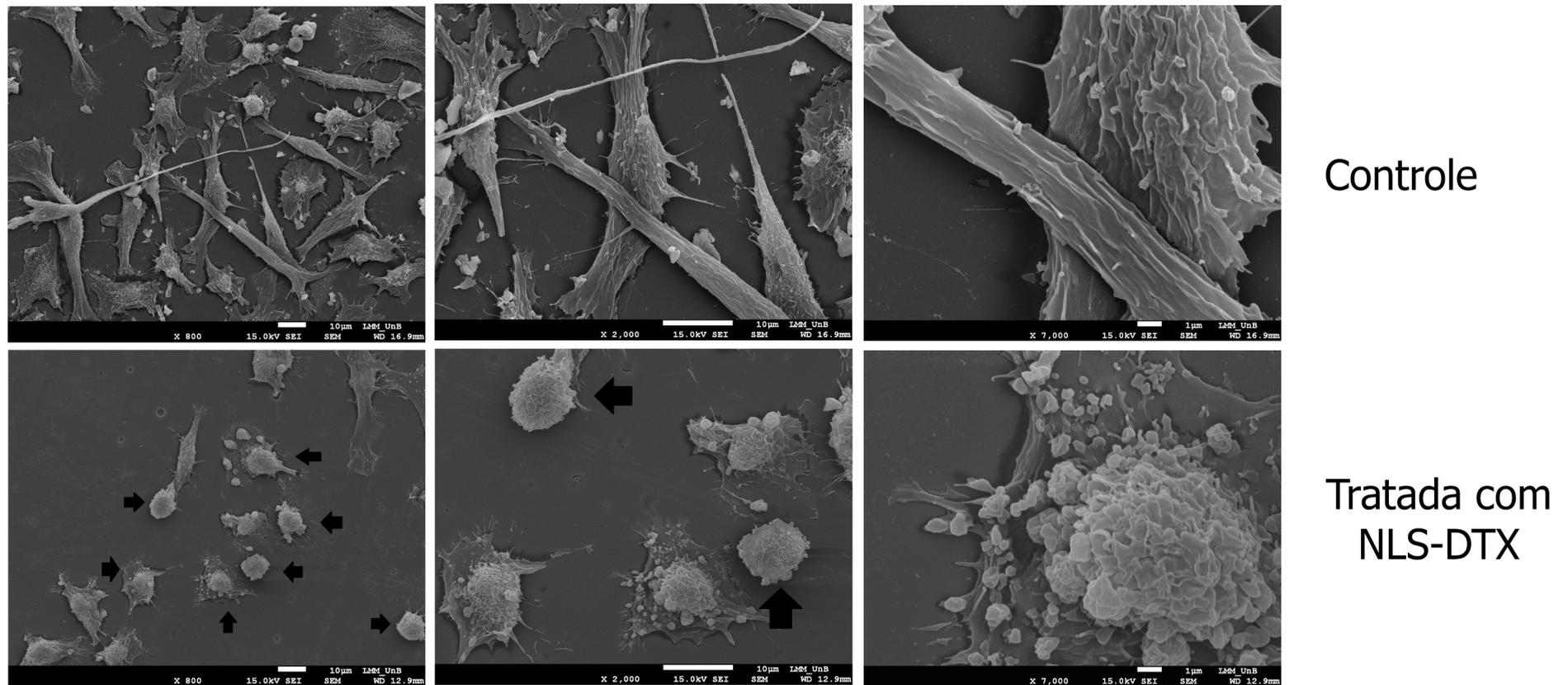


Figura 8: Microscopia eletrônica de varredura das células MDA-MB-231 após 72h de tratamento com NLS-DTX e seu controle. As setas indicam as células que perderam seus prolongamentos. E visível as alterações na superfície das células após o tratamento, assim como a redução na densidade de células.

No período de 3 horas é possível observar os lisossomos, já 6 horas após o tratamento há a formação de vários lisossomos com estruturas mais eletrodensas que podem indicar a localização das NLS-DTX, pois a mesma foi contrastada com tetróxido de ósmio e está se ligando a estrutura lipídica da nanopartícula. As nanopartículas quando são internalizadas vão para os lisossomos, já que as nanopartículas não foram observadas em outras estruturas da célula. E as células nas horas iniciais do tratamento mantêm os prolongamentos celulares, estruturas que após 72h de tratamento há uma visível redução (Figura 9).

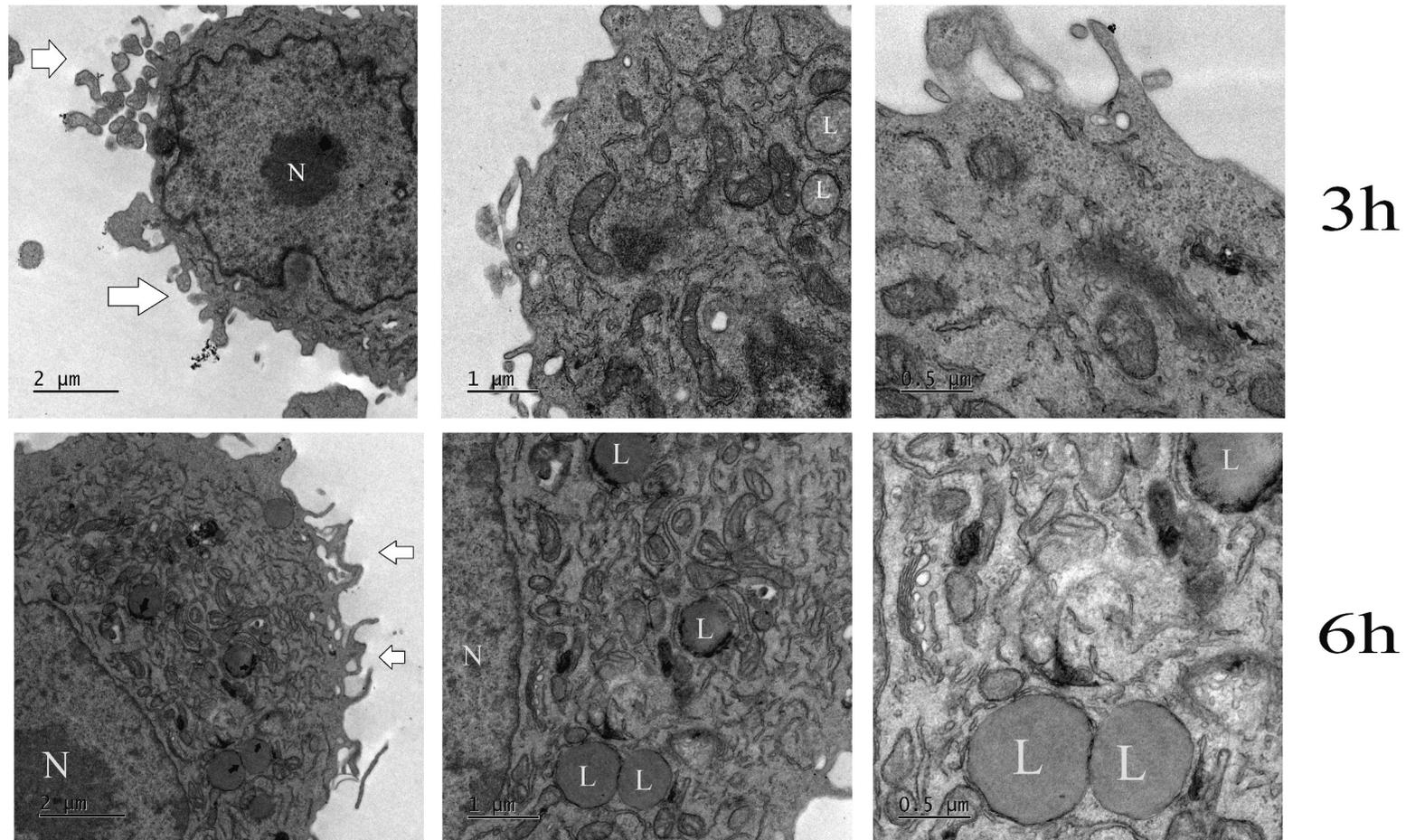


Figura 9: Microscopia eletrônica de transmissão das células MDA-MB-231 após 3h e 6h de tratamento com NLS-DTX. O N indica o núcleo, o L indica os lisossomos, as setas pretas indicam a área eletrodensa no lisossomo que indica a presença da NLS-DTX e as setas brancas indicam os prolongamentos da membrana da célula que ainda estão nos tempo iniciais de tratamento.

Como já indicava as microscopias anteriores, na análise ultraestrutural da célula tratada com NLS-DTX por 72h o núcleo da mesma se torna segmentado, em maior aumento é visível delimitação desses segmentos pela carioteca. E a célula apresenta uma quantidade reduzida de prolongamentos de membrana da célula quando comparada aos tempos iniciais, estrutura que é alterada pois o tratamento tem com alvo a tubulina que compõe o citoesqueleto da célula.

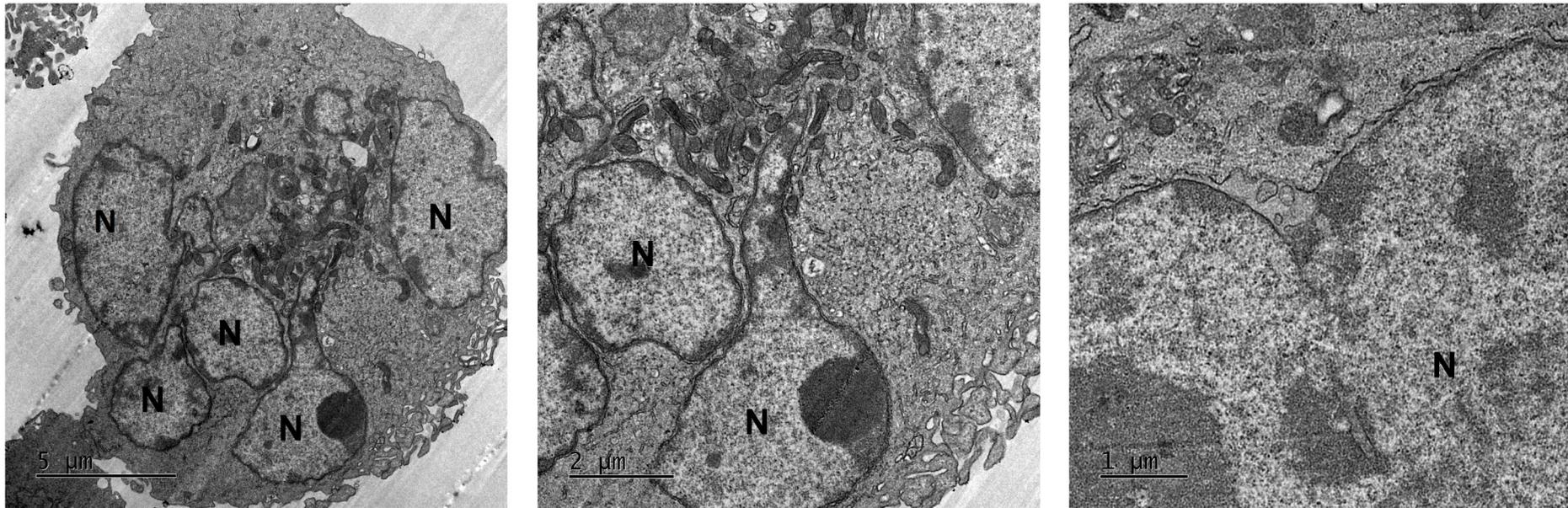


Figura 10: Microscopia eletrônica de transmissão da MDA-MB-231 após 72h de tratamento com NLS-DTX. O N indica as segmentações do núcleo. Observação do núcleo segmentado, multinucleação característica após o tratamento com a NLS-DTX. Em maior aumento, é possível observar que os segmentos nucleares são delimitados pela carioteca.

Com a imunomarcção (Figura 11) pode-se observar que a beta-tubulina se encontra no citoplasma delimitando a estrutura nuclear. Núcleo das células nos grupos tratados está segmentado como já observado nas análises anteriores. O arranjo estrutural da célula é alterado com a redução dos prolongamentos celulares após os tratamentos.

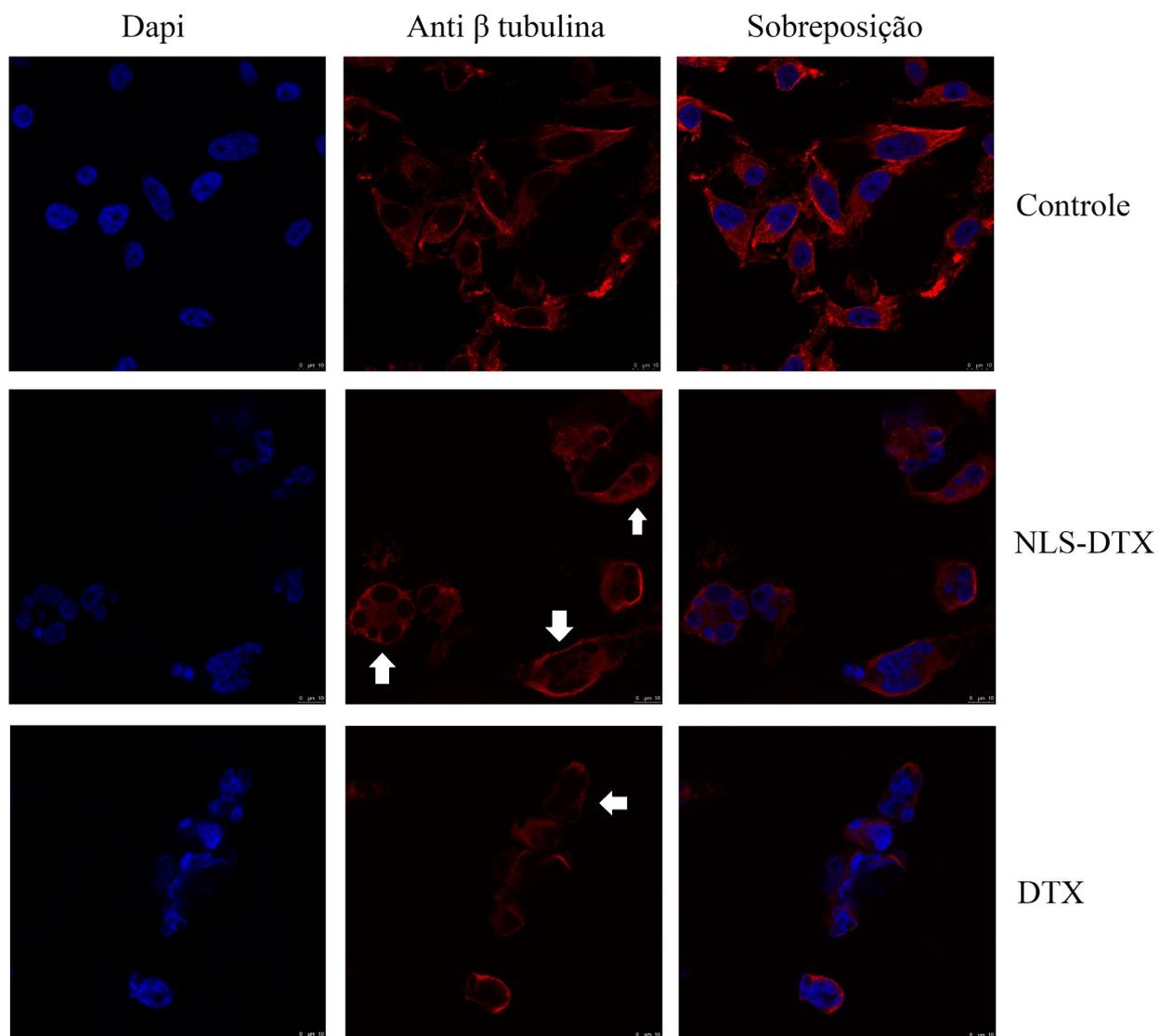


Figura 11: Imunomarcção de beta-tubulina em MDA-MB-231 após 72 horas de tratamento. DAPI marcando o núcleo de azul, o vermelho marcando a beta-tubulina e a sobreposição das duas marcações. As setas indicam a estrutura da beta-tubulina delimitando as segmentações do núcleo.

Pela análise por citometria de fluxo, pode-se quantificar as populações que estão em G1 (2N de DNA), em G2/M (4N de DNA) e as que estão na fase S (quantidades intermediárias de DNA). E as células em que o DNA está fragmentado apresentam uma quantificação de fluorescência abaixo do pico G1, sendo então chamadas de pico sub-G1. Após a análise estatística da triplicata dos experimentos, apesar de visualmente diferentes (Figura 12 - A), apenas a NLS-DTX apresentou diferença significativa quanto aos grupos sub-G1 e G1 (Figura 12 -B).

Ciclo celular

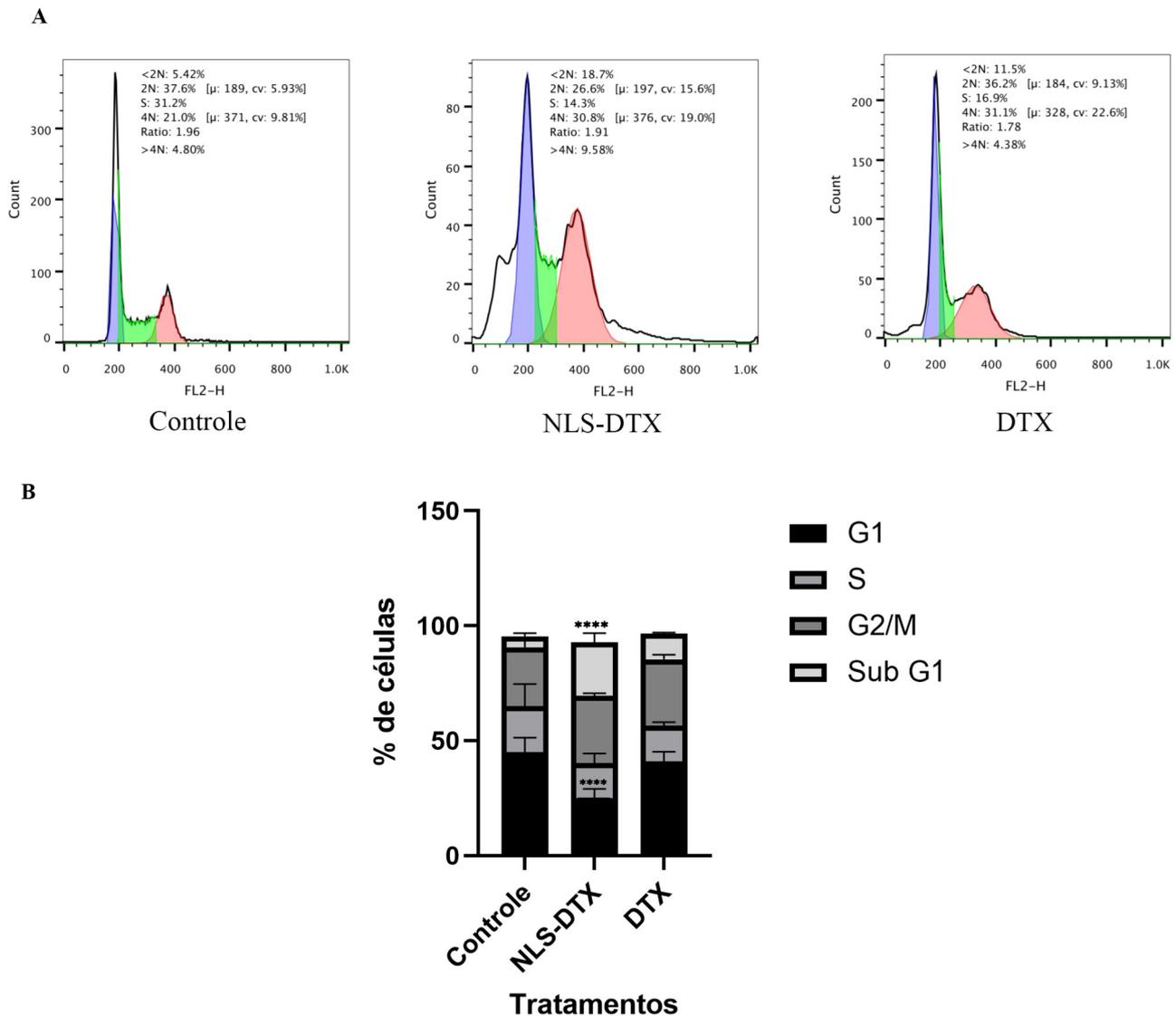


Figura 12: Análise de ciclo celular da MDA-MB-231 após tratamentos. A) Histogramas das fases do ciclo celular, células não tratada, tratadas com NLS-DTX e com DTX. B) Quantificação do percentual células em cada fase do ciclo celular. Os resultados apresentados são de três experimentos independentes, com a porcentagem média de células em cada fase do ciclo celular \pm SEM. **** $P < 0.0001$ quando comparado ao controle.

Através do ensaio de wound healing pode ser observado na Figura 13 que os tratamentos com NLS-DTX e DTX, inibem a proliferação e mobilidade das células quando comparados a célula sem tratamento. Ao final das 72h o grupo controle já preenche quase toda a área que as células foram retiradas, enquanto em ambos os tratamentos mesmo após 72h as células não tem a mesma característica. E quando quantificado a área vazia, fica claro que os tratamentos alteram a capacidade das células de se locomoverem.

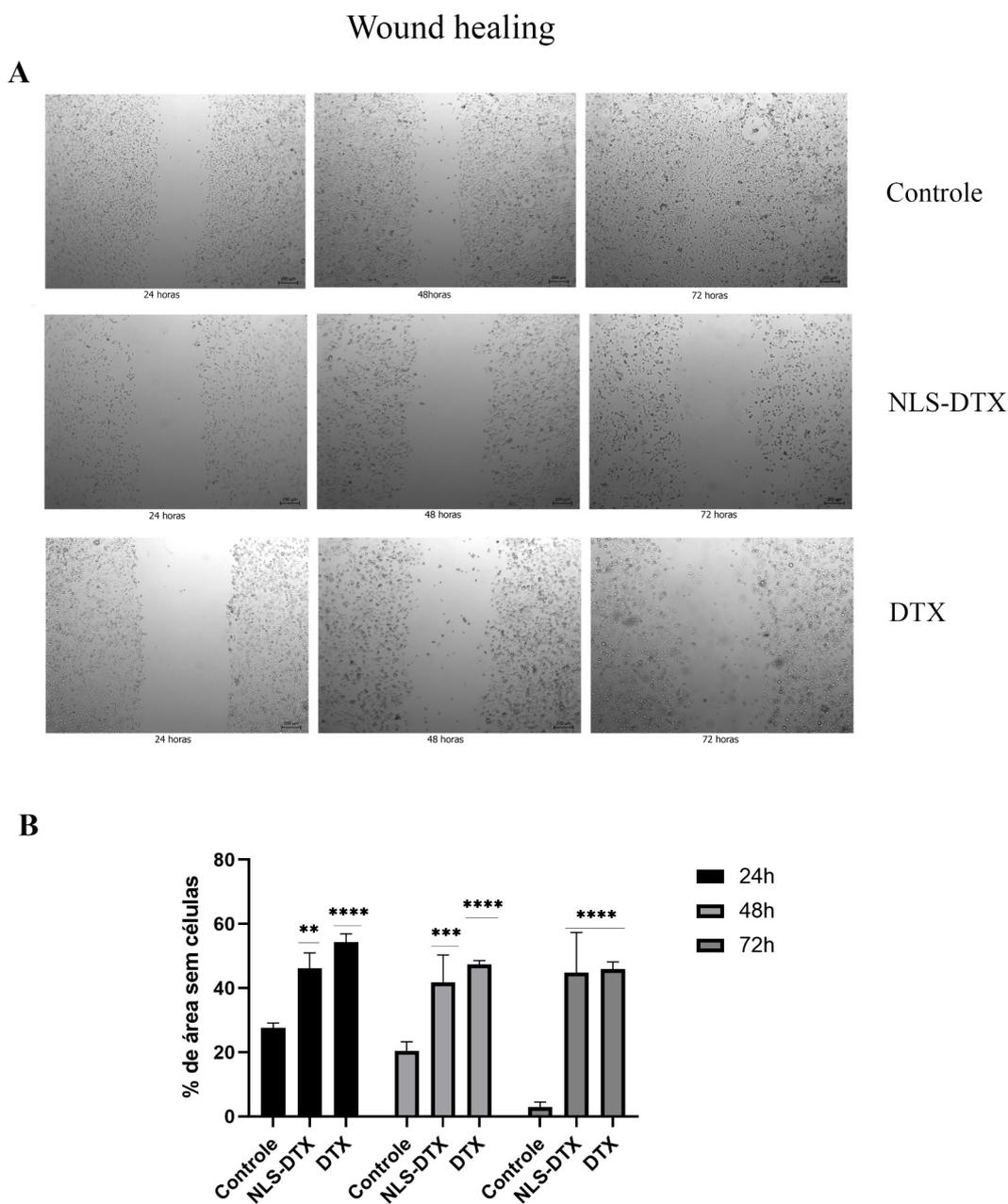


Figura 13: Análise de wound healing de MDA-MB-231. A) Microscopia de luz com controle e os tratamentos com NLS-DTX e DTX, após 24h, 48h e 72h. B) Histograma com a área sem células de cada um dos tratamentos com os diferentes tempos. Resultado da área em triplicata de cada um dos tratamentos. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ comparados ao controle não tratado.

Após a marcação com a Anexina-V e iodeto de Propídio, os resultados indicaram que apesar de haver uma visível alteração no tipo de morte na Figura 14, apenas o grupo tratado com NLSDTX apresenta morte por apoptose estatisticamente diferente do controle (Figura 14-B).

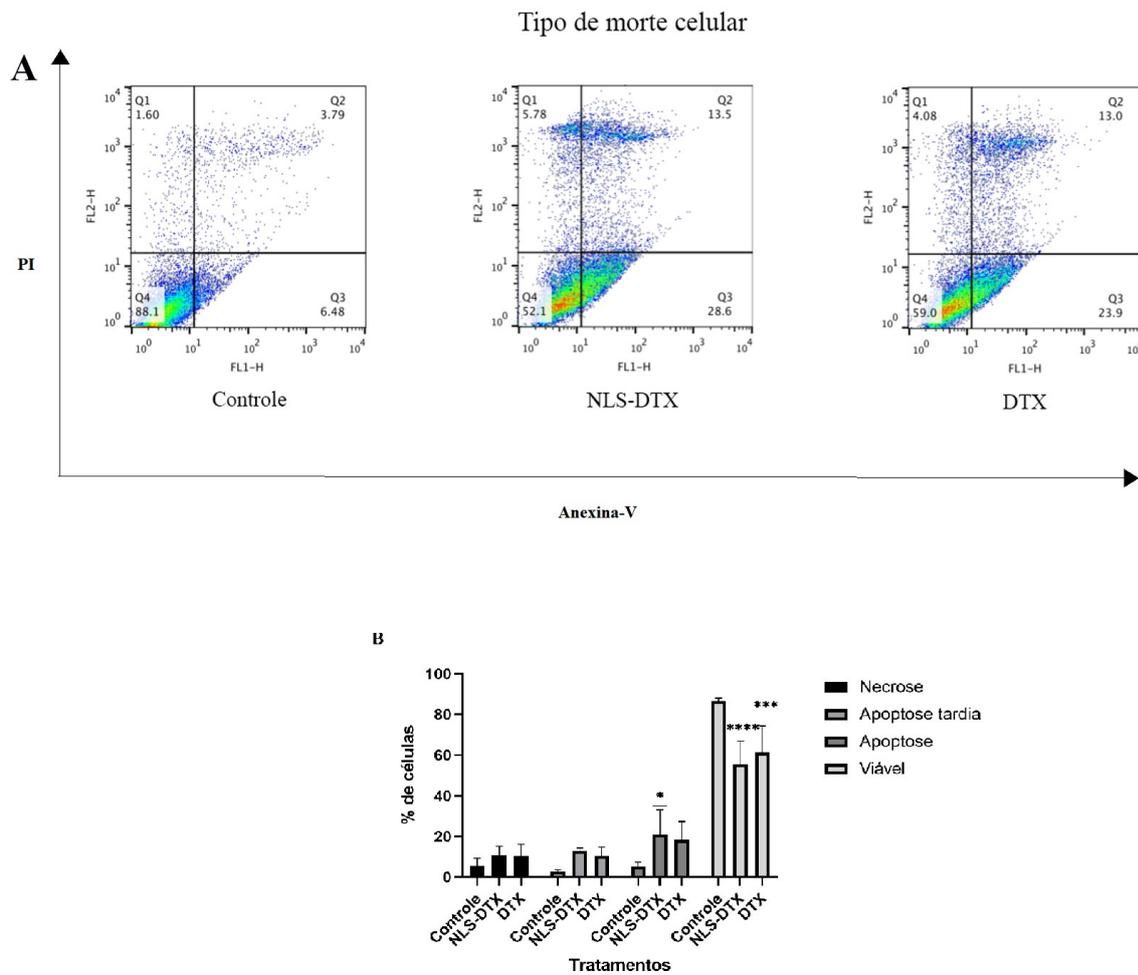


Figura 14: Análise de tipo de morte celular. A) Distribuição célula de acordo com o perfil das marcações. Q1: células necróticas, Q2: apoptose tardia, Q3: apoptose inicial, Q4: células viáveis. B) Histograma dos perfis de morte celular por tratamento com a média + SEM de três experimentos independentes. * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ e **** $P < 0.0001$ comparado ao controle.

A marcação com CFSE indica a capacidade de proliferação das células tratadas, pois após cada divisão das células há a redução da fluorescência, indicada pelo eixo X (FL1-H). As células tratadas com NLS-DTX e DTX tiveram o comportamento semelhante ao controle positivo, a colchicina. Com sobreposição dos histogramas, o controle positivo (colchicina) e ambos os tratamentos inibiram a proliferação das células MDA-MB-231 após 72h de tratamento (Figura 15).

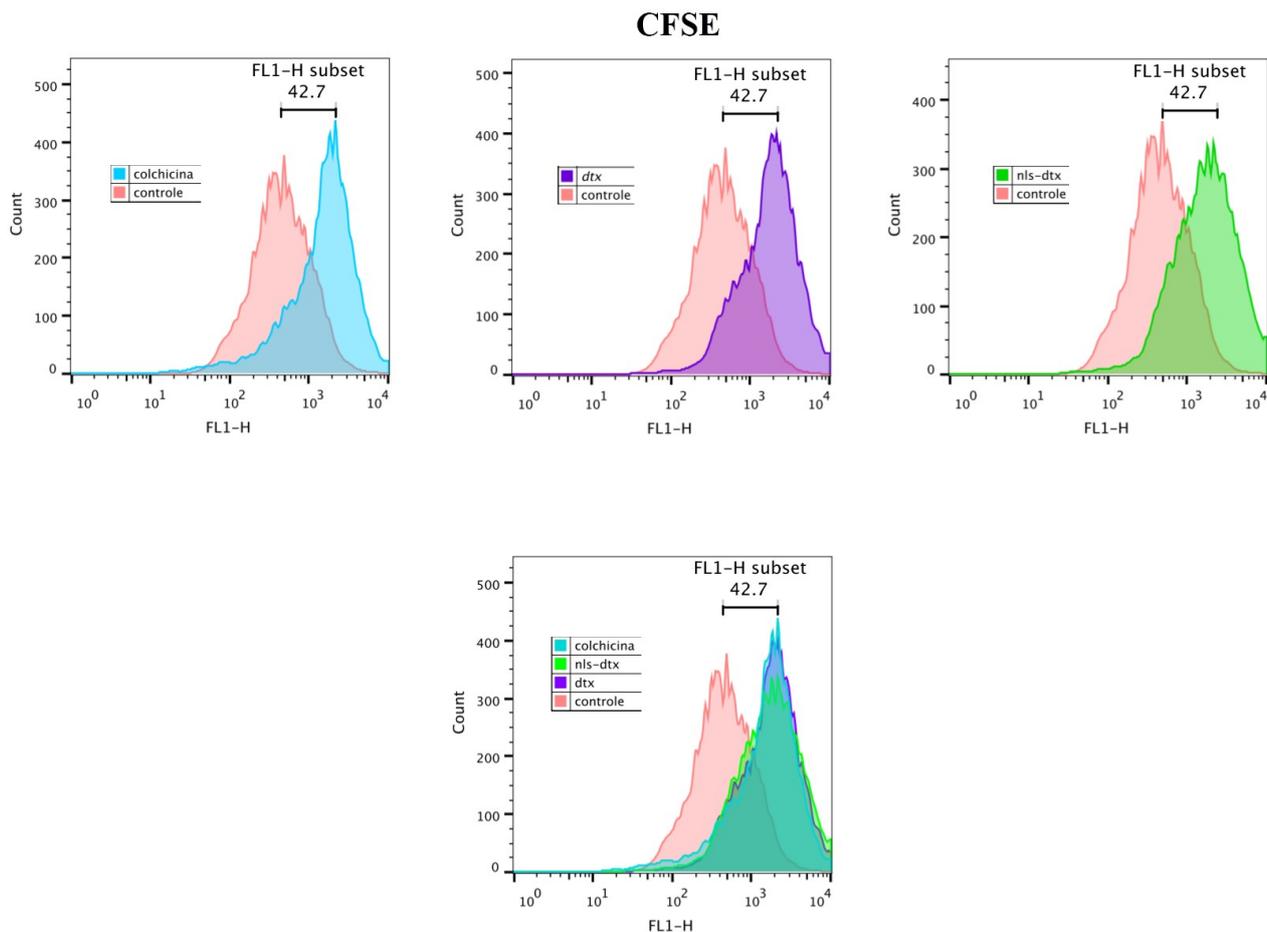


Figura 15: Análise de proliferação da MDA-MB-231 tratada com NLS-DTX, DTX e colchicina após marcação com CFSE. A MDA-MB-231 quando tratada com NLS-DTX e DTX tem com a capacidade de proliferação reduzida. Com a sobreposição dos histogramas é possível observar que ambos os tratamentos tem controle positivo (colchicina).

7. Discussão

Atualmente, o câncer é a segunda causa de morte no mundo. É uma doença complexa caracterizada pelo acúmulo de mutações que levam a uma proliferação sustentada de células e que escapam dos diferentes controles de morte celular. Os medicamentos contra o câncer comercialmente disponíveis tendem a apresentar uma variedade de efeitos tóxicos sistêmicos devido a muitos fatores, alta toxicidade, baixa biodisponibilidade, alta dispersão do medicamento no corpo, e ausência de dispositivos de distribuição e liberação controlada de drogas³⁷. O docetaxel (DTX) é considerado uma das drogas anticâncer importantes, pois tem uma atividade significativa contra diferentes tipos de cânceres humanos. No entanto, o DTX se acumula nas células cancerosas em baixas concentrações devido à sua falta de seletividade. Consequentemente, apresenta uma baixa eficiência do fármaco e alto grau de toxicidade³⁸. O DTX produz atividade citotóxica por estabilização dos arranjos de microtúbulos, que subseqüentemente inibe a despolimerização dos microtúbulos. Essa estabilização resulta em escassez de tubulina livre, que é importante para a síntese de microtúbulos³⁹. Os atuais produtos DTX aprovados pela Food and Drug Administration (FDA), incluindo Taxotere, são essencialmente soluções à base de Tween 80 / etanol, que, infelizmente, estão associados a vários efeitos adversos significativos. Eles induzem hipersensibilidade acentuada, neutropenia, retenção de líquidos e alopecia. Outros problemas associados às formulações de DTX à base de Tween 80 / etanol incluem o acúmulo inespecífico de DTX em órgãos saudáveis, o que pode levar à toxicidade sistêmica e subseqüente descontinuidade da terapia⁴⁰. Consequentemente, a incorporação de docetaxel em nanopartículas, como nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs), é uma promissora e uma excelente estratégia para entregá-lo às células cancerosas. As NLSs foram introduzidas pela primeira vez como carreadores de drogas em 1991 como uma alternativa aos carreadores convencionais, como nanoemulsão e lipossomas⁴¹. Comparados a esses carreadores convencionais, os NLSs possuem muitas vantagens, como alta estabilidade física, liberação sustentada do fármaco e a possibilidade de produção em larga escala sem o uso de solventes orgânicos. As NLSs são geralmente preparadas a partir de lipídios biodegradáveis fisiológicos. Devido à sua composição e faixa de tamanho nanométrico, as NLSs tendem a penetrar, se acumular e serem retidas nas células tumorais³⁸. Algumas dessas qualidades foram possíveis de observação na ação da NLS-DTX a partir do teste de viabilidade. Após 72h, tanto o grupo tratado com NLS-DTX quanto o tratado com DTX apresentaram a redução da viabilidade em 50% com a mesma concentração de 1µg/mL, que foram usadas nos testes posteriores para comparar os efeitos dos tratamentos. Entretanto células tratadas com a NLS-DTX apresentaram uma redução na viabilidade dependente tanto do tempo, garantindo assim sua

liberação sustentada, quanto uma dependência maior da dose administrada. O que não foi observado da mesma forma quando comparado com o DTX. Características que já haviam sido descritas por Rocha, 2020⁴² em linhagem murina (4T1) e foram também observadas na linhagem MDA-MB-231. Comportamento observado também em nanopartículas como lipídicas sólidas carregadas com linalol (SLN-LN)³⁷, nanopartículas lipídicas sólidas com docetaxel e palmitato (DTX-PL SLN)³⁹, NLC carregadas com miricetina (Miricetina-NLC)⁴³, nanopartículas lipídicas incorporadas com docetaxel (DTX-NPs)⁴⁴. O aumento da captação de nanopartículas leva a um aumento do acúmulo intracelular de DTX, induzindo a efeitos citotóxicos mais elevados, uma exposição mais longa de DTX no citosol devido à liberação sustentada pode levar a uma citotoxicidade aumentada ao longo do tempo porque DTX é um agente anticâncer específico do ciclo celular⁴⁴.

A estabilidade do ciclo de polimerização e despolimerização da beta tubulina é importante para a manutenção de diversas funções celulares, entre elas está a manutenção da estrutura celular⁴⁵. Pode-se notar na microscopia de luz e MEV que as células do controle tem um formato fusiforme, enquanto as células tratadas com NLS-DTX estão mais arredondadas, perdem seus prolongamentos, encolhem e desaderem da placa. A microscopia confocal mostra que alterações morfológicas observadas nas outras microscopias estão associadas ao processo de estabilização da estrutura da beta tubulina das células tratadas. Nas imagens de MET das horas iniciais do tratamento é possível ver que as células ainda têm prolongamentos mas após 72h de tratamento com NLS-DTX essas estruturas não são mais tão evidentes. Estas alterações morfológicas citadas foram observadas em linhagens MDA-MB-231⁴⁶ e MCF7⁴⁷ de câncer de mama e em linhagens de câncer de próstata PC3 e DU145⁴⁸ quando tratadas com DTX .

Os nanocarreadores demonstram aumento da captação celular ao se ligar a membrana celular e entrar no citosol por endocitose⁴⁴. A NLS-DTX quando internaliza é direcionada para o lisossomo, adentrado a célula de maneira diferente do DTX. Moléculas pequenas e hidrofóbicas como o DTX tendem a entrar na célula por difusão simples, por conta da solubilidade da bicamada lipídica. A diferença de internalização pode implicar em diferentes interações com o fármaco após sua liberação da nanopartícula. E o tempo de ação do fármaco é diferente de quando ele está encapsulado, pois mesmo após 6 horas de tratamento o fármaco se encontra no lisossomo, indicando que o tempo para a interação com as estruturas celulares é diferente do fármaco livre. Foi relatado anteriormente que as NLSs podem se ligar à membrana celular e entrar nas células tumorais⁵⁰ que, por sua vez, aumentam a captação celular dessas nanopartículas em comparação com a solução livre. Além disso, NLSs podem se acumular e serem retidas dentro das células tumorais, enquanto a solução de DTX livre se difunde e não pode se acumular nas células^{38,49-51}.

Fármacos que tem como alvo os microtúbulos estão entre a primeira linha de quimioterapias para um amplo espectro de cânceres, mas as respostas dos pacientes variam muito. Esses antimitóticos clássicos se ligam aos microtúbulos e bloqueiam sua dinâmica de polimerização⁵². Microtúbulos são os maiores componentes filamentosos do citoesqueleto eucariótico e são essenciais para todas as células, pois controlam a forma, divisão, motilidade e diferenciação da célula⁴⁵. Na ausência de dinâmica dos microtúbulos, o fuso mitótico não pode ser formado adequadamente, resultando em parada mitótica prolongada e subsequente parada do crescimento e morte celular⁵². Esses compostos se ligam aos microtúbulos em locais específicos, os taxanos interagem com a β -tubulina e estabilizam a ligação entre os microtúbulos⁵³. Falhas no controle dos microtúbulos estão frequentemente associadas a quebras cromossômicas e cariocinese deficiente, que levam a alterações nucleares grosseiras (micronucleação e multinucleação) que constituem os traços morfológicos mais proeminentes da catástrofe mitótica⁵⁴. Características de apoptose e necrose também foram observadas em células nas quais há falha no arranjo mitótico, levantando a possibilidade de que a catástrofe mitótica possa anteceder a morte celular apoptótica ou necrótica. Além de estar associado a morte celular, alguns marcadores morfológicos da catástrofe mitótica podem preceder ou ocorrer em paralelo com a senescência celular, uma parada persistente na fase G1 do ciclo celular que pode levar a célula a um destino irreversível, seja apoptose, necrose ou senescência⁵⁴. As microscopias (luz, MET e confocal) mostram que a célula apresenta o núcleo segmentado após 72h de tratamento com NLS-DTX e DTX, característico da catástrofe mitótica. Estudos indicam que a catástrofe mitótica constitui um mecanismo celular usado para manter a preservação da estabilidade genômica que pode ser aproveitada para matar seletivamente as células cancerosas⁵⁴. Isto sugeriu a possibilidade de que os processos de checkpoint mitótico necessários para a segregação cromossômica podem afetar as células tumorais de forma mais severa do que as células não transformadas⁵⁵. Outras nanoformulação já haviam induzido o mesmo comportamento após tratamento com taxanos, corroborando que as perturbações na dinâmica dos microtúbulos pela estabilização da polarização levando a catástrofe mitótica¹⁵.

A morte celular induzida por anti-mitóticos pode ocorrer tanto durante a parada mitótica, quanto após sair do ciclo mitótico normal, dependendo do tipo de célula e da droga⁵². Para avaliar se os tratamentos com NLS-DTX e DTX estavam interrompendo o progresso do ciclo celular, as células MDA-MB-231 foram marcadas com PI e analisadas por citometria de fluxo. No grupo de células tratadas no NLS-DTX ocorreu o aumento das células presas em sub-G1 em comparação com o controle, característica vista para outras nanopartículas como as nanopartículas com docetaxel direcionadas a folato (FT-NP Dtxl)⁵⁶, lipossomo com siRNA e docetaxel (Lipo-DTX/siRNA)⁵⁷, micelas e polímeros contendo DTX⁵⁸ o que poderia estar ligado a apoptose

dessas células. Então o ensaio de apoptose com Anexina / PI mostrou aumento significativo de células apoptóticas no grupo tratado com NLS-DTX, corroborando assim com o resultado de marcação nuclear com PI. Outros nanocarreadores como nanotubos de carbono conjugados com succinato de d-alfa-tocoferil polietilenoglicol 1000 carregados com docetaxel (MWCNT-TPGS-DTX)⁵⁹ lipídeos contendo docetaxel (DTX-NLC)⁶⁰ apresentam uma maior porcentagem de morte celular apoptótica que o fármacos livre, por ficarem mais retidos no ambiente intra celular^{43,59,60}.

O ensaio de wound healing foi usado para avaliar a capacidade de proliferação e de mobilidade celular da célula MDA-MB-231 a partir da comparação entre a migração das células com os diferentes tratamentos (NLS-DTX e DTX) e o controle. As células tratadas com NLS-DTX têm a capacidade de inibir a proliferação e a mobilidade de forma semelhante ao observado no tratamento com o DTX. Para uma análise mais aprofundada da capacidade de inibir a proliferação, a divisão celular, foi usado o ensaio de CFSE que demonstrou que a NLS-DTX inibe a proliferação da MDA-MB-231 com a mesma aptidão que os tratamentos convencionais (DTX e colcichina). E tanto a proliferação quanto a mobilidade são fatores importantes para o crescimento e a capacidade das células migrarem para órgãos distantes, logo essa inibição pode prevenir a formação de tumores metastáticos⁶¹⁻⁶⁴.

8. Conclusão

Ao longo do estudo foi possível observar que a NLS-DTX mantém a ação similar nas principais as atividades que o DTX, comprovando que a NLS é um bom carreador e ainda foi responsável por aprimorar algumas atividades quando comparado ao tratamento convencional, como um maior indução da apoptose e um melhor sequestro do ciclo celular, que o DTX nas mesmas concentrações e condições. Além de todas as outras vantagens que um nanocarreador confere ao fármaco, como uma liberação controlada e sustentada, melhor solubilidade e estabilidade.

A nanopartícula teve uma ação efetiva em um dos cânceres de mama mais agressivos ainda possui poucas alternativas de tratamento específicas. Demonstrando assim, um grande potencial para a atividade não só em modelos murinos, como o demonstrado por Rocha, 2020; como também em modelos *in vitro* de células humanas.

9. Perspectivas

Realizar testes dose-tempo dependentes, e analisar se a MDA-MB-231 adquirem resistência mais rápido ao fármaco com ou sem o nanocarreador;

Analisar o padrão de expressão da MDA-MB-231 após os diferentes tratamentos e avaliar se há diferença entre eles;

Verificar a interação da MDA-MB-231 com os diferentes tratamentos e as células do sistema imune, e verificar se há ativação das mesmas;

Testar novas formulações com mais de um fármaco, ou conjugadas a um anticorpo.

10. Bibliografia

1. World Health Organization. Cancer. https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1 (2021).
2. National Cancer Institute. What Is Cancer? <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (2021).
3. Nenclares, P. & Harrington, K. J. The biology of cancer. *Medicine (Baltimore)*. **48**, 67–72 (2020).
4. Hassanpour, S. H. & Dehghani, M. Review of cancer from perspective of molecular. *J. Cancer Res. Pract.* **4**, 127–129 (2017).
5. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
6. National Cancer Institute. Risk Factors for Cancer. <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk> (2015).
7. Wu, S., Powers, S., Zhu, W. & Hannun, Y. A. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. *Nature* **529**, 43–47 (2016).
8. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, (2021).
9. Ministério da Saúde & Instituto Nacional de Câncer. *Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil*. (2019).
10. Dalcin, J. *et al.* Breast Cancer Mortality in Young Women in Brazil. **10**, 1–9 (2021).
11. Barzaman, K. *et al.* Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *Int. Immunopharmacol.* **84**, 106535 (2020).
12. Waks, A. G. & Winer, E. P. Breast Cancer Treatment. *JAMA* **321**, 288 (2019).
13. Lehmann, B. D. *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J. Clin. Invest.* **121**, (2011).
14. Dass, S. A. *et al.* Triple Negative Breast Cancer: A Review of Present and Future Diagnostic Modalities. *Medicina (B. Aires)*. **57**, 62 (2021).
15. Yin, L., Duan, J.-J., Bian, X.-W. & Yu, S. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res.* **22**, 61 (2020).
16. Lehmann, B. D. *et al.* Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. *PLoS One* **11**, e0157368 (2016).
17. da Silva, J. L., Cardoso Nunes, N. C., Izetti, P., de Mesquita, G. G. & de Melo, A. C. Triple negative breast cancer: A thorough review of biomarkers. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **145**, 102855 (2020).

18. Bashraheel, S. S., Domling, A. & Goda, S. K. Update on targeted cancer therapies, single or in combination, and their fine tuning for precision medicine. *Biomed. Pharmacother.* **125**, 110009 (2020).
19. Pérez-Herrero, E. & Fernández-Medarde, A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **93**, 52–79 (2015).
20. Xu, Z. *et al.* Efficacy and safety of lapatinib and trastuzumab for HER2-positive breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ Open* **7**, e013053 (2017).
21. Lyons, T. G. Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer. *Curr. Treat. Options Oncol.* **20**, 82 (2019).
22. Zhang, E., Xing, R., Liu, S. & Li, P. Current advances in development of new docetaxel formulations. *Expert Opin. Drug Deliv.* **16**, 301–312 (2019).
23. Čermák, V. *et al.* Microtubule-targeting agents and their impact on cancer treatment. *Eur. J. Cell Biol.* **99**, 151075 (2020).
24. Mukhtar, E., Adhami, V. M. & Mukhtar, H. Targeting Microtubules by Natural Agents for Cancer Therapy. *Mol. Cancer Ther.* **13**, 275–284 (2014).
25. Dumontet, C. & Jordan, M. A. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 790–803 (2010).
26. Mosca, L., Ilari, A., Fazi, F., Assaraf, Y. G. & Colotti, G. Taxanes in cancer treatment: Activity, chemoresistance and its overcoming. *Drug Resist. Updat.* **54**, 100742 (2021).
27. Baker, J. *et al.* Docetaxel-related side effects and their management. *Eur. J. Oncol. Nurs.* **13**, 49–59 (2009).
28. Sajid, M. & Płotka-Wasyłka, J. Nanoparticles: Synthesis, characteristics, and applications in analytical and other sciences. *Microchem. J.* **154**, 104623 (2020).
29. Chang, E. H. *et al.* Nanomedicine: Past, present and future – A global perspective. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **468**, 511–517 (2015).
30. Aghebati-Maleki, A. *et al.* Nanoparticles and cancer therapy: Perspectives for application of nanoparticles in the treatment of cancers. *J. Cell. Physiol.* **235**, 1962–1972 (2020).
31. Fang, J., Islam, W. & Maeda, H. Exploiting the dynamics of the EPR effect and strategies to improve the therapeutic effects of nanomedicines by using EPR effect enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **157**, 142–160 (2020).
32. García-Pinel, B. *et al.* Lipid-Based Nanoparticles: Application and Recent Advances in Cancer Treatment. *Nanomaterials* **9**, 638 (2019).
33. Akanda, M., Getti, G., Nandi, U., Mithu, M. S. & Douroumis, D. Bioconjugated solid lipid nanoparticles (SLNs) for targeted prostate cancer therapy. *Int. J. Pharm.* **599**, 120416 (2021).
34. Wang, W. *et al.* Curcumin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles Enhanced Anticancer Efficiency in Breast Cancer. *Molecules* **23**, 1578 (2018).

35. Amreddy, N. *et al.* Recent Advances in Nanoparticle-Based Cancer Drug and Gene Delivery. in 115–170 (2018). doi:10.1016/bs.acr.2017.11.003.
36. Rocha, M. C. O. da. Desenvolvimento e caracterização da ação terapêutica de docetaxel associado à nanopartícula lipídica sólida em carcinoma mamário murino. (2020).
37. Rodenak-Kladniew, B., Islan, G. A., de Bravo, M. G., Durán, N. & Castro, G. R. Design, characterization and in vitro evaluation of linalool-loaded solid lipid nanoparticles as potent tool in cancer therapy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **154**, 123–132 (2017).
38. Dawoud, M. Chitosan coated solid lipid nanoparticles as promising carriers for docetaxel. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **62**, 102409 (2021).
39. Kaushik, L. *et al.* Exploration of docetaxel palmitate and its solid lipid nanoparticles as a novel option for alleviating the rising concern of multi-drug resistance. *Int. J. Pharm.* **578**, 119088 (2020).
40. Naguib, Y. W. *et al.* Solid Lipid Nanoparticle Formulations of Docetaxel Prepared with High Melting Point Triglycerides: In Vitro and in Vivo Evaluation. *Mol. Pharm.* **11**, 1239–1249 (2014).
41. MÅ¼ller, R. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery; a review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50**, 161–177 (2000).
42. da Rocha, M. C. O. *et al.* Docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles prevent tumor growth and lung metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells. *J. Nanobiotechnology* **18**, 43 (2020).
43. Maroufi, N. F. *et al.* Sensitization of MDA-MBA231 breast cancer cell to docetaxel by myricetin loaded into biocompatible lipid nanoparticles via sub-G1 cell cycle arrest mechanism. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **393**, 1–11 (2020).
44. Qureshi, O. S. *et al.* Sustained release docetaxel-incorporated lipid nanoparticles with improved pharmacokinetics for oral and parenteral administration. *J. Microencapsul.* **34**, 250–261 (2017).
45. Gadadhar, S., Bodakuntla, S., Natarajan, K. & Janke, C. The tubulin code at a glance. *J. Cell Sci.* (2017) doi:10.1242/jcs.199471.
46. Mann, J. *et al.* BAD sensitizes breast cancer cells to docetaxel with increased mitotic arrest and necroptosis. *Sci. Rep.* **10**, 355 (2020).
47. Alkhatib, M. H., Bawadud, R. S. & Gashlan, H. M. Incorporation of docetaxel and thymoquinone in borage nanoemulsion potentiates their antineoplastic activity in breast cancer cells. *Sci. Rep.* **10**, 18124 (2020).
48. Hu, F. *et al.* Docetaxel-mediated autophagy promotes chemoresistance in castration-resistant prostate cancer cells by inhibiting STAT3. *Cancer Lett.* **416**, 24–30 (2018).
49. Zhang, F. *et al.* Preparation and evaluation of lipid emulsified docetaxel-loaded nanoparticles. *J. Pharm. Pharmacol.* **67**, 1546–1555 (2015).

50. Zhang, R., Qin, X., Kong, F., Chen, P. & Pan, G. Improving cellular uptake of therapeutic entities through interaction with components of cell membrane. *Drug Deliv.* **26**, 328–342 (2019).
51. Jadon, R. S. & Sharma, M. Docetaxel-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles for breast cancer therapeutics. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **51**, 475–484 (2019).
52. Shi, J. & Mitchison, T. J. Cell death response to anti-mitotic drug treatment in cell culture, mouse tumor model and the clinic. *Endocr. Relat. Cancer* **24**, T83–T96 (2017).
53. Tischer, J. & Gergely, F. Anti-mitotic therapies in cancer. *J. Cell Biol.* **218**, 10–11 (2019).
54. Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M. & Kroemer, G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 385–392 (2011).
55. Janssen, A., Kops, G. J. P. L. & Medema, R. H. Elevating the frequency of chromosome mis-segregation as a strategy to kill tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 19108–19113 (2009).
56. Wang, E. C. *et al.* Differential cell responses to nanoparticle docetaxel and small molecule docetaxel at a sub-therapeutic dose range. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **10**, 321–328 (2014).
57. Qu, M.-H. *et al.* Liposome-based co-delivery of siRNA and docetaxel for the synergistic treatment of lung cancer. *Int. J. Pharm.* **474**, 112–122 (2014).
58. Khodaverdi, E. *et al.* Docetaxel-Loaded Mixed Micelles and Polymersomes Composed of Poly (caprolactone)-Poly (ethylene glycol) (PEG-PCL) and Poly (lactic acid)-Poly (ethylene glycol) (PEG-PLA): Preparation and In-vitro Characterization. *Iran. J. Pharm. Res. IJPR* **18**, 142–155 (2019).
59. Singh, R. P. *et al.* Vitamin E TPGS conjugated carbon nanotubes improved efficacy of docetaxel with safety for lung cancer treatment. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **141**, 429–442 (2016).
60. Liu, D., Liu, Z., Wang, L., Zhang, C. & Zhang, N. Nanostructured lipid carriers as novel carrier for parenteral delivery of docetaxel. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **85**, 262–269 (2011).
61. Tao, J. *et al.* Co-delivery of dihydroartemisinin and docetaxel in pH-sensitive nanoparticles for treating metastatic breast cancer via the NF- κ B/MMP-2 signal pathway. *RSC Adv.* **8**, 21735–21744 (2018).
62. Li, N. *et al.* Construction and anti-tumor activities of disulfide-linked docetaxel-dihydroartemisinin nanoconjugates. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **191**, 111018 (2020).
63. Li, J. *et al.* Synergistic inhibition of migration and invasion of breast cancer cells by dual docetaxel/quercetin-loaded nanoparticles via Akt/MMP-9 pathway. *Int. J. Pharm.* **523**, 300–309 (2017).
64. Li, G. *et al.* Design, synthesis, and bioevaluation of pyrazolo[1,5-a]pyrimidine derivatives as tubulin polymerization inhibitors targeting the colchicine binding site with potent anticancer activities. *Eur. J. Med. Chem.* **202**, 112519 (2020).