

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
Programa De Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Área De Concentração: Fármacos e Medicamentos  
Sub-Área: Estudo e Desenvolvimento de Medicamentos

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* DE SOLUÇÕES  
MICELARES CONTENDO ALIL ISOTIOCIANATO**

Tamires Cunha Almeida

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Glenda Nicioli da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. José Mario Barichello

Ouro Preto

2016

TAMIRES CUNHA ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* DE SOLUÇÕES  
MICELARES CONTENDO ALIL ISOTIOCIANATO**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Glenda Nicioli da Silva

**Co-orientador:** Prof. Dr. José Mario Barichello

Ouro Preto

2016

A447a

Almeida, Tamires Cunha.

Avaliação da atividade antitumoral in vitro de soluções micelares contendo alil isotiocianato [manuscrito] / Tamires Cunha Almeida. - 2018.

76f.: il.: grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Glenda Nicioli da Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. AITC. 2. Alil isotiocianato. 3. Micelas poliméricas. I. Silva, Glenda Nicioli da. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 615.4



## LISTA DE PRESENÇA

Sessão de defesa da 110ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas a **Tamires Cunha Almeida**, com a defesa da dissertação intitulada: “Avaliação da atividade antitumoral in vitro de soluções micelares contendo alil isotiocianato”, avaliada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 21 de março de 2016.

Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa  
UFOP

Profa. Dra. Gisele Rodrigues da Silva  
UFSJ

Este trabalho contou com a colaboração de:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daisy Maria Fávero Salvadori

Me. André Luiz Ventura Sávio

Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica - Universidade Estadual Paulista

Prof. Dr. Alexandre Reis

Laboratório de Imunobiologia - Universidade Federal de Ouro Preto

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta de Lana

Laboratório de Doença de Chagas – Universidade Federal de Ouro Preto

*Gratidão pelos caminhos percorridos.*

*E pelos que ainda faltam percorrer.*

*Dedico este trabalho aos meus pais e anjos,*

*Jesus e Conceição.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pelas bênçãos e por sempre iluminar meus caminhos.

Aos meus pais, Jesus e Conceição, que do andar de cima estão sempre me guiando. Sem o exemplo, amor e valores que me deram eu jamais chegaria aqui. Sou grata por ter tido a oportunidade de ser filha de vocês, que me ensinaram tanto na curta passagem que tiveram nessa vida. Obrigada meus anjos! Vocês estão sempre comigo.

Aos meus orientadores Prof. Barichello e Prof.<sup>a</sup> Glenda, pela oportunidade de aprender e trabalhar com vocês, pela confiança, pelos conhecimentos transmitidos ao longo desses dois anos e por acreditarem no meu potencial e neste trabalho mesmo quando tudo parecia desandar. Vocês foram essenciais na minha formação e sempre serão meus referenciais. “Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei em ombros de gigantes (Isaac Newton)”.

A Prof.<sup>a</sup> Daisy Salvadori, coordenadora do laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica na UNESP, por permitir a realização de alguns experimentos e a toda sua equipe, em especial ao André, pela enorme disposição em ajudar.

Ao Prof. Alexandre Reis e a Prof.<sup>a</sup> Marta de Lana por disponibilizarem seus laboratórios para o cultivo celular.

Ao Prof. Hildeberto Sousa por disponibilizar seu laboratório para parte do experimento de sobrevivência clonogênica.

Aos amigos do laboratório de Fitotecnologia, Janaína, Fernanda Perasoli, Simone, Regis, Lucas, Karen, Luana, Juliana Rosa, Tatiane, Pedro e Fernanda Senna, que tornaram as coisas mais fáceis e deixaram meus dias mais leves. Com vocês aprendi que para se realizar um projeto é preciso além de um laboratório com equipamento e reagentes, amigos que te apoiem, te incentivem e que estão ao seu lado em todos os momentos.

Aos professores Gustavo, Orlando, Bibó e Luiz Fernando por compartilharem o laboratório e as experiências. Aos demais colegas de laboratório pela agradável convivência.

A Daiane pela colaboração sempre “musical” e de bom humor no cultivo das células.



Aos essenciais, Laís e Thiago, pela amizade, conversas, conselhos, por me aturarem e aturarem minhas reclamações quase diárias! Não consigo imaginar meus caminhos sem vocês. “Sem vocês sou pá furada!”

A prima-irmã-amiga Paula pelo apoio incondicional em tudo que faço, e por mesmo estando longe ser uma das pessoas mais presentes na minha vida.

Aos funcionários do CiPharma, em especial Patrícia, Mirela e Renata por sempre estarem dispostas a ajudar. Ao Ramon e Carlos por terem sempre um “bom dia” pra animar os dias difíceis.

A minha querida casa “Café com Prosa” por ter me acolhido tão bem.

Aos meus tios e primos pelos cuidados e amizade.

A todos os meus amigos, aos de longe e de perto, aos novos e de longa data, que sempre torcem por mim.

A encantadora Ouro Preto por ter se tornado minha cidade do coração.

A CAPES pela concessão da bolsa.

A vocês e todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho,  
MINHA SINCERA GRATIDÃO!

## RESUMO

O alil isotiocianato (AITC), composto majoritário da semente de mostarda, vem sendo bastante estudado quanto a sua atividade antineoplásica. Neste trabalho foram desenvolvidas soluções micelares de Pluronic<sup>®</sup> F127 (F127) contendo AITC e o potencial antitumoral destas formulações foi avaliado *in vitro* em linhagens celulares de carcinoma de bexiga com diferentes *status* do gene *TP53* (RT4 – *TP53* selvagem e T24 – *TP53* mutado). As formulações foram preparadas pelo método de dispersão a frio (DF) e pelo método de reidratação de filme polimérico (RFP). A quantidade de AITC incorporada as formulações foi determinada por cromatografia líquida de alta eficácia acoplada a detector UV. Os resultados demonstraram que pelo método DF, aproximadamente 96,5% do AITC adicionado durante a preparação foi incorporado na formulação final. Entretanto, pelo método RFP ocorreu perda de mais de 75% da quantidade de AITC adicionada, mostrando que a preparação de micelas por esse método não foi viável. A avaliação da citotoxicidade e da proliferação celular foi realizada 24 e 48 horas após tratar as células das duas linhagens de tumor de bexiga por 3 horas com as formulações de AITC produzida pelo método DF. Células tratadas com AITC solubilizado em Tween (AITC livre) e células tratadas com os excipientes da formulação foram usadas como controles. Após 24 horas do tratamento, as formulações contendo AITC nas concentrações 0,0925; 0,125; 0,25 e 0,5 $\mu$ M causaram citotoxicidade na linhagem RT4; entretanto, na linhagem T24, somente a concentração mais alta (0,5  $\mu$ M) promoveu diminuição no número de células. Nenhuma citotoxicidade foi observada para o AITC livre. Após 48 horas, todas as concentrações das formulações contendo AITC levaram a reduções significativas da viabilidade celular em ambas as linhagens celulares. Além disso, as formulações foram mais citotóxicas para as células RT4 do que para as células T24, contribuindo com a hipótese de que células carregando o gene *TP53* mutado são mais resistentes a quimioterápicos. Posteriormente realizou-se o ensaio de sobrevivência clonogênica. Tanto as soluções micelares contendo AITC quanto o AITC livre foi capaz de reduzir o número de colônias formadas. Assim, podemos afirmar que soluções micelares aceleram a ação de AITC nas células tumorais avaliadas. Desta forma, as formulações desenvolvidas podem ser uma abordagem interessante para a futura administração oral dessa substância no tratamento do tumor de bexiga.

**Palavras-chaves:** AITC, alil isotiocianato, atividade antitumoral, câncer de bexiga, micelas poliméricas, Pluronic F127<sup>®</sup>.

## ABSTRACT

The allyl isothiocyanate (AITC), major compound of mustard seed, has been widely studied for its antineoplastic activity. This study aimed to develop micellar solutions of Pluronic<sup>®</sup> F127 (F127) containing AITC and the cytotoxic potential of those formulations were evaluated *in vitro* in two bladder transitional carcinoma cell lines with different *TP53* gene status (RT4, with wild-type *TP53*; and T24, mutated *TP53*). The formulations were prepared by the cold dispersion method (DF) and the polymeric film rehydration method (RFP). The amount of AITC incorporated in the formulations was determined by high performance liquid chromatography coupled to a UV detector. The results showed that nearly 96.5% of the AITC initially added was found in the final formulation prepared by the DF method. However, when the formulation was prepared by the RFP method, more than 75% of the initial amount of AITC was lost, limiting the preparation of AITC micelles by this method. The cytotoxicity and cell proliferation assessment was done 24 and 48 hours after treating both bladder carcinoma cell lines (T24 and RT4) for 3 hours with the formulations produced by the DF method. Cells treated with AITC solubilized in Tween (free AITC) and with the formulation excipients were used as controls. After 24 hours of treatment, formulations containing the AITC concentrations of 0.0925; 0.125; 0.25 and 0.5 $\mu$ M showed cytotoxicity to RT4 cell line, while in the T24 cell line, only the highest concentration (0.5  $\mu$ M) reduced the number of cells. No cytotoxicity was observed for free AITC. After 48 hours, all concentrations of the AITC formulations induced significant reductions in cell viability in both cells line. These results indicate that micellar solutions containing AITC potentiated the cytotoxic effects of this drug. Furthermore, the formulations were more cytotoxic for RT4 cells than for T24 cells contributing to the hypothesis that cells carrying the mutated *TP53* are more resistant to chemotherapy, because of the role that this gene plays in the control of apoptosis. Subsequently we carried out the clonogenic survival assay. Both micellar solutions containing AITC and free AITC were able to reduce the number of colonies formed. We can say that micellar solutions accelerate the AITC action in the tumor cells evaluated. Thus, the formulations developed can become an interesting approach for further studies and future administration of this substance in the treatment of bladder tumor.

**Keywords:** Allyl isothiocyanate, AITC, antitumoral activity, bladder cancer, polymeric micelles, Pluronic<sup>®</sup> F127

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{L}$	microlitros
AITC	alil isotiocianato
FDA	Food and Drug Administration
g	gramas
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
INCA	Instituto Nacional do Câncer
mL	mililitros
nm	nanômetros
OMS	Organização Mundial da Saúde

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Fórmula química estrutural do AITC. p. 12
- Figura 2** Fórmula química estrutural do Pluronic® F127. p. 17
- Figura 3** Morfologia das células das linhagens RT4 e T24. p. 22
- Figura 4** Fotografia representando o aspecto visual das formulações preparadas pelos métodos DF e RFP. p. 25
- Figura 5** Cromatograma de um padrão de AITC. p. 29
- Figura 6** Curva analítica utilizada no método de quantificação de AITC. p. 30
- Figura 7** Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) da linhagem T24, 24 horas após o tratamento com as soluções micelares DF contendo AITC e com AITC livre. Cada ponto representa as médias obtidas em três experimentos. p. 32
- Figura 8** Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) da linhagem RT4, 24 horas após o tratamento com as soluções micelares DF contendo AITC e com AITC livre. Cada ponto representa as médias obtidas em três experimentos. p. 33
- Figura 9** Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) da linhagem T24, 48 horas após o tratamento com as soluções micelares DF contendo AITC e com AITC livre. Cada ponto representa as médias obtidas em três experimentos. p. 35
- Figura 10** Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) da linhagem RT4, 48 horas após o tratamento com a solução micelar DF5 contendo AITC e com AITC livre. Cada ponto representa as médias obtidas em três experimentos. p. 36

**Figura 11** Porcentagem de colônias de células da linhagem T24, 15 dias após o tratamento com a solução micelar DF15 contendo AITC e com AITC livre. Cada coluna representa as médias obtidas em três experimentos. p. 38

**Figura 12** Porcentagem de colônias de células da linhagem RT4, 15 dias após o tratamento com a solução micelar DF15 contendo AITC e com AITC livre. Cada coluna representa as médias obtidas em três experimentos. p. 39

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Composição das formulações de soluções micelares contendo AITC.	p. 19
<b>Tabela 2</b>	Composição das formulações de soluções micelares utilizadas como controle.	p. 19
<b>Tabela 3</b>	Tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações obtidas pelo método de dispersão a frio (DF).	p. 26
<b>Tabela 4</b>	Tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações obtidas pelo método de reidratação do filme polimérico obtido por roto-evaporação (RFP).	p. 27
<b>Tabela 5</b>	Taxa de aumento no tamanho médio das micelas contendo AITC em relação às micelas sem AITC preparadas pelo mesmo método.	p. 28
<b>Tabela 6</b>	Quantificação de AITC na formulação final e a porcentagem de perda de AITC durante o preparo.	p. 30

## SUMÁRIO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE TABELAS .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	2
2. OBJETIVOS .....	5
2.1. Objetivo geral .....	5
2.2. Objetivos específicos .....	5
3. REVISÃO DA LITERATURA .....	7
3.1. Câncer, carcinogênese e tratamento .....	7
3.2. Câncer de bexiga .....	9
3.3. Alil isotiocianato .....	12
3.4. Nanoformulações .....	14
3.4.1. <i>Micelas poliméricas</i> .....	14
3.4.2. <i>Pluronic F127<sup>®</sup> (F127)</i> .....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	18
4.1. Materiais .....	18
4.2. Preparo das soluções micelares .....	18
4.2.1. <i>Preparo das soluções micelares pelo método de dispersão a frio (DF)</i> .....	18
4.2.2. <i>Preparo das soluções micelares pelo método de reidratação do filme polimérico obtido por roto-evaporação (RFP)</i> .....	20
4.2.3. <i>Preparo da solução de AITC livre</i> .....	20
4.3. Determinação do tamanho médio e potencial zeta das micelas nas formulações.....	20
4.4. Quantificação de AITC nas soluções micelares .....	21
4.5. Citotoxicidade e proliferação celular .....	21
4.6. Sobrevivência clonogênica .....	22
4.7. Análise estatística .....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
5.1. Preparo das soluções micelares .....	25
5.2. Determinação do tamanho médio e potencial zeta das micelas presentes nas formulações .....	26



5.3. Quantificação de AITC nas soluções micelares .....	29
5.4. Citotoxicidade e proliferação celular .....	31
5.5. Sobrevivência clonogênica .....	37
6. CONCLUSÃO .....	42
7. REFERÊNCIAS .....	44

## **1. INTRODUÇÃO**

---

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de bexiga é o nono tipo mais comum de câncer no mundo. De acordo com a mais recente estimativa mundial, em 2012, houve 430.000 novos casos deste tipo de câncer, sendo responsável por cerca de 165.000 mortes (GLOBOCAN, 2012). Seu tipo mais comum é o carcinoma de células uroteliais, um dos tumores mais caros por paciente, gerando um ônus econômico significativo para os sistemas de saúde (SVÁTEK *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, o estudo e a utilização de substâncias presentes em frutas, vegetais e outros produtos de origem natural têm se destacado, uma vez que têm sido demonstrado que diversas delas apresentam importante atividade antiproliferativa em células tumorais (SON *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2010; BHATTACHARYA *et al.*, 2012, SÁVIO *et al.*, 2014).

O alil isotiocianato (AITC), principal composto da semente de mostarda, tem sido extensivamente estudado por sua atividade antineoplásica. Vários autores têm estudado este seu potencial para o tratamento do câncer de bexiga. A principal razão para essas investigações é a alta biodisponibilidade do composto na urina, ou seja, quando uma dose oral dessa substância é administrada quase sua totalidade é eliminada por excreção renal passando pela bexiga. Enquanto o AITC permanece na bexiga, as células cancerígenas são expostas à substância, que é capaz de induzir bloqueio do ciclo celular e apoptose (MUNDAY *et al.*, 2008; GENG *et al.*, 2011).

Apesar de sua potente atividade antitumoral e relativo direcionamento de entrega na bexiga, o AITC pode ser potencialmente irritante por via oral (SIMONS *et al.*, 2003), além de poder causar irritação em outras mucosas e induzir reações cutâneas (GAUL, 1964). Portanto, ao se idealizar seu uso na clínica, é necessário o estudo de estratégias de formulação para contornar este problema, mantendo sua atividade no organismo.

Sistemas micelares têm sido bastante estudados para a administração de fármacos antineoplásicos, uma vez que, são capazes de aumentar a solubilidade de fármacos hidrofóbicos, característica de muitos agentes antitumorais, podem incorporar substâncias no seu núcleo hidrofóbico protegendo essas de inativação no organismo e evitam que o fármaco seja capturado pelo sistema fagocitário mononuclear, aumentando assim o tempo de circulação (KATAOKA *et al.*, 1993). Além disso, sistemas micelares, devido ao seu tamanho, permitem a entrega passiva da substância encapsulada no tumor, pelo efeito do

aumento de permeabilidade e retenção que ocorre no ambiente tumoral (MAEDA *et al.*, 2010; TORCHILIN, 2011). Outro ponto importante deste tipo de formulação seria sua possibilidade de uso pela via oral, que em contraste com a administração intravenosa, pode proporcionar uma exposição prolongada e contínua das células tumorais a uma concentração relativamente mais baixa e, portanto, mais segura da substância utilizada (BROMBERG, 2008).

Assim, tendo em vista o potencial do AITC como um agente antineoplásico e as vantagens da utilização de sistemas micelares como forma de administração dessa substância, no presente trabalho foram desenvolvidas soluções micelares de Pluronic<sup>®</sup> F127 contendo AITC e avaliou-se a atividade destas formulações em modelo celulares de tumores de bexiga.

## **2. OBJETIVOS**

---

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Desenvolver soluções micelares contendo AITC e avaliar *in vitro* a atividade antitumoral das formulações em culturas de células tumorais de bexiga das linhagens T24 e RT4.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Preparar soluções micelares contendo AITC utilizando o método de dispersão a frio (DF).
- Preparar soluções micelares contendo AITC utilizando o método de reidratação de filme polimérico obtido por rotoevaporação (RFP).
- Caracterizar as micelas contendo AITC em relação ao tamanho médio e carga superficial.
- Quantificar a quantidade de AITC nas soluções micelares por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a UV.
- Avaliar a viabilidade de células tumorais de bexiga T24 e RT4 tratadas com diferentes concentrações de soluções micelares contendo AITC.
- Avaliar os efeitos antiproliferativos das soluções micelares contendo AITC através do ensaio de sobrevivência clonogênica.

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

---

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. Câncer, carcinogênese e tratamento

Câncer é o nome genérico dado a várias doenças que têm em comum o crescimento descontrolado de células anormais, e que podem invadir tecidos e órgãos, espalhando-se para outras regiões do organismo, através de um processo denominado metástase (INCA, 2015).

De acordo com cálculos mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, 2013) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2012, houve 14,1 milhões de novos casos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes causadas por ele, em todo o mundo. Estimativas para feitas pela OMS mostram que, no ano 2030, serão esperados 27 milhões de casos incidentes, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média renda (OMS, 2015).

No Brasil, em 2014, ocorreram 223.700 mortes causadas por essa doença, o que corresponde a 16,9% do total de mortes nesse período (OMS, 2014), sendo a segunda principal causa de mortes em adultos (INCA, 2014). Baseado em cálculos estimados pelo Globocan, espera-se para o ano de 2020, 553.050 novos casos de câncer no país, excluindo-se deste número os casos de câncer de pele não melanoma.

A etiologia do câncer está relacionada com alterações em genes chamados protooncogenes, que em condições normais estão inativos. Quando uma alteração leva a ativação desses genes, eles se transformam em oncogenes, sendo estes os responsáveis pela transformação de células normais em células tumorais. No processo de carcinogênese ocorre também a inativação de genes supressores de tumor, como o gene *TP53*, e comprometimento de genes de reparo e de apoptose (INCA, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2005).

O processo de carcinogênese se dá lentamente e envolve vários estágios. A primeira etapa é a iniciação, na qual as células sofrem o efeito de um agente carcinogênico, conhecido como agente oncoiniciador ou simplesmente iniciador, que levará a alterações em alguns genes. Desta forma as células encontram-se iniciadas para a ação de um segundo grupo de agentes que atuará no próximo estágio, chamado de promoção. Neste



estágio, as células geneticamente alteradas sofrem a ação dos agentes cancerígenos promotores, chamados de oncopromotores. A célula iniciada é então transformada lenta e gradualmente em “célula maligna”, sendo necessário um contato longo e contínuo com o agente cancerígeno promotor. A interrupção deste estágio pode ocorrer se houver a suspensão do contato com o agente promotor. Por fim, a terceira etapa é a progressão, caracterizada pela multiplicação descontrolada, sendo um processo irreversível. Neste estágio o câncer já está instalado e evolui para o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (INCA, 2015; ALMEIDA *et al.*, 2005).

A manutenção e o acúmulo dessas células cancerosas formam os tumores malignos e elas também podem adquirir a capacidade de se desprenderem do tumor e de migrarem, podendo chegar a órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou, formando as metástases (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Existem três principais alternativas de tratamento para o câncer, sendo elas a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia (FOYE, SENGUPTA, 1996; MURAD, KATZ, 1995). A escolha do tratamento varia com a localização, a extensão e o tipo de câncer, podendo ser realizado sozinho ou em combinação.

Em casos nos quais não há metástase e dependendo de sua localização, a cirurgia pode levar à remoção de tumores com eficácia. A radioterapia é usada comumente em conjunto com a cirurgia para aumentar a eficiência do tratamento. Quando usada isoladamente, pode diminuir tumores grandes, além de diminuir a recorrência e a chance de metástase (MURAD, KATZ, 1995).

Já a quimioterapia consiste no uso de substâncias citotóxicas, administradas principalmente por via parenteral, tendo como foco principal destruir as células tumorais, preservando as normais (SALMONM, 1998). Porém, a maioria dos fármacos quimioterápicos age de forma não específica, danificando tanto células malignas quanto normais, em particular, as células de alto *turn-over*, como as gastrointestinais, as capilares e as do sistema imunológico, explicando-se, desta forma, alguns efeitos colaterais da quimioterapia, como náuseas, perda de cabelo e queda da imunidade. Assim, o uso de quimioterápicos exige que os benefícios sejam comparados à toxicidade, na procura de índices terapêuticos favoráveis (FOYE, SENGUPTA, 1996; MURAD, KATZ, 1995; SALMONM, 1998), o que nem sempre é possível.

### 3.2. Câncer de bexiga

O câncer de bexiga é o nono tipo de câncer mais comum no mundo, com as maiores taxas de incidência na Europa, nos Estados Unidos e no Egito. De acordo com as últimas estimativas mundiais, em 2012, ocorreram 430 mil novos casos deste tipo de câncer, sendo responsável por aproximadamente 165 mil óbitos no mundo (GLOBOCAN, 2012; BRAY *et al.*, 2013). No Brasil, o número de novos casos de câncer de bexiga estimado para o ano de 2016 é de 7.200 casos em homens e de 2.470 em mulheres (INCA, 2015).

Seu tipo mais comum é o carcinoma de células uroteliais, sendo um dos tumores mais caros por paciente, em razão das altas taxas de recorrência que exigem acompanhamento clínico e citopatológico de vigilância, gerando uma importante carga econômica para os sistemas de saúde (SVÁTEK *et al.*, 2014). Clinicamente é subdividido em câncer de bexiga não músculo invasivo e câncer de bexiga músculo invasivo.

As maiores incidências e prevalências do câncer de bexiga ocorrem a partir dos 60 anos de idade, sendo extremamente rara sua ocorrência em indivíduos com menos de 40 anos (MALATS, REAL, 2015).

Em relação ao número de casos por gênero, a média de incidência é de 3 a 4 vezes maior em homens do que em mulheres (OMS, 2014). A maior incidência de câncer de bexiga em homens se dá, principalmente, por causa da maior taxa de fumantes entre o sexo masculino. Porém, estudos em animais e em humanos têm mostrado que diferenças de metabolismo hepático relacionadas com o gênero e o efeito diferente entre andrógenos e estrogênios sobre a carcinogênese da bexiga também podem estar contribuindo para essas diferenças (ZHANG, 2013). Apesar de serem menos atingidas, mulheres geralmente apresentam tumores mais avançados e têm piores taxas de sobrevida que os homens (SHARIAT *et al.*, 2010).

Os principais fatores de risco estão relacionados com o hábito de fumar e com a exposição ocupacional a aminas aromáticas (WALLERAND *et al.*, 2005). Estudos apontam que a incidência dos carcinomas de células uroteliais está aumentando nos países em desenvolvimento, provavelmente, como resultado do aumento do número de fumantes (MALATS, REAL, 2015). Este hábito está relacionado com 50% a 65% dos casos de câncer de bexiga em homens e 20% a 35% em mulheres (FREEDMAN *et al.*, 2011). Além disso, pacientes fumantes diagnosticados com câncer de bexiga não músculo invasivo apresentam maiores taxas de recorrência após o primeiro tratamento quando comparados a

pacientes não fumantes (CRIVELLI *et al.*, 2014), mostrando que o cigarro está relacionado tanto com o aparecimento, quanto com o prognóstico do câncer de bexiga.

Estimativas apontam que aproximadamente 23,5% dos casos de câncer de bexiga estão relacionados à exposição ocupacional a algum agente carcinogênico (DELCLOS, LERNER, 2008). As aminas aromáticas, as quais a exposição ocorre principalmente em indústrias de corantes e tintas, são a maior causa ocupacional relacionada a esse tipo de câncer (MALATS, REAL, 2015). Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos gerados na queima de madeira para produção de carvão, nas operações de transporte e refinação do petróleo, na incineração de resíduos industriais e na pirólise da querosene para a formação de solventes orgânicos, também estão associadas com maior risco de câncer de bexiga (ROTA *et al.*, 2014).

As opções de tratamento para o câncer de bexiga seguem a linha dos tratamentos gerais para o câncer, que são cirurgia, radioterapia e quimioterapia, sendo que a escolha depende principalmente do grau de evolução da doença (INCA, 2015).

A cirurgia pode ser de três tipos, a ressecção transuretral, na qual apenas o tumor é removido, a cistotectomia segmentada, na qual é feito a retirada de uma parte da bexiga e a cistotectomia radical, que é a remoção completa da bexiga (INCA, 2015). A radioterapia pode ser realizada por duas formas: externa ou interna. A radioterapia externa, mais comum, consiste na irradiação do tumor com um feixe de radiação externo. Na radioterapia interna o material radioativo é colocado, por meio de instrumentos específicos, próximo à lesão tumoral. Quando a opção escolhida é a quimioterapia, esta pode ser sistêmica (via oral ou intravenosa), ou local, através da aplicação do agente quimioterápico diretamente na bexiga (INCA, 2015).

Desde 2006, das 126 liberações emitidas pelo FDA (Food and Drug Administration) para medicamentos hematológicos/oncológicos, nenhuma foi direcionada para o tratamento do câncer de bexiga, sendo as abordagens quimioterapêuticas fundamentadas em combinações introduzidas há mais de 30 anos (MARTIN-DOYLE, KWIATKOWSKI, 2015).

Grande parte dos cânceres de bexiga é diagnosticada numa fase inicial, quando ainda estão limitados ao urotélio e a lâmina própria, sem invasão muscular. Nestes casos, o tratamento de escolha geralmente é local. Algum tipo de terapia intravesical é utilizado rotineiramente após a ressecção destes tumores superficiais, visando reduzir o risco de recorrência (TEPLY, KIM, 2014). O agente mais utilizado nesses casos é o bacilo Calmette-Guerin (BCG), que age gerando uma resposta imune contra as células tumorais

residuais (REDELMAN-SIDI *et al.*, 2014). Quimioterapia intravesical também tem sido aplicada, utilizando fármacos como mitomicina, gemcitabina, tiotepa e valrubicina (BARLOW, BENSON, 2013).

Os casos de cânceres de bexiga músculo invasivo eram, na maioria das vezes, conduzidos para a remoção completa da bexiga, nódulos linfáticos e órgãos adjacentes (próstata e vesículas seminais em homens; útero, cérvix, trompas e ovários em mulheres). Entretanto, mesmo com essa medida drástica, as taxas de recorrência por metástase eram altas. Assim, começou a ser explorada a quimioterapia pré-operatória para melhorar os resultados clínicos dos pacientes (TEPLY, KIM, 2014). Evidências mostram que o melhor esquema quimioterápico nestes casos é a utilização de três ciclos de metotrexato, vinblastina, doxorrubicina e cisplatina, sendo este esquema conhecido como protocolo MVAC (GROSSMAN *et al.*, 2003). Existem outras combinações possíveis, as quais, em geral, contêm cisplatina como primeira escolha.

Nos casos invasivos, existe também a possibilidade do uso da quimioterapia após a cistectomia, mas essa abordagem ainda não tem seu papel bem definido, uma vez que alguns estudos mostraram resultados ora positivos, ora negativos (STOCKLE *et al.*, 1992; STOCKLE *et al.*, 1995). Além disso, a quimioterapia pós-operatória pode ser de difícil administração devido ao longo tempo de recuperação e as possíveis complicações cirúrgicas, que ocorrem em cerca de 64 % dos casos (SHABSIGH *et al.*, 2009).

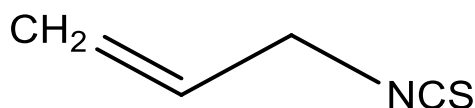
Os esquemas aplicados em casos pré-operatórios também são utilizados em casos mais avançados, quando há metástases. Entretanto, muitos pacientes com câncer de bexiga metastático possuem alguma contraindicação à cisplatina, sendo mais comum a insuficiência renal. Nestes casos, esquemas baseados em gemcitabina e carboplatina têm sido estudados como primeira escolha, uma vez que a carboplatina tem um perfil diferente de toxicidade, sendo mais bem tolerada do que a cisplatina por alguns pacientes (LINARDOU *et al.*, 2004; BAMIAS *et al.*, 2006).

Mesmo com pequenos avanços nos últimos anos em técnicas cirúrgicas, em terapia local e na quimioterapia sistêmica, que levaram a modestas melhorias no tratamento de casos músculo invasivo, o tratamento deste tipo de câncer ainda continua sendo um grande desafio, resultando em alta morbidade e mortalidade (TEPLY, KIM, 2014).

### 3.3. Alil isotiocianato

Alil isotiocianato (AITC), conhecido também como óleo essencial de mostarda, é um dos isotiocianatos mais comuns dentre os de ocorrência natural (KUSHAD *et al.*, 1999), sendo encontrado nos vegetais da família Cruciferae, como a couve, o repolho e a couve-flor (KUSHAD *et al.*, 1999; RUNGAPAMESTRY *et al.*, 2006), e de forma bastante abundante na mostarda, no wasabi e na raiz forte (UEMATSU *et al.*, 2002; SULTANA *et al.*, 2002). Nesses vegetais encontra-se naturalmente um glucosinolato chamado sinigrina. Quando ocorre um dano ao tecido vegetal, seja por lesões a planta durante colheita, seja pela preparação do alimento ou pela mastigação, a enzima mirosinase entra em contato com esse glucosinolato, causando sua hidrólise e produção do AITC (FENWICK *et al.*, 1983; BONES, ROSSITER, 1996).

**Figura 1:** Fórmula química estrutural do AITC (Fonte: A própria autora)



Dentre as atividades biológicas desta substância, sua atividade antitumoral tem sido bastante estudada. O AITC inibe a proliferação de várias linhagens de células cancerígenas humanas, com valores baixos de IC<sub>50</sub> e de forma independente do tecido de origem e até mesmo em células com resistência a drogas (ZHANG *et al.*, 2003; XIAO *et al.*, 2003; MUSK, JOHNSON, 1993; TANG, ZANG, 2004). Essa inibição da proliferação celular está relacionada com parada do ciclo celular em G1 ou G2/M e indução de apoptose (ZHANG, 2010). Além disso, essa substância inibe enzimas que estão relacionadas com a metástase, como algumas metaloproteinases da matriz celular (HWANG, LEE, 2006) e estimula processos de prevenção do câncer, como a acetilação de histonas (LEA *et al.*, 2001).

Além disso, alguns estudos tem mostrado que o AITC mostrou-se significativamente mais tóxico para as células cancerosas humanas da próstata (XIAO *et al.*, 2003), de cólon (MUSK, JOHNSON, 1993) e de bexiga (BHATTACHARYA *et al.*, 2010) do que para suas homólogas normais. O mecanismo para explicar essa seletividade ainda não é completamente compreendido. Entretanto, para o caso das células tumorais de bexiga, é provável que o AITC seja entregue mais prontamente a tecidos tumorais do que

aos tecidos normais, por estes possuírem junções intercelulares mais apertadas, espessamento da membrana apical e cobertura por uma camada de mucopolissacarídeo (LEWIS, 2010).

Sobre a relação do AITC e o câncer de bexiga, Bhattacharya e colaboradores (2010) mostraram que este composto é capaz de inibir, *in vitro*, a proliferação de linhagens celulares de carcinoma da bexiga (AY-27, derivada de tumor de bexiga murino e UM-UC-3, derivada de tumor de bexiga humano), com IC<sub>50</sub> de 3,0 µM, em média, e mostrou-se marcadamente menos tóxico para células epiteliais normais da bexiga (IC<sub>50</sub> de 69,4 µM). Além disso, os autores avaliaram os efeitos do AITC *in vivo* utilizando dois modelos de tumor, um modelo ortotópico simulando o câncer de bexiga e um modelo subcutâneo. O resultado observado foi que a administração oral de AITC (1 mg/kg/dia, durante três semanas) inibiu significativamente o desenvolvimento do câncer de bexiga e sua invasão muscular, mas foi ineficaz contra os enxertos subcutâneos das mesmas células tumorais nos animais, muito provavelmente pela alta biodisponibilidade do composto na urina, ou seja, a quase totalidade administrada por via oral é eliminada passando por esse órgão. (BHATTACHARYA *et al.*, 2010).

Sávio e colaboradores (2014), utilizando apenas linhagens de tumor de bexiga humano, T24 (grau 3, gene *TP53* mutado) e RT4 (grau 1, gene *TP53* selvagem), mostraram que o AITC provocou parada do ciclo celular, aumento das taxas de apoptose e aumento dos danos primários ao DNA de forma dependente do *status* do gene *TP53* (SÁVIO *et al.*, 2014), mostrando a importância das características genéticas da linhagem celular na resposta ao agente antineoplásico.

Além destes, outros trabalhos também mostraram o efeito inibidor do AITC em células ou modelos animais de tumor de bexiga (TANG, ZHANG, 2004; TANG *et al.*, 2008; GENG *et al.*, 2011). O AITC tem alta biodisponibilidade quando administrado por via oral, sendo que de 42 a 54% da dose oral administrada em humanos são eliminados na urina (SHAPIRO *et al.*, 1998). Estudos mostraram que, em roedores, a concentração média de AITC na urina é aproximadamente 10 vezes maior que a concentração média no sangue, após seu consumo (BOLLARD *et al.*, 1997). Esses dados ajudam a entender o porquê de tantos estudos com essa substância visando o tratamento do câncer de bexiga.

Assim, o AITC mostra-se como um agente altamente promissor para o tratamento do câncer de bexiga. Entretanto, sabe-se que essa substância pode ser potencialmente irritante por via oral (SIMONS *et al.*, 2003), justificando a necessidade de estudos para a

obtenção de uma formulação que contorne esse problema, mantendo ou até mesmo potencializando seus efeitos antitumorais.

### 3.4. Nanoformulações

A nanotecnologia consiste na criação e na manipulação de materiais em escala de tamanho nanométrico. Pesquisas recentes tem mostrado que a nanotecnologia tem e ainda terá uma grande contribuição na prevenção, tratamento e diagnóstico de muitas doenças por originar produtos com novas propriedades (MIRSA, ACHARYA, SAHOO, 2010).

Existem diversas formas farmacêuticas nanométricas utilizadas na vetorização de fármacos, sendo os mais conhecidos e estudados os lipossomas, as micelas e as nanopartículas, que incluem as nanocápsulas e as nanoesferas. Todas têm como foco a modulação da distribuição e o direcionamento da substância, associando-a a um sistema carreador apropriado, denominado vetor (PUISIEUX, ROBLOT-TREUPE, 1988). A necessidade de vetorização existe principalmente devido às enormes barreiras que uma molécula precisa superar até que atinja o local alvo dentro do organismo onde ela irá realizar o seu papel biológico.

Em relação ao desenvolvimento de formulações apropriadas para a quimioterapia do câncer, existem dois desafios principais que podem ser modulados pelo uso de nanoformulações. A primeira questão é que a maioria das substâncias com propriedades anticancerígenas são bastante hidrofóbicas, exigindo estratégias de solubilização para que o fármaco possa atingir uma concentração eficiente no local do tumor, sem que os agentes solubilizantes sejam tóxicos ao organismo. O outro ponto é que, devido a alta citotoxicidade, fármacos antineoplásicos precisam que a entrega seja extremamente seletiva no órgão ou tecido alvo, de forma a aperfeiçoar a eficiência e a segurança durante seu uso (KABANOV *et al.*, 2002; ALVAREZ-LORENZO *et al.*, 2011).

#### 3.4.1. Micelas poliméricas

As micelas poliméricas são auto agregados de copolímeros anfifílicos, constituídos por uma cadeia hidrofílica e uma cadeia hidrofóbica, nos quais a parte hidrofóbica forma um núcleo onde estará encapsulada a substância a ser carreada, sendo isolada do meio ambiente aquoso externo pela parte hidrofílica da molécula. Resumidamente, a parte exterior está relacionada com o comportamento farmacocinético *in vivo*, enquanto que o

núcleo interno é responsável pela capacidade de carrear substâncias, pela estabilidade e pelo perfil de liberação do componente encapsulado (GONG *et al.*, 2012). Assim, elas podem incorporar compostos de baixa solubilidade em água no seu núcleo hidrofóbico e protegê-los de inativação no meio biológico (KATAOKA *et al.*, 1993) e, se a sua superfície for apropriada, evitar a captura pelo sistema fagocitário mononuclear, aumentando o tempo de circulação da substância encapsulada (CHEN *et al.*, 2013).

Como revisado por Kabanov e colaboradores (2002), as micelas poliméricas têm sido avaliadas para diversas aplicações farmacêuticas, como, por exemplo, em sistemas de liberação de fármacos e de genes, e também, como veículos para agentes de contraste utilizados em diagnóstico por imagem (KABANOV *et al.*, 2002). Em comparação com outras nanoformulações, tais como lipossomas, nanopartículas e dendrímeros, as micelas possuem maior capacidade de carga e melhor estabilidade (GONG *et al.*, 2012).

O tamanho médio das micelas (geralmente menor que 100 nm) faz com que elas sejam grandes o suficiente para não extravasar das paredes dos vasos sanguíneos normais, e pequenas o suficiente para extravasar pelas paredes de vasos sanguíneos de tumores. Esta particularidade combinado com características fisiopatológicas de tecidos tumorais, tais como hipervascularidade, incompleta arquitetura vascular, secreção de fatores de permeabilidade vascular e ausência de drenagem linfática eficaz, conduz ao efeito de permeabilidade e retenção aumentada (MAEDA *et al.*, 2010; TORCHILIN, 2011), o que garante o direcionamento passivo das micelas ao local do tumor. Neste contexto, sistemas micelares são uma abordagem interessante para a vetorização de substâncias com potencial antineoplásico.

Além da capacidade de solubilização, do pequeno tamanho das partículas, do tempo aumentado de circulação, da entrega passiva e da facilidade de produção, sistemas micelares podem alterar a via de internalização de drogas e sua localização pós-entrada na célula, além de serem capazes de diminuir o efluxo pela glicoproteína-P, que está relacionado com resistência a drogas. Tais características podem levar a um mecanismo de ação diferente das drogas encapsuladas (MIKHAIL, ALLEN, 2009; KEDAR, 2010).

Outra importante vantagem do uso de micelas poliméricas na quimioterapia do câncer seria sua possibilidade de uso pela via oral. Em contraste com a administração intravenosa, que leva a um significativo aumento das concentrações dos fármacos na circulação sistêmica imediatamente após a administração, mas que fica abaixo do desejável no final do intervalo da dosagem, a quimioterapia oral pode proporcionar uma exposição prolongada e contínua das células tumorais a uma concentração relativamente mais baixa



e, portanto, mais segura de drogas anticâncer (BROMBERG, 2008). Além do potencial de melhorar a eficácia e reduzir a toxicidade, a quimioterapia por via oral apresenta bom custo-efetividade, em flexível esquema de dosagem, conveniente e, portanto, preferida pelos pacientes, resultando em uma melhor adesão e melhoria da qualidade de vida (LE LAY *et al.*, 2007).

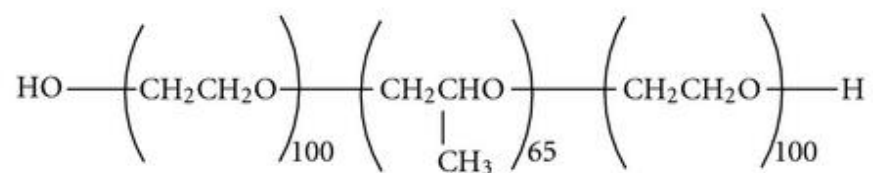
Algumas formulações micelares contendo fármacos antitumorais já se encontram em estudos de fase clínica. Dentre elas, formulações para administração de paclitaxel (KIM *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2007; SAIF *et al.*, 2008; HAMAGUCHI *et al.*, 2007), cisplatina (PLUMMER *et al.*, 2011) e doxorubicina (MATSUMURA *et al.*, 2004; DANSON *et al.*, 2004; VALLE *et al.*, 2010).

### 3.4.2. Pluronic<sup>®</sup> F127(F127)

Os Pluronics<sup>®</sup> são polímeros sintéticos anfifílicos que contém blocos hidrofílicos constituídos por óxido de etileno (OE) e blocos hidrofóbicos constituídos por óxido de propileno (OP), dispostos em uma estrutura tribloco do tipo OE-OP-OE. Eles chegaram ao mercado no final da década de 1950 e podem ser encontrados no estado sólido, líquido ou pasta, dependendo da proporção de OE e OP (DUMORTIER *et al.*, 2006). Os segmentos de OP formam um núcleo hidrofóbico, que serve como um microambiente para a incorporação de fármacos com mesma característica. A parte hidrofílica externa, formada pelo OE, auxilia na prevenção da agregação, da adsorção de proteínas e do reconhecimento pelo sistema fagocitário mononuclear. São pouco tóxicos e possuem fraco potencial de desencadear respostas imunológicas. Além disso, suas moléculas com peso molecular inferior a 15.000 Daltons são geralmente filtradas pelo rim e eliminadas na urina (ZHANG *et al.*, 2011).

O Pluronic<sup>®</sup> F127 (F127) é um tensoativo não iônico pertencente a esse grupo, com peso molecular em torno de 12.600 Daltons, sob a fórmula OE<sub>95-105</sub>-OP<sub>54-60</sub>-OE<sub>95-105</sub> (TAKÁTS *et al.*, 2001). Ele é classificado pelo FDA como inerte para diversos tipos de preparações, tais como intravenosas, inalatórias, oftálmicas, tópicas, soluções orais e suspensões (ROWE *et al.*, 2005). Na Figura 2 é apresentada a fórmula química estrutural do F127.

**Figura 2:** Fórmula química estrutural do Pluronic<sup>®</sup> F127 (Fonte: BUTT *et al.*, 2012)



Como revisado por Alvarez-Lorenzo e colaboradores (2011), vários trabalhos têm mostrado as possibilidades de formulações micelares constituídas pelo F127 para o encapsulamento de fármacos antitumorais, cujas melhorias observadas em relação aos fármacos livres estão relacionadas a características de sistemas micelares já citados (ALVAREZ-LORENZO *et al.*, 2011).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

---

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

F127, AITC, meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Penicilina G, Streptomicina e Tween 20 foram adquiridos da Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (St Louis, EUA). Acetonitrila, grau HPLC, foi adquirida de J. T. Baker<sup>®</sup>, (Xalostoc, México). Diclorometano foi adquirido da Impex<sup>®</sup> (Varginha, Brasil). Soro Fetal Bovino foi adquirido da Cultilab Ltd. (Campinas, Brasil). O kit Cell Proliferation II (XTT) foi adquirido da ROCHE Diagnostics<sup>®</sup> (Mannheim, Alemanha). Meio de cultura branco (DMEM sem fenol vermelho) foi adquirido da Invitrogen<sup>®</sup> (Carlsbad, EUA). Solução corante de Giemsa foi adquirida da Dinâmica (Diadema, Brasil).

Células de carcinoma urotelial humano da linhagem RT4 (tumor grau 1, com gene *TP53* selvagem) e da linhagem T24 (tumor grau 3, com mutação no gene *TP53*) foram adquiridas do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro e mantidas em DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL penicilina G, 100 U/mL streptomicina e mantidas a 37° C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### 4.2. Preparo das soluções micelares

A composição das soluções micelares contendo AITC, preparadas pelo método DF e pelo método RFP é mostrada na Tabela 1. A variação entre elas foi em relação à porcentagem de F127 utilizada. As composições das formulações sem o AITC (controles) são mostradas na Tabela 2.

**Tabela 1:** Composição das formulações de soluções micelares contendo AITC.

<b>Formulação</b>	<b>Pluronic® F127 (g)</b>	<b>AITC (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Água ultrapura (mL)</b>
<b>DF5 AITC</b>	0,5	12,2	9,487
<b>DF10 AITC</b>	1,0	12,2	8,987
<b>DF15 AITC</b>	1,5	12,2	8,487
<b>RFP5 AITC</b>	0,5	12,2	9,487
<b>RFP10 AITC</b>	1,0	12,2	8,987
<b>RFP15 AITC</b>	1,5	12,2	8,487

**Tabela 2:** Composição das formulações de soluções micelares utilizadas como controle.

<b>Formulação</b>	<b>Pluronic® F127 (g)</b>	<b>Água ultrapura (mL)</b>
<b>DF5</b>	0,5	9,5
<b>DF10</b>	1,0	9,0
<b>DF15</b>	1,5	8,5
<b>RFP5</b>	0,5	9,5
<b>RFP10</b>	1,0	9,0
<b>MDF15</b>	1,5	8,5

#### *4.2.1. Preparo das soluções micelares pelo método de dispersão a frio (DF)*

Uma quantidade precisamente pesada de F127 foi adicionada a um becker contendo água ultrapura, mantido em banho de gelo sob agitação magnética moderada até completa dispersão do polímero. A solução foi então mantida em geladeira por 24 horas. Posteriormente, o AITC foi adicionado e disperso sob agitação vigorosa usando agitador magnético a temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi realizado na preparação das formulações sem o AITC (controles). Todas as formulações foram mantidas em recipiente bem fechado até o momento do uso.

#### *4.2.2. Preparo das soluções micelares pelo método de reidratação do filme polimérico obtido por roto-evaporação (RFP)*

Uma quantidade precisamente pesada de F127 foi adicionada em um balão de fundo redondo e dissolvida em diclorometano. Após dissolução, o AITC foi adicionado à mistura. O solvente foi então completamente evaporado em rota-evaporador para se obter uma matriz sólida do AITC com o polímero. Os balões com o filme polimérico foram fechados com papel alumínio e deixados em repouso a temperatura ambiente *overnight* para evaporação de qualquer resíduo de diclorometano. Posteriormente, o filme foi resuspendido com água ultrapura sob agitação em vórtex até que todo ele se soltasse das paredes do balão. O mesmo procedimento foi utilizado na preparação das formulações controle sem o AITC (controles). Todas as formulações foram mantidas em recipiente bem fechado até o momento do uso.

#### *4.2.3. Preparo da solução de AITC livre*

O AITC foi diluído em 2% de tween 20 no momento do uso. Pipetou-se 1,22 $\mu$ L de AITC e adicionou-se a uma mistura de 20 $\mu$ L de tween 20 e 978,78 $\mu$ L de água ultrapura. Agitou-se em vórtex até a homogeneização.

### **4.3. Determinação do tamanho médio e potencial zeta das micelas nas formulações**

A distribuição de tamanho e o tamanho médio das micelas foram determinados a partir da espectroscopia de correlação de fótons, mais conhecida como espalhamento de luz dinâmico, utilizando o equipamento Zetasizer (Malvern, modelo Nano ZS). As amostras foram diluídas convenientemente com água ultrapura e adicionados em cubeta de quartzo. As leituras foram realizadas a 25°C, em triplicata e as medidas foram efetuadas com ângulo de espalhamento incidente de 90°. Os resultados foram expressos como diâmetro médio das partículas e índice de polidispersão (IP).

O potencial zeta foi determinado pelas medidas de mobilidade eletroforética das micelas em suspensão. O equipamento utilizado, Zetasizer (Malvern, modelo Nano ZS), dispõe de uma célula contendo eletrodos de cargas opostas, um em cada terminal de um tubo em forma de "U", onde as amostras convenientemente diluídas foram adicionadas

para análise. As leituras foram realizadas a 25°C, em triplicata e os resultados foram expressos em milivolts (mV).

#### **4.4. Quantificação de AITC nas soluções micelares**

O método cromatográfico utilizado foi previamente descrito por Pelosi e colaboradores (PELOSI *et al.*, 2014). O equipamento utilizado foi Waters e2695 acoplado a detector UV/Vis Waters 2485. As amostras foram lidas em comprimento de onda de 242 nm. A fase móvel composta por acetonitrila e água ultrapura (70:30) foi eluída num fluxo de 1,0 mL/min. em coluna C18 (Phenomenex®, Luna 5 $\mu$  (2) 100Å 150x4,60mm) à temperatura de 25°C. O volume de injeção da amostra foi de 25  $\mu$ L e o tempo de corrida foi de 8,5 minutos.

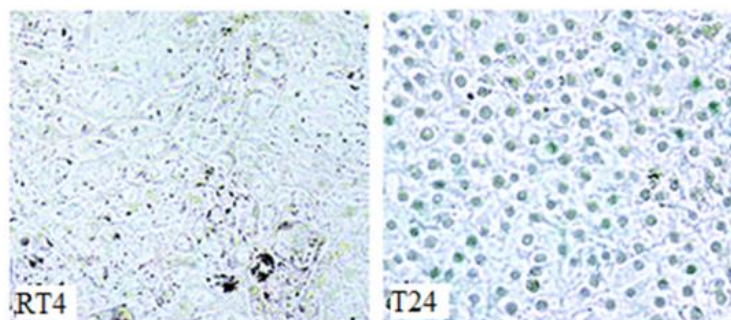
Para avaliar a linearidade do método analítico utilizado, antes da análise das amostras das formulações, foram feitas leituras de padrões de AITC nas concentrações de 0,065 a 6,5  $\mu$ M. Para a quantificação do AITC nas formulações, as amostras foram previamente diluídas em acetonitrila e quantificadas pelo método descrito acima. A partir das áreas dos picos obtidos pelas diferentes concentrações de padrão fez-se uma regressão linear e definiu-se a equação da reta, a partir da qual se calculou a quantidade de AITC presente nas formulações preparadas pelos métodos DF e RFP.

#### **4.5. Citotoxicidade e Proliferação Celular**

A citotoxicidade e a inibição da proliferação celular foram avaliadas utilizando o kit Cell Proliferation II (XTT). As células foram semeadas em placas de 98 poços ( $1 \times 10^4$  e  $1,5 \times 10^4$  células/poço para T24 e RT4, respectivamente). As células da linhagem RT4 são menores que as células da linhagem T24, como pode ser observado na Figura 3, por isso a diferença nas quantidades.

### Figura 3: Morfologia das células das linhagens RT4 e T24

(Fonte: adaptado de IMANI *et al.*, 2015)



Depois de 24 horas, as células foram tratadas com diferentes concentrações das formulações DF contendo AITC durante três horas. As concentrações utilizadas e o tempo de tratamento foram definidos com base no trabalho de Sávio e colaboradores (2014). Células tratadas com AITC livre e com soluções micelares sem AITC foram utilizadas como controle. Três horas depois da incubação, as células foram lavadas com solução de Hanks (0,4g de KCl; 0,06g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,04g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,35g de  $\text{NaHCO}_3$ ; 1g de glicose e 8g de NaCl em 1L de água). Depois da lavagem, meio de cultura novo foi colocado e as células foram incubadas novamente por 21 (para citotoxicidade) e 45 horas (para proliferação celular), em ensaios independentes.

No momento da leitura, meio de cultura branco foi colocado nos poços e posteriormente foram adicionados 12  $\mu\text{L}$  da solução teste de XTT (50 partes XTT solução *labeling*: 1 parte reagente *electron-coupling*) em cada poço e a absorbância medida a 492 e 690 nm depois de aproximadamente 40 minutos. Os valores de leitura das absorbâncias são proporcionais à quantidade de células viáveis. Os testes foram conduzidos em triplicata. O cálculo utilizado para apresentação dos resultados foi:

% de células viáveis = (média das absorbâncias / média das absorbâncias do controle) \*100

#### 4.6. Sobrevivência Clonogênica

Para avaliar a capacidade clonogênica,  $1 \times 10^6$  células das linhagens RT4 e T24 foram plaqueadas em frascos de cultura com 25  $\text{cm}^3$ . Após 24 horas, as células foram tratadas com a formulação DF15 contendo AITC, nas concentrações 0,005; 0,0825 e 0,25  $\mu\text{M}$  durante três horas. Células tratadas com AITC livre e com a formulação DF15 sem



AITC foram utilizadas como controle. As culturas foram lavadas com solução de Hanks, tripsinizadas, e aproximadamente 1000 células foram plaqueadas em frascos de cultura de 25 cm<sup>3</sup> e cresceram durante 15 dias em estufa de CO<sub>2</sub> para formação de colônias. As células foram coradas com Giemsa e o número de colônias com 50 ou mais células foram contadas. Os testes foram conduzidos em triplicata. O cálculo utilizado para apresentação dos resultados foi:

$$\% \text{ de colônias} = (\text{média do n}^\circ \text{ de colônias} / \text{média do n}^\circ \text{ de colônias do controle}) * 100$$

#### **4.7. Análise estatística**

O software GraphPad Prism 5 foi utilizado na análise estatística dos resultados dos testes de citotoxicidade, proliferação celular e sobrevivência clonogênica. Como os dados apresentaram distribuição normal, utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey. Adotou-se o intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas significativas para  $P < 0,05$ .

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

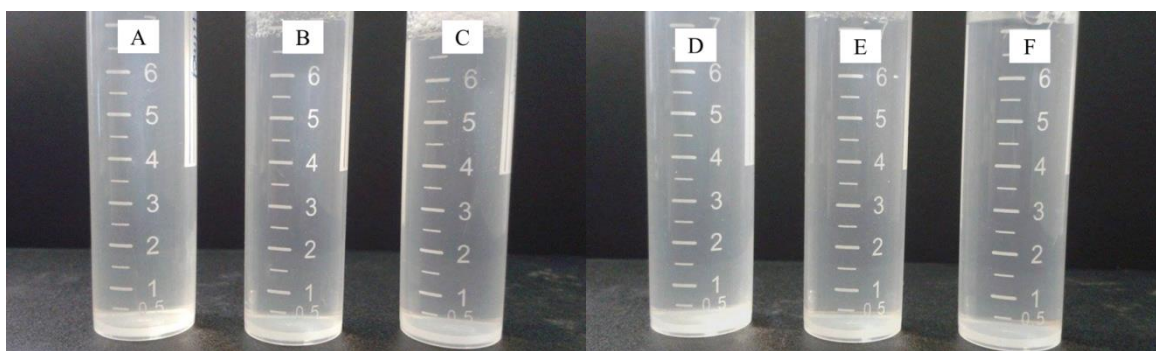
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Preparo das soluções micelares

As soluções micelares foram preparadas pelos métodos DF e RFP. Os dois métodos foram de fácil execução em escala laboratorial, entretanto o tempo gasto na preparação das formulações pelo método RFP foi superior ao tempo gasto pelo método DF.

Na Figura 4 é observado o aspecto visual das formulações contendo AITC obtidas pelos dois métodos de preparação. Percebe-se que as formulações obtidas por ambos os métodos se apresentaram com aspecto límpido.

**Figura 4:** Fotografia representando o aspecto visual das formulações preparadas pelos métodos DF e RFP.



**Legenda:** Formulações de F127 a 5% (A), 10% (B) e 15% (C) preparadas pelo método DF; Formulação de F127 a 5% (D), 10% (E) e 15% (F) preparadas pelo método RFP.

É importante salientar que durante o preparo das formulações pelo método DF, ocorreu um aumento na viscosidade após a adição de AITC na formulação de F127 a 15%, sendo necessário agitar o béquer em banho de gelo durante alguns minutos.

O F127 possui a capacidade de formar soluções aquosas a baixas temperaturas, transformando-se em géis em temperaturas superiores a 25°C, quando em concentrações maiores que 20% (SCHMOLKA, 1991). Sabe-se que a transição sol-gel é dependente da temperatura, da concentração do polímero e das interações formadas entre os segmentos do copolímero tri-bloco (JUHASZ *et al.*, 1989). À medida que a temperatura aumenta as porções hidrofóbicas (OP) se aproximam devido ao processo de desidratação, sendo o núcleo hidrofóbico circundado pelas porções hidrofílicas (OE) da cadeia (DUMORTIER *et al.*, 2006). A formação de gel em uma concentração menor do que especificado na

literatura pode ter ocorrido pela presença do AITC, que provavelmente ao se acomodar na parte hidrofóbica da micela, favoreceu o processo de desidratação.

## 5.2. Determinação do tamanho médio e potencial zeta das micelas presentes nas formulações

Os resultados da análise do tamanho médio e do potencial zeta das formulações obtidas pelo método DF é apresentado na Tabela 3. Os resultados da análise de tamanho são fornecidos como diâmetro médio das partículas e índice de polidispersão (IP). Os resultados dos valores do potencial zeta são fornecidos em milivolts (mV).

**Tabela 3:** Tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações obtidas pelo método de dispersão a frio (DF).

	Tamanho médio $\pm$ dp (nm)	IP $\pm$ dp	Potencial zeta $\pm$ dp (mV)
<b>DF5 AITC</b>	127,9 $\pm$ 19,12	0,34 $\pm$ 0,07	- 4,54 $\pm$ 0,54
<b>DF10 AITC</b>	44,7 $\pm$ 6,18	0,65 $\pm$ 0,07	- 4,81 $\pm$ 2,31
<b>DF15 AITC</b>	88,1 $\pm$ 25,46	0,28 $\pm$ 0,01	- 10,80 $\pm$ 5,13
<b>DF5</b>	28,8 $\pm$ 22,05	0,69 $\pm$ 0,38	- 29,70 $\pm$ 6,17
<b>DF10</b>	5,3 $\pm$ 0,27	0,42 $\pm$ 0,03	- 11,20 $\pm$ 4,64
<b>DF15</b>	6,3 $\pm$ 3,19	0,27 $\pm$ 0,11	- 12,30 $\pm$ 5,14

Onde: **IP**, índice de polidispersão; **dp**, desvio padrão; n = 3.

É possível observar na Tabela 3 que todas as formulações DF AITC apresentaram tamanhos de partículas/micelas maiores do que a das formulações DF (sem a adição de AITC). Este aumento no tamanho das micelas após a adição de AITC sugere que o fármaco esteja sendo particionado para a parte hidrofóbica das micelas, aumentando o volume destas, e, por conseguinte, o tamanho médio.

O IP fornece informações sobre a homogeneidade da população de partículas presentes na formulação em relação ao diâmetro das mesmas. Valores de IP abaixo de 0,3 caracterizam a formulação como monodispersa e valores maiores caracterizam como polidispersa (ZHANG, KOSARAJU, 2007). A partir desse parâmetro, formulações podem

ser caracterizadas como monodispersas se apresentarem uma faixa estreita de distribuição de tamanho, ou polidispersas, se a faixa de distribuição de tamanho for ampla. Nos resultados apresentados na Tabela 3 é possível observar que, em presença ou ausência de AITC, as formulações DF5 e DF10 apresentaram-se polidispersas enquanto a DF15 apresentou-se monodispersa.

O potencial zeta representa a carga presente na superfície das micelas. Ele pode refletir características dos materiais que formam a superfície da partícula ou se existe a presença de moléculas com cargas localizadas na interface. Além disso, serve como parâmetro de avaliação de estabilidade física de sistemas coloidais, uma vez que altos valores de potencial zeta, em módulo, geram forças repulsivas que tendem a evitar a agregação das partículas (MARTINI, 2005; ROLAND *et al.*, 2003).

Na Tabela 3 é observado que as formulações DF AITC apresentaram valores de potencial zeta negativos e menores em módulo do que as formulações preparadas pelo mesmo método sem AITC.

Na Tabela 4 são apresentados os resultados da análise do tamanho médio e do potencial zeta das formulações obtidas pelo método RFP.

**Tabela 4:** Tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações obtidas pelo método de reidratação do filme polimérico obtido por roto-evaporação (RFP).

	<b>Tamanho médio <math>\pm</math> dp (nm)</b>	<b>IP <math>\pm</math> dp</b>	<b>Potencial zeta <math>\pm</math> dp (mV)</b>
<b>RPF5 AITC</b>	24,9 $\pm$ 11,85	0,63 $\pm$ 0,17	- 35,50 $\pm$ 9,49
<b>RFP10 AITC</b>	8,6 $\pm$ 3,79	0,36 $\pm$ 0,13	- 14,80 $\pm$ 6,96
<b>RFP15 AITC</b>	12,6 $\pm$ 6,01	0,25 $\pm$ 0,05	- 13,80 $\pm$ 3,24
<b>RFP5</b>	13,0 $\pm$ 3,82	0,45 $\pm$ 0,11	-38,10 $\pm$ 2,96
<b>RFP10</b>	13,3 $\pm$ 1,02	0,71 $\pm$ 0,03	- 25,10 $\pm$ 3,08
<b>RFP15</b>	7,2 $\pm$ 1,41	0,48 $\pm$ 0,08	- 19,20 $\pm$ 1,39

Onde: **IP**, índice de polidispersão; **dp**, desvio padrão; n = 3.

Na Tabela 4 é possível observar que a adição de AITC não causou aumento expressivo no tamanho médio das micelas preparadas pelo método RFP, sendo que todas as formulações, independentes da concentração de F127, apresentaram tamanho médio abaixo de 25 nm. Em relação ao índice de polidispersão, observa-se na Tabela 4 que as

formulações RFP5 AITC e RFP10 AITC também se apresentaram polidispersas enquanto a formulação RFP15 AITC se apresentou monodispersa. Por outro lado, as formulações RFP5, RFP10 e RFP15 (preparadas sem a adição de AITC) se apresentaram polidispersas.

Em relação ao potencial zeta, na Tabela 4 se observa que as formulações contendo AITC apresentaram valores negativos e muito próximos dos valores observados para as formulações sem AITC.

Na comparação dos métodos de preparação de micelas de F127 contendo AITC pode-se inferir que as micelas produzidas pelo método DF apresentaram tamanho médio maior e potencial zeta menores em módulo do que as micelas produzidas pelo método RFP, enquanto o IP das micelas produzidas pelos dois métodos foi dependente da concentração do polímero, sendo que só na concentração de F127 a 15% foram produzidas micelas monodispersas, independente do método de preparação usado.

Na Tabela 5 é apresentada a taxa de aumento no tamanho médio das micelas contendo AITC em relação às micelas sem AITC preparadas pelo mesmo método.

**Tabela 5:** Taxa de aumento no tamanho médio das micelas contendo AITC em relação às micelas sem AITC preparadas pelo mesmo método.

<b>Formulação</b>	<b>Taxa de aumento de tamanho médio = micelas AITC/micelas vazias (vezes)</b>
<b>DF5</b>	4,44
<b>DF10</b>	8,35
<b>DF15</b>	14,05
<b>RFP5</b>	1,91
<b>RFP10</b>	0,64
<b>RFP15</b>	1,75

É possível observar que o tamanho médio das micelas preparadas pelo método DF aumentou de 4 a 14 vezes após adição de AITC, e que este aumento foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de F127. Por outro lado, nas micelas preparadas pelo método RFP, esta relação de tamanho pareceu não ser influenciada pela adição de AITC e pela concentração de F127.

Sob a perspectiva de administração de uma substância, a análise do tamanho das micelas é particularmente importante (KABANOV, ALAKHOV, 2002). Variações de tamanho dentro da escala nanométrica poderão afetar fortemente a circulação sanguínea, o

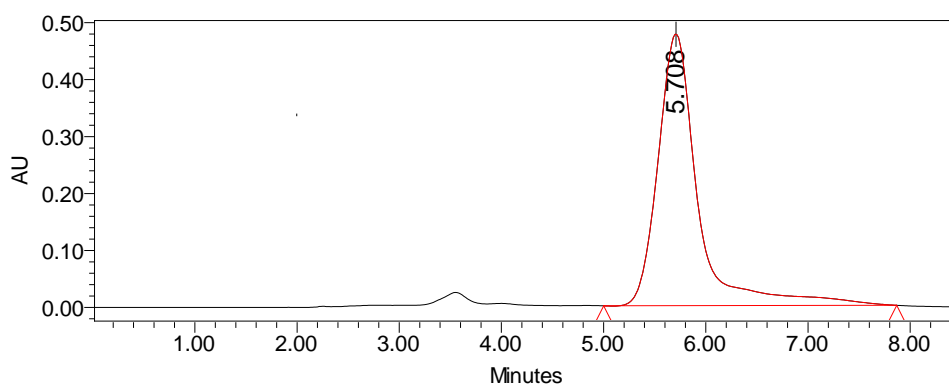
tempo e a biodisponibilidade das partículas dentro do corpo (KONG *et al.*, 2000; STOLNIK *et al.*, 1995; HAWLEY *et al.*, 1995).

Assim o tamanho das micelas obtidas pode ser outra vantagem para o possível uso dessas formulações no tratamento do câncer. Durante o crescimento de um tumor ocorre à indução do desenvolvimento de novos vasos, processo chamado de angiogênese. Esses vasos geralmente são caracterizados por um endotélio descontínuo, com grandes fenestrações de 200-780 nm (HOBBS *et al.*, 1998) permitindo a passagem de nanopartículas, diferente dos vasos sanguíneos de tecidos saudáveis, que possuem fenestrações menores. O tamanho desejável de um nanocarreador para o tratamento do câncer seria entre 70 e 200 nm (STORM *et al.*, 1995), logo as formulações DF5 e DF15, contendo AITC, atenderiam esse requisito.

### 5.3. Quantificação de AITC nas soluções micelares

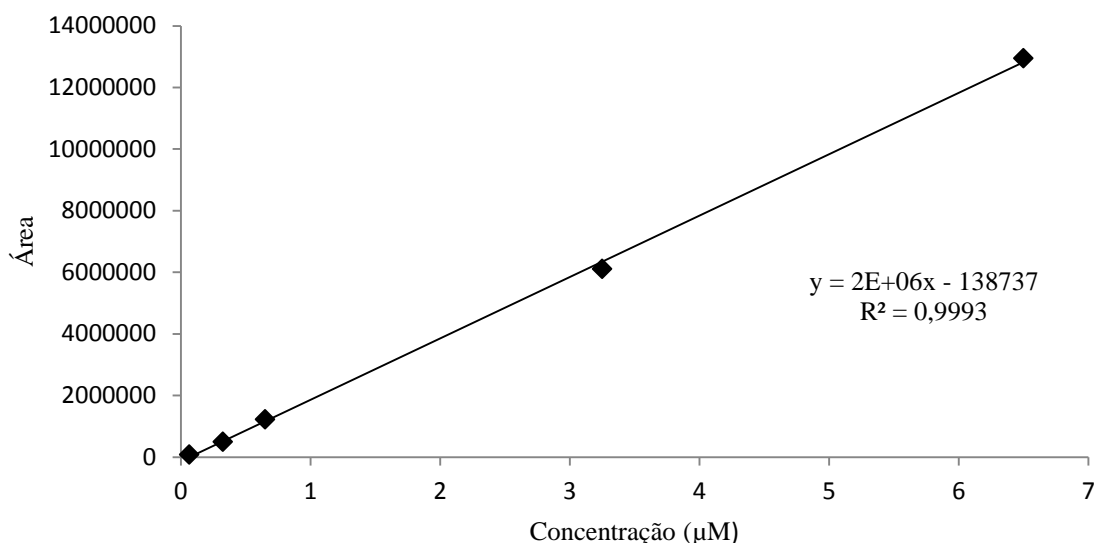
A Figura 5 representa um cromatograma de AITC obtido a partir de uma solução padrão. Como observado, o tempo de retenção do AITC nas condições cromatográficas da análise foi entorno de 5,7 minutos.

**Figura 5:** Cromatograma de um padrão de AITC



A Figura 6 representa a curva analítica empregada na quantificação do AITC. O valor do coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ) da regressão linear foi igual a 0,9993, indicando validade da regressão.

**Figura 6:** Curva analítica utilizada no método de quantificação de AITC



Na Tabela 6 é apresentado o resultado da quantificação de AITC nas formulações preparadas pelos métodos DF e RFP, calculado a partir da equação da reta obtida da curva analítica apresentada acima (Figura 6), e a porcentagem de AITC encontrado na formulação ao final do processo de preparo.

**Tabela 6:** Quantificação de AITC na formulação final e a porcentagem de perda de AITC durante o preparo.

	Concentração inicial de AITC (µM)	Concentração final de AITC (µM)	% de AITC remanescente
<b>DF5</b>	2,00	1,93	96,5%
<b>DF10</b>	2,00	1,94	97,0%
<b>DF15</b>	2,00	1,98	99,0%
<b>RFP5</b>	2,00	0,19	9,5%
<b>RFP10</b>	2,00	0,34	17,0%
<b>RFP15</b>	2,00	0,49	24,5%

Os resultados da quantificação de AITC na formulação preparada pelo método DF mostraram que mais de 96,5% do AITC adicionado no início da preparação estava presente na formulação ao final do processo. Também foi observado que a quantidade de AITC



retida nas formulações DF aumentou com o aumento da concentração de F127 na formulação, embora a diferença tenha sido pequena.

Entretanto, quando as formulações foram preparadas pelo método RFP, a quantidade de AITC que permaneceu na formulação variou de 9,5% a 24,5%. Nas formulações obtidas pelo método RFP ficou evidente que a percentagem de AITC retida na formulação foi diretamente proporcional a concentração de F127 usado no preparo da formulação.

AITC é uma substância volátil, desta forma, durante o preparo das formulações pode ter ocorrido a volatilização e a consequente perda do fármaco. Este fenômeno parece ter sido mais intenso no método RFP durante a etapa de evaporação do solvente orgânico.

Esses resultados estão em acordo com os resultados de tamanho médio das micelas observados pelos diferentes métodos de preparação, confirmando a hipótese de que houve perda significativa de AITC durante a preparação das formulações pelo método RFP.

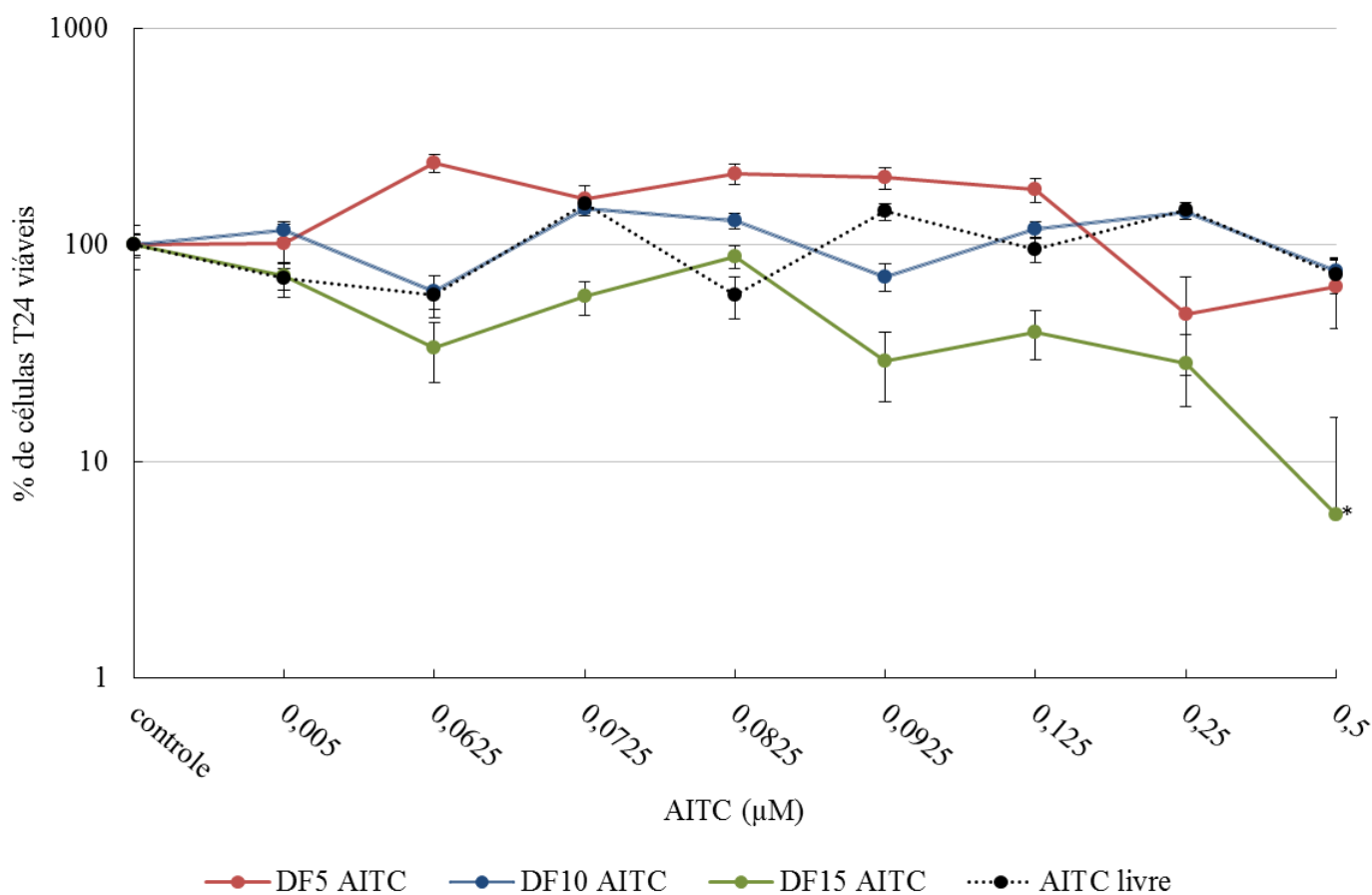
Assim, sugere-se que a preparação de soluções micelares de AITC pelo método RFP não foi viável, devido a perda do fármaco que ocorreu durante a preparação das formulações. Além disso, outro fator importante a ser considerado e já mencionado é o tempo gasto na preparação das formulações pelo método RFP, que foi superior ao tempo gasto pelo método DF. Assim, nos ensaios de citotoxicidade e proliferação celular foram utilizadas apenas as formulações preparadas pelo método DF.

#### **5.4. Citotoxicidade e proliferação celular**

Neste trabalho, a citotoxicidade e a inibição da proliferação celular das formulações de AITC preparadas pelo método DF em células das linhagens T24 e RT4 foram avaliadas 24 e 48 horas após o início do tratamento, respectivamente. O ensaio de XTT utilizado para avaliação da viabilidade celular baseia-se na atividade mitocondrial.

O resultado da avaliação da citotoxicidade das formulações preparadas pelo método DF em células das linhagens T24, 24 horas pós-tratamento, são mostrados na Figura 7. É possível observar que, após 24 horas do tratamento, houve uma redução significativa da viabilidade celular nas células T24 tratadas com a formulação DF15 AITC na maior concentração testada (0,5µM). Por outro lado, nenhuma redução significativa na viabilidade das células tratadas com o AITC livre foi observada.

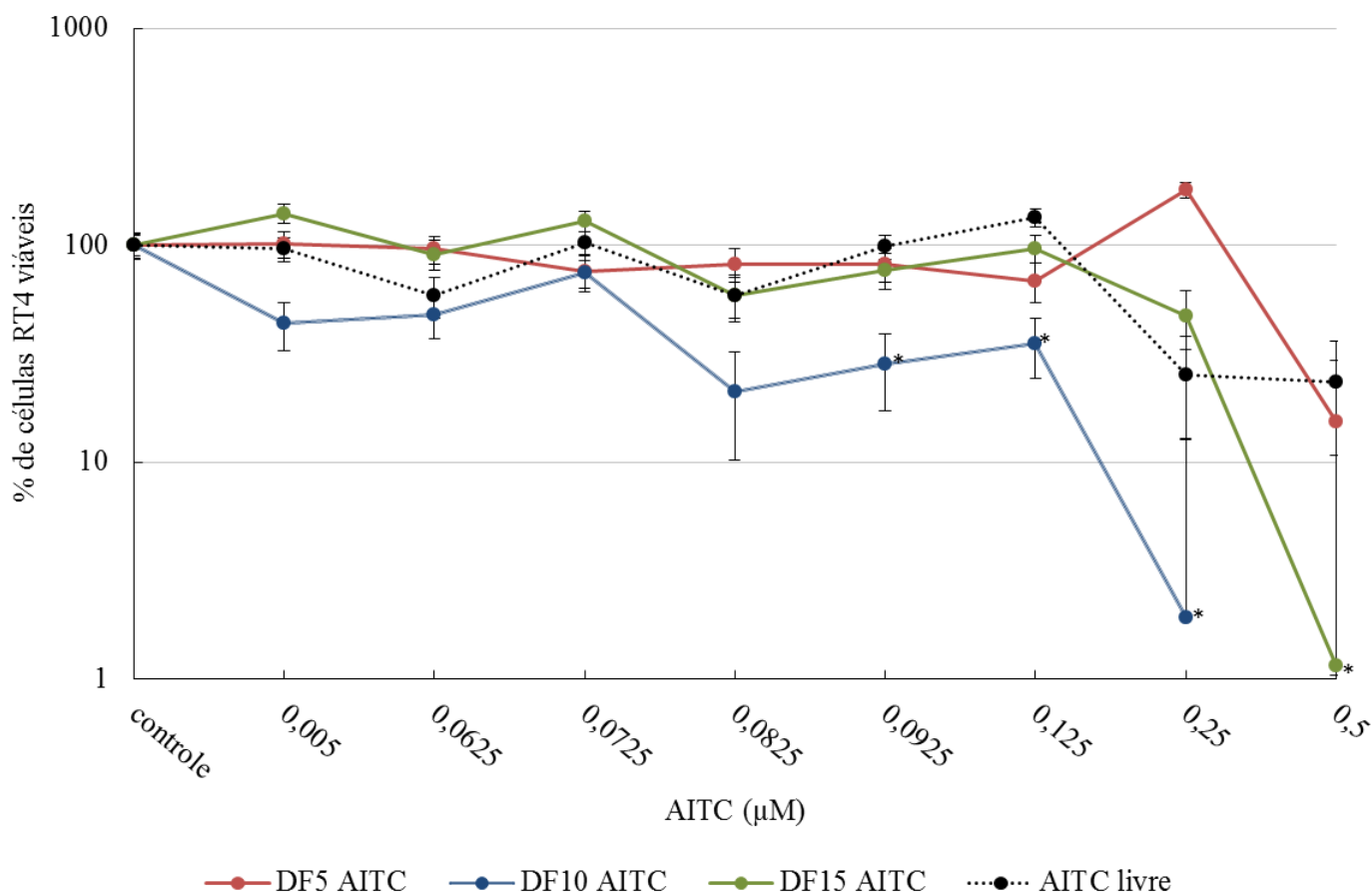
**Figura 7:** Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) da linhagem T24, 24 horas após o tratamento com as soluções micelares DF contendo AITC e com AITC livre. Cada ponto representa as médias obtidas em três experimentos.



\*  $p < 0,05$  em relação ao controle (excipientes da formulação).

Na Figura 8 são apresentados os resultados da avaliação da citotoxicidade das formulações preparadas pelo método DF em células das linhagens RT4, 24 horas pós-tratamento. Nas células da linhagem RT4 também foi observada uma redução significativa da viabilidade celular nas células tratadas com a formulação DF15 AITC na maior concentração testada ( $0,5\mu\text{M}$ ). Além disso, foram observadas reduções significativas na viabilidade das células tratadas com a formulação DF10 AITC nas concentrações  $0,0925$ ;  $0,125$ ;  $0,25$  e  $0,5\mu\text{M}$  (o ponto correspondente a última concentração não é mostrado na figura devido a escala logarítmica). Adicionalmente, nenhuma redução significativa na viabilidade das células tratadas com o AITC livre foi observada.

**Figura 8:** Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) da linhagem RT4, 24 horas após o tratamento com as soluções micelares DF contendo AITC e com AITC livre. Cada ponto representa as médias obtidas em três experimentos.



\*  $p < 0,05$  em relação ao controle (excipientes da formulação).

Com base nestes resultados, podemos observar que as formulações micelares de F127 a 10 e 15% contendo AITC obtidas pelo método DF foram capazes de potencializar o efeito citotóxico do fármaco nas linhagens celulares avaliadas 24 horas após o tratamento, uma vez que, nenhuma redução significativa na viabilidade das células tratadas com o AITC livre foi encontrada.

Sugere-se que o AITC, uma substância hidrofóbica, foi mais bem disperso no meio de cultura e capturado pelas células quando formulado em F127. A capacidade das micelas poliméricas em aumentar a solubilidade aquosa é devido ao seu núcleo central hidrofóbico que proporciona um microambiente adequado para acomodar substâncias hidrofóbicas (BROMBERG, 2002).

Barreiro-Iglesias e colaboradores (2004) mostraram que a solubilidade da camptotecina, um alcaloide obtido da *Camptotheca acuminata* e com considerável atividade antitumoral, em soluções micelares compostas por F127 foi cerca de 3 a 4 vezes maior que sua solubilidade em água, devido à incorporação desta no núcleo da micela (BARREIRO-IGLESIAS *et al.*, 2004).

Chen e colaboradores (2013) também encontraram uma potencialização *in vitro* da citotoxicidade de uma substância ao ser incorporada a micelas poliméricas. Micelas constituídas de F127 e P105 (outro polímero da família dos Pluronic<sup>®</sup>) incorporando o fármaco metotrexato foram mais citotóxicas para células tumorais da linhagem KB (células de carcinoma epidermóide oral humano) do que o fármaco livre. Os autores sugeriram que os polímeros utilizados possam ter atuado como quimiossensibilizadores, potencializando os efeitos citotóxicos do fármaco utilizado (CHEN *et al.*, 2013).

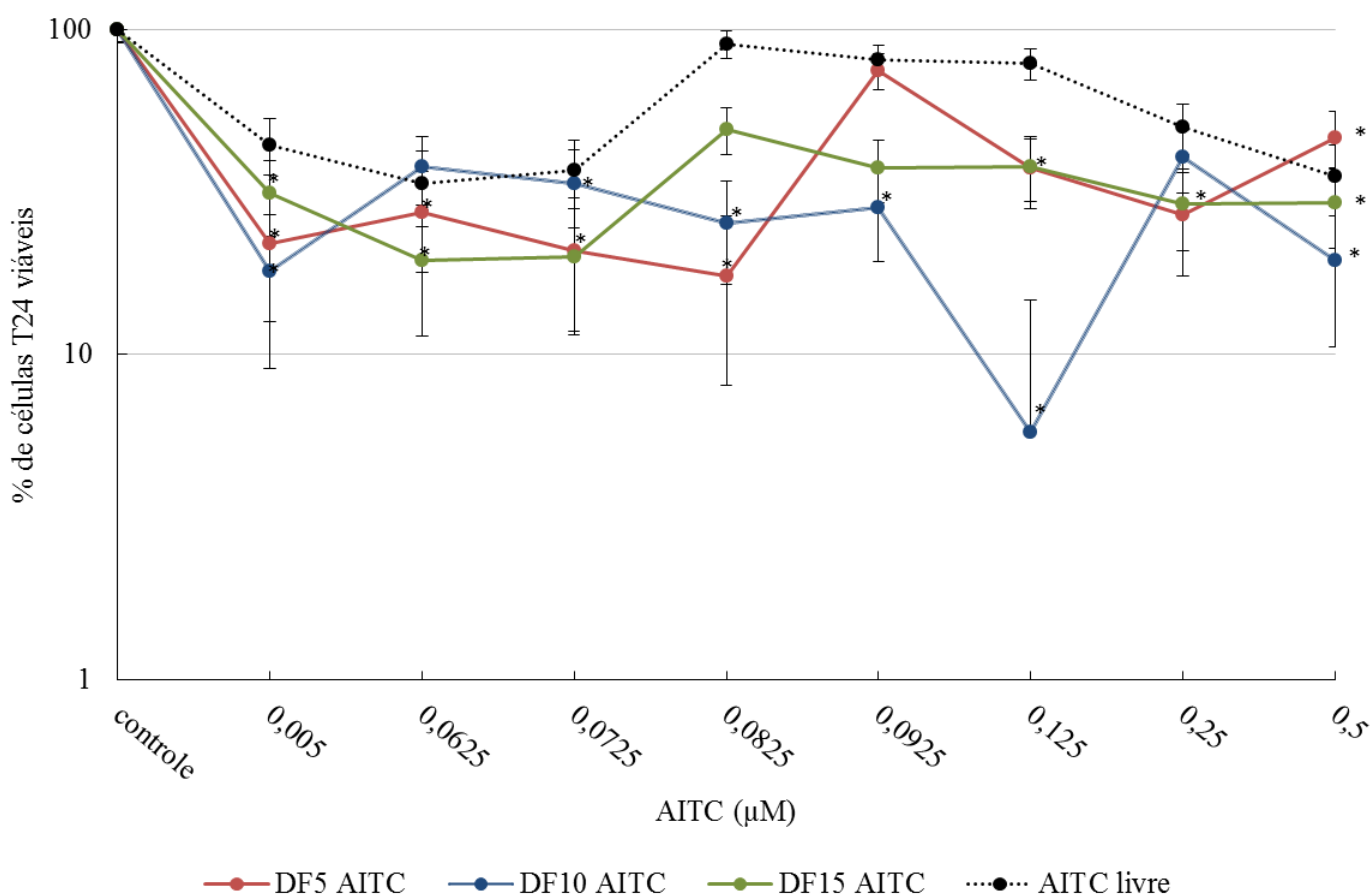
Outra observação importante foi que concentrações menores foram mais citotóxicas para as células RT4 do que para as células T24, 24 horas após o tratamento. As células da linhagem celular T24 possuem uma mutação no gene *TP53*, que é essencial no ponto de checagem da fase G1 do ciclo celular e está envolvido na resposta de tumores a várias drogas anticancerígenas (SALEM *et al.*, 2012; HILL *et al.*, 2013; VALDEZ *et al.*, 2013; SÁVIO *et al.*, 2014). As células da linhagem celular RT4 são selvagens para esse gene.

A influência de mutações em *TP53* nas respostas celulares a quimioterapia é ainda mal compreendida, pois é dependente de uma complexa cascata de sinalização. Entretanto, hipoteticamente, células carregando o gene *TP53* mutado são mais resistentes a quimioterápicos, devido ao papel que este gene desempenha no controle da apoptose (FENG *et al.*, 2000; HOFSETH *et al.*, 2004). Da Silva e colaboradores (2010) encontraram taxas mais elevadas de apoptose em células RT4 em comparação com células T24 e 5637 (outra linhagem de célula de tumor de bexiga com mutação em *TP53*) após os tratamentos com cisplatina e gemcitabina (DA SILVA *et al.*, 2010). Essa influência do *status* de *TP53* na resposta a quimioterápicos provavelmente explica as diferenças encontradas aqui entre as linhagens celulares tratadas com as soluções micelares contendo o AITC.

Os resultados da avaliação da inibição da proliferação celular das formulações preparadas pelo método DF em células das linhagens T24, 48 horas pós-tratamento, são mostrados na Figura 9. Reduções significativas da proliferação das células T24 tratadas com a formulação DF5 foram observadas em todas as concentrações testadas (exceto 0,0925 $\mu$ M). Nas mesmas condições, células tratadas com a formulação DF10 também apresentaram reduções significativas da viabilidade celular em todas as concentrações

testadas (exceto 0,0625 $\mu$ M), enquanto que na avaliação feita com a formulação DF15, reduções significativas da viabilidade celular foram observadas nas concentrações 0,005; 0,0625; 0,0725; 0,125; 0,25 e 0,5 $\mu$ M. Nenhuma das concentrações de AITC livre levou a redução significativa da viabilidade celular das células T24.

**Figura 9:** Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) da linhagem T24, 48 horas após o tratamento com as soluções micelares DF contendo AITC e com AITC livre. Cada ponto representa as médias obtidas em três experimentos.

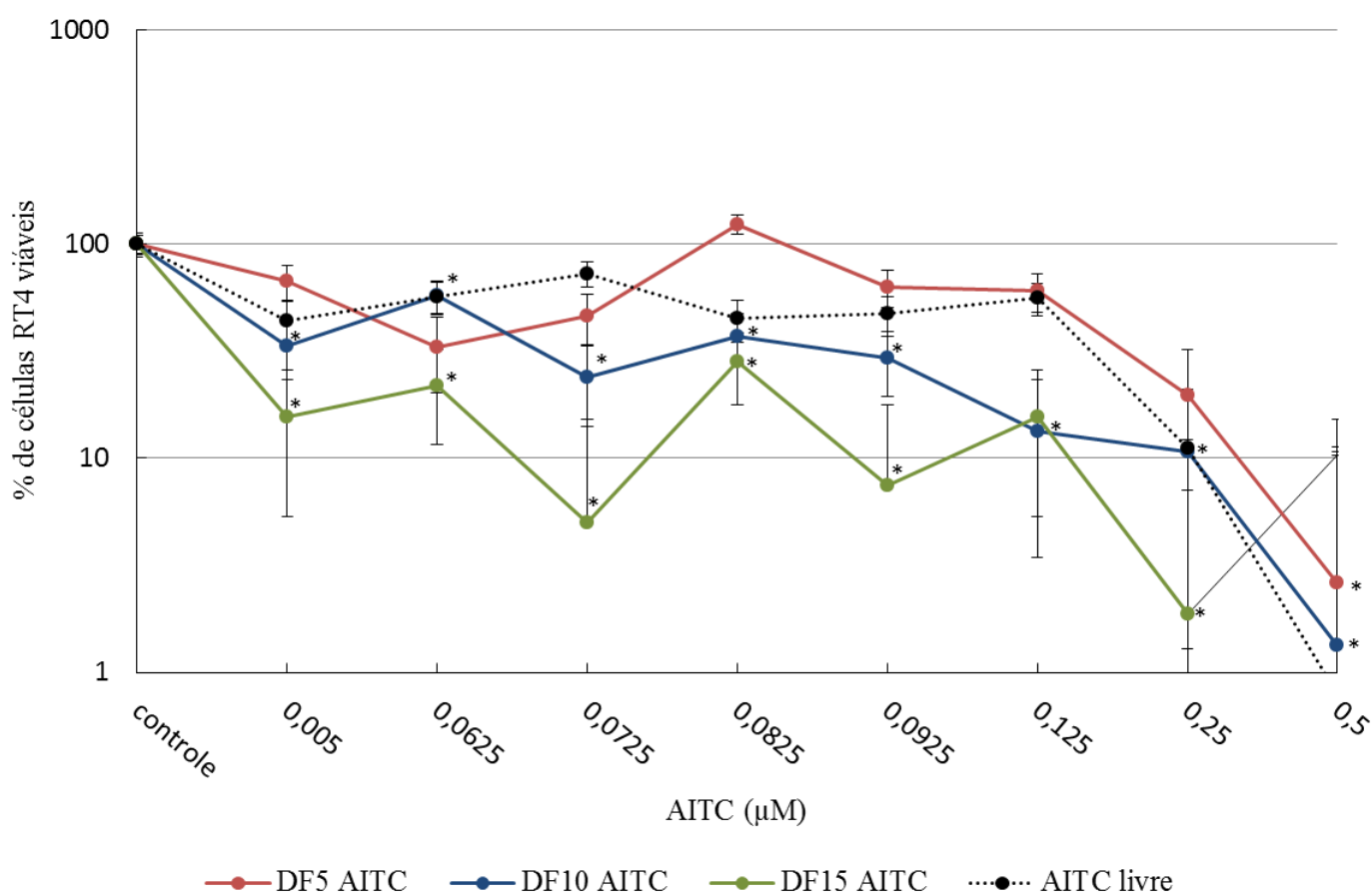


\*  $p < 0,05$  em relação ao controle (excipientes da formulação).

Na Figura 10 são apresentados os resultados da avaliação da inibição da proliferação celular das formulações preparadas pelo método DF em células das linhagens RT4, 48 horas pós-tratamento. Nas células da linhagem RT4, após 48 horas do tratamento, foi observada uma redução significativa da viabilidade celular nas células tratadas com a formulação DF5 na maior concentração testada. Nas mesmas condições, células tratadas com a formulação DF10 e DF15 apresentaram reduções significativas da viabilidade

celular em todas as concentrações testadas. Na avaliação feita com o AITC livre, apenas as duas maiores concentrações testadas levaram a uma redução significativa da proliferação celular.

**Figura 10:** Porcentagem de células viáveis (escala logarítmica) da linhagem RT4, 48 horas após o tratamento com as soluções micelares DF contendo AITC e com AITC livre. Cada ponto representa as médias obtidas em três experimentos.



\*  $p < 0,05$  em relação ao controle (excipientes da formulação).

Com esses resultados observa-se que micelas poliméricas de F127 contendo AITC induziram uma diminuição da quantidade de células viáveis após 48 horas de tratamento em concentrações menores que aquelas observadas após 24 horas de tratamento, nas duas linhagens celulares avaliadas. Este achado pode sugerir que as concentrações de soluções micelares contendo AITC utilizadas possam levar a diminuição da capacidade de reprodução celular, provavelmente por um dano letal sustentado. A hipótese é que as concentrações que não mostraram reduções significativas após 24 horas de tratamento, já

havia gerado danos nas células, mas este só pode ser detectado pelo teste utilizado após 48 horas.

Já foi demonstrado que o AITC, em outras linhagens de tumor de bexiga, leva a parada do ciclo celular em mitose, devido a degradação de  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulinas e induz a apoptose (GENG *et al.*, 2011). Sávio e colaboradores (2014) mostraram um aumento da quantidade de danos primários no DNA, tanto em células do tipo selvagem, quanto em células mutantes para o gene *TP53*, tratadas com AITC livre, indicando que a substância realmente possa causar danos ao DNA e assim impedir a proliferação em longo prazo (SÁVIO *et al.*, 2014).

Para avaliar os efeitos a longo prazo do AITC, livre e em micelas, realizou-se o teste de sobrevivência clonogênica. Este teste é utilizado para avaliar a atividade antitumoral de substâncias. Sabe-se que a forma mais relevante para medir a morte celular em linhagens celulares de tumores é através do ensaio de formação de colônias (TANNOCK, LEE, 2001).

A formulação escolhida para esse teste foi a DF15 AITC, por ter apresentado resultados satisfatórios nos testes de citotoxicidade e de proliferação celular, bons parâmetros de tamanho de partícula e índice de polidispersão, além de ser a formulação que mantém a maior quantidade de AITC (99%) ao fim da preparação.

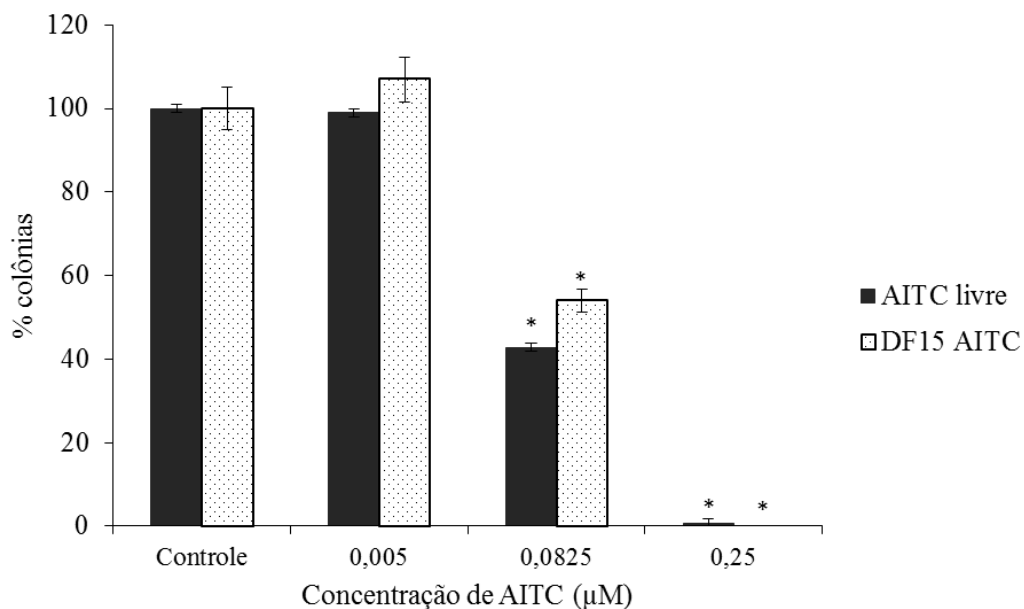
## 5.5. Sobrevivência Clonogênica

Os resultados do ensaio de sobrevivência clonogênica de células das linhagens T24 e RT4 tratadas com a formulação DF15 AITC são mostrados na Figura 11 e na Figura 12, respectivamente. Este teste determina a capacidade de uma célula de se proliferar indefinidamente, restando a sua capacidade de reprodução após ser exposta a uma substância (MUNSHI *et al.*, 2005).

Embora o ensaio de sobrevivência clonogênica tenha sido inicialmente descrito para estudar os efeitos da radiação sobre células, ele agora é amplamente utilizado para examinar os efeitos de agentes quimioterápicos com aplicações potenciais na clínica (MUNSHI *et al.*, 2005), sendo a forma mais relevante para medir a morte celular em linhagens celulares de tumores. Células que são incapazes de produzir colônias em condições ótimas também não são capazes de produzir tumores (TANNOCK, LEE, 2001).

Como observados nas Figuras 11 e 12, nas duas linhagens celulares estudadas, houve uma redução significativa do número de colônias de células para as duas maiores concentrações testadas (0,0825 e 0,25  $\mu\text{M}$ ), tanto em células tratadas com a formulação DF15 AITC quanto para o AITC livre. Portanto, sugere-se que o AITC, em determinadas concentrações, tem a capacidade gerar um dano letal a células tumorais de bexiga, levando a perda do seu potencial reprodutivo, tanto em células com o gene *TP53* mutado quanto em células selvagens para esse gene.

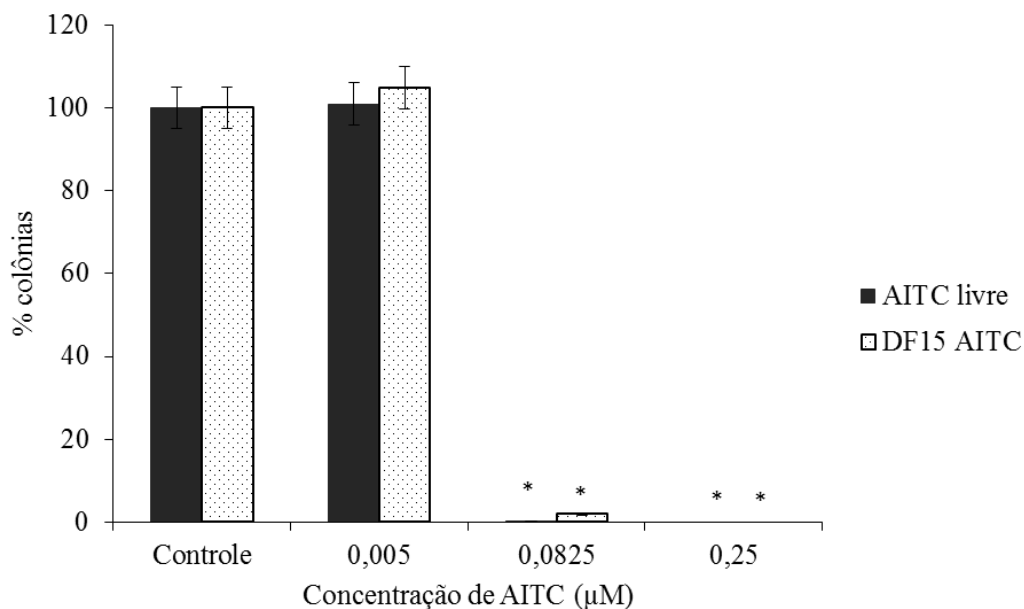
**Figura 11:** Porcentagem de colônias de células da linhagem T24, 15 dias após o tratamento com a solução micelar DF15 contendo AITC e com AITC livre. Cada coluna representa as médias obtidas em três experimentos.



\*  $p < 0,05$  em relação ao controle (excipientes da formulação).



**Figura 12:** Porcentagem de colônias de células da linhagem RT4, 15 dias após o tratamento com a solução micelar DF15 contendo AITC e com AITC livre. Cada coluna representa as médias obtidas em três experimentos.



\*  $p < 0,05$  em relação ao controle (excipientes da formulação).

Sávio e colaboradores (2015) investigaram os efeitos do AITC livre sobre respostas celulares e sobre a expressão de alguns genes com o objetivo de esclarecer o mecanismo de ação deste composto. Eles concluíram que a inibição da proliferação celular pelo AITC, em células com o gene *TP53* mutado, ocorre através do aumento da expressão do gene *ANLN* e diminuição da expressão do gene *S100P*, culminando com a parada do ciclo celular em G2/M. Em células com o gene *TP53* selvagem, a inibição da proliferação celular ocorre através de vias relacionadas com os genes *BAX/BCL2*, culminando em apoptose. Assim, a inibição da proliferação de células por AITC é independente do *status* do gene *TP53*, entretanto, os alvos moleculares parecem ser diferentes (SÁVIO *et al.*, 2015).

Em nosso estudo, não houve diferença na redução do número de colônias entre células tratadas com a formulação DF15 AITC e com AITC livre. Esses resultados são diferentes daqueles que foram encontrados para os experimentos de citotoxicidade e proliferação celular, nos quais a formulação gerou a potencialização da atividade do AITC.

Vários trabalhos tem demonstrado a ação de polímeros da classe dos Pluronic<sup>®</sup> como promotores de permeação de fármacos através de diferentes membranas biológicas,

como em membranas celulares (KABANOV *et al.*, 1992; SLEPNEV *et al.*, 1992), na barreira hematoencefálica (KABANOV *et al.*, 1989) e na pele (MISRA, RAO, 1996).

Melik-Nubarov e colaboradores (1999) avaliaram a interação de Pluronic<sup>®</sup> com células sanguíneas normais e tumorais. Os autores mostraram que esses polímeros podem se ligar a membranas celulares e induzir alterações na organização de seus lipídeos. Além disso, foi demonstrado que o efeito dos polímeros em membranas de células normais e de tumor foi bastante diferente. A ligação a membranas de células tumorais resultou em uma fluidização da bicamada lipídica, enquanto que nas células normais ocorreu um aumento na viscosidade da bicamada. Assim, a fluidização da bicamada alteraria sua permeabilidade, facilitando a entrada de fármacos antitumorais ao estarem encapsulados em polímeros dessa classe (MELIK-NUBAROV *et al.*, 1999). Batrakova e colaboradores (2001) encontraram um efeito semelhante de fluidização da membrana em células endoteliais de cérebro bovino tratadas com Pluronic P85<sup>®</sup> (BATRAKOVA *et al.*, 2001).

O efeito de fluidização da membrana causado por polímeros do tipo Pluronic<sup>®</sup> poderia explicar o aumento da atividade do AITC ao estar encapsulado em micelas de F127 ao avaliarmos seu efeito a curto prazo, através dos testes de citotoxicidade e proliferação celular, em comparação a mesma substância livre. A presença do polímero F127 alteraria a permeabilidade das células, fazendo com que a entrada do AITC ocorresse mais rapidamente. Entretanto, ao avaliarmos seu efeito a longo prazo, pelo ensaio de sobrevivência clonogênica, os resultados similares encontrados tanto para o AITC livre, quanto para o AITC em micelas, estariam mais relacionados às alterações no DNA da célula, que culminariam na incapacidade de produzir clones em ambos os experimentos.

Alguns estudos têm sugerido que os mecanismos apoptóticos desempenham pouco ou nenhum papel na morte de vários tipos de células por fármacos antineoplásicos. (TANNOCK, LEE, 2001; BEALE *et al.*, 1998; KYPRIANOU *et al.*, 1997; LOCK, STRABINSKIENE, 1996; ALDRIDGE *et al.*, 1995; YIN, SCHIMKE, 1995). Os mecanismos de apoptose seriam responsáveis apenas em promover a lise de células que já estavam com a capacidade reprodutiva comprometida, devido a danos letais e irreversíveis, causados após o tratamento.

Lock e Strabinskiene (1996) mostraram que células HeLa, com superexpressão de bcl-2 (proteína capaz de inibir a apoptose), tratadas com o fármaco etoposido tiveram reduções significativas do número de colônias após o tratamento, sendo tal efeito observado através do ensaio de sobrevivência clonogênica. Os autores apontam que a incapacidade dessas células sofrerem divisões celulares indefinidas resulta provavelmente

da presença de mutações, rearranjos, ou até mesmo de deleções em genes essenciais (LOCK, STRIBINSKIENE, 1996).

## **6. CONCLUSÃO**

---

## 6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, soluções micelares de F127 contendo AITC foram desenvolvidas e avaliadas quanto as suas atividades antitumorais utilizando células tumorais de bexiga das linhagens T24 e RT4. As formulações foram preparadas por dois métodos: dispersão a frio (DF) e reidratação de filme polimérico obtido por rotoevaporação (RFP).

Os resultados da quantificação do AITC nas formulações obtidas pelo método DF mostraram que mais de 96,5% do AITC adicionado durante a preparação foi incorporado as formulações. Entretanto, nas formulações preparadas pelo método RFP ocorreu perda de mais de 75% da quantidade de AITC adicionada. Logo, a preparação das soluções micelares pelo método RFP, nas condições utilizadas, não foi viável, tendo em vista a grande perda de AITC que ocorreu por este método. Assim, os estudos seguintes foram conduzidos apenas com as formulações obtidas pelo método DF.

Na avaliação da citotoxicidade após 24 horas do tratamento, as formulações contendo AITC nas concentrações 0,0925; 0,125; 0,25 e 0,5 $\mu$ M foram citotóxicas para as células RT4; e somente a concentração mais alta (0,5  $\mu$ M) reduziu a viabilidade das células T24. Após 48 horas, todas as concentrações das formulações contendo AITC testadas geraram reduções significativas da proliferação celular em ambas as linhagens celulares. Somente as duas maiores concentrações testadas de AITC livre levaram a uma redução significativa da proliferação celular das células RT4. Esses resultados indicaram que soluções micelares contendo AITC potencializaram os efeitos citotóxicos deste composto. Além disso, as formulações foram mais citotóxicas para as células *TP53* selvagem do que para as células *TP53* mutado.

Os resultados do ensaio de sobrevivência clonogênica mostraram que houve uma redução significativa do número de colônias de células nas duas linhagens para as duas maiores concentrações testadas (0,0825 e 0,25  $\mu$ M), tanto em células tratadas com a formulação quanto para o AITC livre. Portanto, sugere-se que o AITC, em determinadas concentrações, tem a capacidade de gerar um dano letal a células tumorais de bexiga, levando a perda do seu potencial reprodutivo.

Com os resultados obtidos até o momento podemos afirmar que soluções micelares aceleram a ação de AITC nas células tumorais avaliadas. Assim, as formulações desenvolvidas podem ser uma abordagem interessante para a futura administração oral dessa substância no tratamento do tumor de bexiga.

## **7. REFERÊNCIAS**

---

## 7. REFERÊNCIAS

ALDRIDGE, D. R.; ARENDS, M. J.; RADFORD, I. R. Increasing the susceptibility of the rat 208F fibroblast cell line to radiation-induced apoptosis does not alter its clonogenic survival dose-response. **British Journal of Cancer**, 71, 571–577, 1995.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B; MONTANARI, C.A.; DONNICI C.L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, 28 (1), 118-129, 2005.

ALVAREZ-LORENZO, C.; SOSNIK, A.; CONCHEIRO, A. PEO-PPO Block Copolymers for Passive Micellar Targeting and Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Therapy. **Current Drug Targets**, 12, 1112-1130, 2011.

BAMIAS, A.; MOULOPOULO, L. A.; KOUTRAS, A.; ARAVANTINOS, G.; FOUNTZILAS, G.; PECTASIDES, D.; KASTRITIS, E.; GIKA, D.; SKARLOS, D.; LINARDOU, H.; KALOFONOS, P. H.; DIMOPOULOS, M. A. The combination of gemcitabine and carboplatin as first-line treatment in patients with advanced urothelial carcinoma. A Phase II study of the Hellenic Cooperative Oncology Group. **Cancer**, 106, 297–303, 2006.

BARLOW, L. J.; BENSON, M. C. Experience with newer intravesical chemotherapy for high-risk non-muscle-invasive bladder cancer. **Current Urology Reports**, 14, 65–70, 2013.

BARREIRO-IGLESIAS, R.; BROMBERG, L.; TEMCHENKO, M.; HATTON, T. A.; CONCHEIRO, A.; ALVAREZ-LORENZO, C. Solubilization and stabilization of camptothecin in micellar solutions of pluronic-g-poly(acrylic acid) copolymers. **Journal of Control Release**, 97, 537-49, 2004.

BATRAKOVA, E.V.; LI, S.; VINOGRADOV S. V.; ALAKHOV, V.Y.; MILLER, D. W.; BEALE, P.; ROGERS, P.; HOBBS, S.; BOXALL, F.; KELLAND, L. Transfection of bax

into resistant human ovarian carcinoma cell lines confers no sensitisation to chemotherapeutic agents. **British Journal of Cancer**, 78 (1), 30, 1998.

BHATTACHARYA, A.; LI, Y.; GENG, F.; MUNDAY, R.; ZHANG, Y. The principal urinary metabolite of allyl isothiocyanate, N-acetyl-S-(N-allylthiocarbamoyl) cysteine, inhibits the growth and muscle invasion of bladder cancer. **Carcinogenesis**, 33, 394-398, 2012.

BHATTACHARYA, A.; LI, Y.; WADE, K. L.; PAONESSA, J. D.; FAHEY, J. W.; ZHANG, Y. Allyl isothiocyanate-rich mustard seed powder inhibits bladder cancer growth and muscle invasion. **Carcinogenesis**, 31, 2105-2110, 2010.

BOLLARD, M.; STRIBBLING, S.; MITCHELL, S.; CALDWELL, J. The disposition of allyl isothiocyanate in the rat and mouse. **Food and Chemical Toxicology**, 35, 933-943, 1997.

BONES, A. M.; ROSSITER, J. T. The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. **Physiologia Plantarum**, 97(1), 194-208, 1996.

BRAY, F.; REN, J.; MASUYER, E.; FERLA, J. Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. **International Journal of Cancer**, 132, 1133-45, 2013.

BROMBERG, L. Hydrophobically modified polyelectrolytes and polyelectrolyte block-copolymers for biomedical applications. **American Scientific Publishers**, 51, 23-46, 2002.

BROMBERG, L. Polymeric micelles in oral chemotherapy. **Journal of Controlled Release**, 128, 99-112, 2008.

BUTT, A. M.; AMIN, M. C. I. M.; KATAS, H.; SIRISUTA, N.; WITOONSARIDSILP, W.; BENJAKUL, R. In Vitro Characterization of Pluronic F127 and D-Tocopheryl



Polyethylene Glycol 1000 Succinate Mixed Micelles as Nanocarriers for Targeted Anticancer-Drug Delivery. **Journal of Nanomaterials**, 1-12, 2012.

CHEN, L.; SHA, X.; JIANG, X.; CHEN, Y.; REN, Q.; FANG, X. Pluronic P105/F127 mixed micelles for the delivery of docetaxel against Taxol-resistant non-small cell lung cancer: optimization and in vitro, in vivo evaluation. **International Journal of Nanomedicine**, 8, 73–84, 2013.

CHEN, N. G.; CHEN, K. T.; LU, C. C.; LAN, Y. H.; LAI, C. H.; CHUNG, Y. T.; YANG, J. S.; LIN, Y. C. Allyl isothiocyanate triggers G2/M phase arrest and apoptosis in human brain malignant glioma GBM 8401 cells through a mitochondria-dependent pathway. **Oncology Reports**, 24, 449-455, 2010.

CHEN, Y.; ZHANGA, W.; GU, J.; REN, Q.; FAN, Z.; ZHONG, W.; FANG, X.; SHA, X. Enhanced antitumor efficacy by methotrexate conjugated Pluronic mixed micelles against KBv multidrug resistant cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, 452, 421– 433, 2013.

CRIVELLI, J. J.; XYLINAS, E.; KLUTH, L. A.; RIEKEN, M.; RINK, M.; SHARIAT, S. F. Effect of smoking on outcomes of urothelial carcinoma: a systematic review of the literature. **European Urology**, 65, 742–54, 2014.

DA SILVA, G. N.; MARCONDES, J. P. C.; CAMARGO, E. A.; SAKAMOTO-HOJO E. T.; PASSOS, G. A.; SALVADORI, D. M. F Cell cycle arrest and apoptosis in TP53 subtypes of bladder carcinoma cell lines treated with cisplatin and gemcitabine, **Experimental Biology and Medicine**, 235, 814–824, 2010.

DANSON, S.; FERRY, D.; ALAKHOV, V.; MARGISON, J.; KERR, D.; JOWLE, D.; BRAMPTON, M.; HALBERT, G.; RANSON, M. Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of pluronic polymer-bound doxorubicin (SP1049C) in patients with advanced cancer. **British Journal of Cancer**, 90, 2085–2091, 2004.

DELCLOS, G. L.; LERNER, S. P. Occupational risk factors. **Scandinavian Journal of Urology**, 218, 58–63, 2008.

DUMORTIER, G.; GROSSIORD, J. L.; AGNELY, F.; CHAUMEIL, J. C. A review of Poloxamero 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. **Pharmaceutical Research**, 23 (12), 2709-28, 2006.

FENG, L.; ACHANTA, G.; PELICANO, H.; ZHANG, W.; PLUNKETT, W.; HUANG, P. Role of p53 in cellular response to anticancer nucleoside analog-induced DNA damage, **International Journal of Molecular Medicine**, 5, 597–604, 2000.

FENWICK, G. R.; HEANEY, R. K.; MULLIN, W. J. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 18, 23–201, 1983.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ERVIK, M.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. GLOBOCAN 2012, Cancer Incidence and Mortality Worldwide International Agency for Research on Cancer; 2013. Disponível em <<http://globocan.iarc.uk>>. Acesso em 25/06/2015.

FOYE, W. O.; SENGUPTA, S. K. Em Principles of Medicinal Chemistry; Foye, W.O.; Lemke, T. L.; Williams, D. A., eds.; Williams & Wilkins: Baltimore, 822-845, 1996.

FREEDMAN, N. D.; SILVERMAN, D. T.; HOLLENBECK, A. R.; SCHATZKIN, A.; ABNET, C. C. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. **Journal of the American Medical Association**, 306, 737–45, 2011.

GAUL, L. E. Contact dermatitis from synthetic oil of mustard. **Archives of Dermatology**, 90, 158–159, 1964.

GENG, F.; TANG, L.; LI, Y.; YANG, L.; CHOI, K. S.; KAZIM, A. L.; ZHANG, Y. Allyl isothiocyanate arrests cancer cells in mitosis, and mitotic arrest in turn leads to apoptosis via Bcl-2 protein phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, 286, 32259-32267, 2011.

GONG, J.; CHEN, M.; ZHENG, Y.; WANG, S.; WANG Y. Polymeric micelles drug delivery system in oncology. **Journal of Controlled Release**, 159, 312–323, 2012.

GROSSMAN, H. B.; NATALE, R. B.; TANGEN, C. M.; SPEIGHTS, V. O.; VOGELZANG, N. J.; TRUMP, D. L.; DEVERE WHITE, R. W.; SAROSDY, M. F.; WOOD DP, J. R.; RAGHAVAN, D.; CRAWFORD, E. D. Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer. **New England Journal of Medicine**, 349, 859–66, 2003.

HAMAGUCHI T.; KATO, K.; YASUI, H.; MORIZANE, C.; IKEDA, M.; UENO, H.; MURO, K.; YAMADA, Y.; OKUSAKA, T.; SHIRAO, K.; SHIMADA, Y.; NAKAHAMA, H.; MATSUMURA, Y. A phase I and pharmacokinetic study of NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation. **British Journal of Cancer**, 97, 170–176, 2007.

HAWLEY, A. E.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. Targeting of colloids to lymph nodes: influence of lymphatic physiology and colloidal characteristics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 17, 129-148, 1995.

HILL, R.; RABB, M.; MADUREIRA, P. A.; CLEMENTS, D.; GUJAR, S. A.; WAISMAN, D. M.; GIANCOMANTONIO, C. A.; LEE, P. W. K. Gemcitabine-mediated tumour regression and p53-dependent gene expression: implications for colon and pancreatic cancer therapy. **Cell Death & Disease**, 4, 791, 2013.

HOBBS, S. K.; MONSKY, W. L.; YUAN, F.; ROBERTS, W. G.; GRIFFITH, L.; TORCHILIN, V. P.; JAIN, R. K. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 95, 4607–4612, 1998.

HOFSETH, L. J.; HUSSAIN, S. P.; HARRIS, C. C. p53: 25 years after its discovery, **Trends in Pharmacological Sciences**, 25, 77–81, 2004.

HWANG, E. S.; LEE, H. J. Allyl isothiocyanate and its N-acetylcysteine conjugate suppress metastasis via inhibition of invasion, migration, and matrix metalloproteinase-2/-9 activities in SK-Hep 1 human hepatoma cells. **Experimental Biology and Medicine**, 231 (4), 421–430, 2006.

IMANI, R.; VERANIC, P.; IGLIC, A.; KREFT, M. E.; PAZOKI, M.; HUDOKLIN, S. Combined cytotoxic effect of UV-irradiation and TiO<sub>2</sub> microbeads in normal urothelial cells, low-grade and high-grade urothelial cancer cells. **Photochemical and Photobiological Sciences**, 14, 583-590, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Câncer: o que é**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. 2014. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>. Acessado em 29 de junho de 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014>>. Acessado em 5 de junho de 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>>. Acessado em 7 de janeiro de 2016.

JUHASZ, J.; LENAERTS, V.; RAYMOND, P.; ONG, H. Diffusion of rat atrial natriuretic factor in thermoreversible poloxamer gels. **Biomaterials**, 10 (4), 265-268, 1989.

KABANOV, A .V. Mechanism of pluronic effect on P-glycoprotein efflux system in blood-brain barrier: contributions of energy depletion and membrane fluidization. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 299 (2), 483-93, 2001.

KABANOV, A. V.; ALAKHOV, V. Y. Pluronic<sup>®</sup> Block Copolymers in Drug Delivery: from Micellar Nanocontainers to Biological Response Modifiers. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, 19(1), 1–73, 2002.

KABANOV, A. V.; BATRAKOVA, E. V.; ALAKHOV, V. Y. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. **Journal of Controlled Release**, 82, 189–212, 2002.

KABANOV, A. V.; CHEKHONIN, V. P.; ALAKHOV, V. Y.; BATRAKOVA, E. V.; LEBEDEV, A. S.; MELIK-NUBAROV, N. S.; LEVASHOV, A. V.; MOROZOV, G. V.; SEVERIN, E. S. The neuroleptic activity of haloperidol increases after its solubilization in surfactant micelles. Micelles as microcontainers for drug targeting. **FEBS Letters**, 258, 343-345, 1989.

KABANOV, A. V.; SLEPNEV, V. I.; KUZNETSOVA, L. E.; ALAKHOV, V. Y.; BATRAKOVA, E. V.; MELIK-NUBAROV, N. S.; SVESHNIKOV, P. G.; KABANOV, V. A. Pluronic micelles as a tool for low-molecular compound vector delivery into a cell: effect of Staphylococcus aureus enterotoxin B on cell loading with micelle incorporated fluorescent dye. **International Journal of Biochemistry**, 26, 1035-1042, 1992.

KATAOKA, K.; KWON, G. S.; YOKOYAMA, M.; OKANO, T.; SAKURAI, Y. Block copolymer micelles as vehicles for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, 24, 119-132, 1993.

KEDAR, U.; PHUTANE, P.; SHIDHAYE, S.; KADAM, V. Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, 6, 714–729, 2010.

KIM, D. W.; KIM, S. Y.; KIM, H. K.; KIM, S. W.; SHIN, S. W.; KIM, J. S.; PARK, K.; LEE, M. Y.; HEO, D. S. Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a novel Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, with cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. **Annals of Oncology**, 18, 2009–2014, 2007.

KIM, T. Y.; KIM, D. W.; CHUNG, J. Y.; SHIN, S. G.; KIM, S. C.; HEO, D. S.; KIM, N. K.; BANG, Y. J. Phase I and pharmacokinetic study of Genexol-PM, a cremophor-free, polymeric micelle-formulated paclitaxel, in patients with advanced malignancies, **Clinical Cancer Research**, 10, 3708–3716, 2004.

KONG, G.; BRAUN, R. D.; DEWHIRST, M. W. Hyperthermia enables tumor-specific nanoparticle delivery: effect of particle size. **Cancer Research**, 60 (16), 4440-4445, 2000.

KUSHAD, M. M.; BROWN, A. F.; KURILICH, A. C.; JUVIK, J. A.; KLEIN, B. P.; WALLIG, M. A.; JEFFERY, E. H. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. **Journal Agriculture Food Chemistry**, 47, 1541–1548, 1999.

KYPRIANOU, N.; KING, E. D.; BRADBURY, D.; RHEE, J. G. Bcl-2 over-expression delays radiation-induced apoptosis without affecting the clonogenic survival of human prostate cancer cells. **International Journal of Cancer**, 70, 341–348, 1997.

LE LAY, K.; MYON, E.; HILL, S.; RIOU-FRANCA, L.; SCOTT, D.; SIDHU, M.; DUNLOP, D.; LAUNOIS, R. Comparative cost-minimization of oral and intravenous chemotherapy for first line treatment of non-small cell lung cancer in the UK NHS system. **The European Journal of Health Economics**, 8 (2), 145–151, 2007.

LEA, M. A.; RANDOLPH, V. M.; LEE, J. E.; DESBORDES, C. Induction of histone acetylation in mouse erythroleukemia cells by some organosulfur compounds including allyl isothiocyanate. **International Journal of Cancer**, 92 (6), 784–789, 2001.

LEE, K. S.; CHUNG, H. C.; IM, S. A.; PARK, Y. H.; KIM, C. S.; KIM, S. B.; RHA, S. Y.; LEE, M. Y.; RO, J. Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, in patients with metastatic breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, 108, 241–250, 2008.

LEWIS, S. A. Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, 278, 867–874, 2000.

LINARDOU, H.; ARAVANTINOS, G.; EFSTATHIOU, E.; KALOFONOS, C.; ANAGNOSTOPOULOS, A.; DELIVELIOTIS, C.; BAFALOUKOS, D.; ATHANASIOS, D. M.; BAMIAS, A. Gemcitabine and carboplatin combination as first-line treatment in elderly patients and those unfit for cisplatin-based chemotherapy with advanced bladder carcinoma: Phase II study of the Hellenic Co-operative Oncology Group. **Urology**, 64, 479–484, 2004.

LOCK, R. B.; STRABINSKIENE, L. Dual modes of death induced by etoposide in human epithelial tumor cells allow Bcl-2 to inhibit apoptosis without affecting clonogenic survival. **Cancer Research**, 56, 4006–4012, 1996.

MAEDA, H.; WU, J.; SAWA, T.; MATSUMURA, Y.; K. HORI. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. **Journal of Controlled Release**, 65, 271–284, 2010.

MALATS, N.; REAL, F. X. Epidemiology of Bladder. **Cancer Hematology/Oncology Clinics of North America**, 29, 177–189, 2015.

MARTIN-DOYLE, W.; KWIATKOWSKI, D. J. Molecular Biology of Bladder Cancer. **Cancer Hematology/Oncology Clinics of North America**, 29, 191–203, 2015.

MARTINI, E. Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: Formulação e caracterização físico-química. Porto Alegre: UFRGS, 2005.

MATSUMURA, Y.; HAMAGUCHI, T.; URA, T.; MURO, K.; YAMADA, Y.; SHIMADA, Y.; SHIRAO, K.; OKUSAKA, T.; UENO, H.; IKEDA, M.; WATANABE, N. Phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of NK911, a micelle-encapsulated doxorubicin. **British Journal of Cancer**, 91, 1775–1781, 2004.

MELIK-NUBAROVA, N. S.; POMAZ, O. O.; DORODNYCH, T. Y.; BADUN, G. A.; KSENOFONTOV, A. L.; SCHEMCHUKOVA, O. B.; ARZHAKOV, S. A. Interaction of tumor and normal blood cells with ethylene oxide and propylene oxide block copolymers. **FEBS Letters**, 446, 194-198, 1999.

MIKHAIL, A. S.; ALLEN, C. Block copolymer micelles for delivery of cancer therapy: transport at the whole body, tissue and cellular levels. **Journal of Controlled Release**, 138, 214–223, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Coordenação Nacional de Controle de Tabagismo. Falando Sobre Câncer e Seus Fatores de Risco. Rio de Janeiro, 1996. Disponível em [www.1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=319](http://www.1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=319), acessado em 10 de julho de 2015.

MIRSA, R.; ACHARYA, S.; SAHOO, S. K. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. **Drug Discovery Today**, 15 (19/20), 842-850, 2010.

MISRA, A. N.; RAO, V. U. Transdermal administration of insulin: effect of various penetration enhancers. **Indian Journal of Experimental Biology**, 34, 171-173, 1996.

MUNDAY, R.; MHAWECH-FAUCEGLIA, P.; MUNDAY, C.M.; PAONESSA, J. D.; TANG, L.; MUNDAY, J. S.; LISTER, C.; WILSON, P.; FAHEY, J. W.; DAVIS, W.; ZHANG, Y. Inhibition of urinary bladder carcinogenesis by broccoli sprouts. **Cancer Research**, 68, 1593-1600, 2008.

MUNSHI, A.; HOBBS, M.; MEYN, R. E. Clonogenic, cell survival assay. **Methods in Molecular Medicine**, 110, 21-28, 2005.

MURAD, A. M.; KATZ, A. *Oncologia Bases Clínicas do Tratamento*; Guanabara; Rio de Janeiro, 41, 1995.

MUSK, S. R.; JOHNSON, I. T. Allyl isothiocyanate is selectively toxic to transformed cells of the human colorectal tumor line HT29. **Carcinogenesis**, 14 (10), 2079-2083, 1993.

PELOSI, C.; CHIRON, F.; DUBS, F.; HEDDE, M.; PONGE, J. F.; SALMON, S.; CLUZEAU, D.; NÉLIEU, S. A new method to measure allyl isothiocyanate (AITC) concentrations in mustard - Comparison of AITC and commercial mustard solutions as earthworm extractants. **Applied Soil Ecology**, 80, 1-5, 2014.

PLUMMER, R.; WILSON, R. H.; CALVERT, H.; BODDY, A. V.; GRIFFIN, M.; SLUDDEN, J.; TILBY, M. J.; EATOCK, M.; PEARSON, D. G.; OTTLEY, C. J.; MATSUMURA, Y.; KATAOKA, K.; NISHIYA, T. A Phase I clinical study of cisplatin-



incorporated polymeric micelles (NC-6004) in patients with solid tumours. **British Journal of Cancer**, 104, 593–598, 2011.

PUISIEUX, F.; ROBLOT-TREUPEL, L. Vetorização e vetores de fármacos. **Caderno de Farmácia**, 4, 29-50, 1988.

REDELMAN-SIDI, G.; GLICKMAN, M. S.; BOCHNER, B. H. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer - A current perspective. **Nature Reviews Urology**, 11, 153–162, 2014.

ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, 263, 85-94, 2003.

ROTA, M.; BOSETTI, C.; BOCCIA, S., BOFFETTA, P.; LA VECCHIA, C. Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons and respiratory and urinary tract cancers: an updated systematic review and a meta-analysis to 2014. **Archives of Toxicology**, 88(8), 1479-90, 2014.

ROWE, R.; SHESKEY, P.; OWEN, S. *Pharmaceutical Handbook of Pharmaceutical of Pharmaceutical Excipients*, Fifth Edition. **London UK and American Pharmaceutical Association**, Washington, USA, 2005.

RUNGAPAMESTRY, V.; DUNCAN, A. J.; FULLER, Z.; RATCLIFFE, B. Changes in glucosinolate concentrations, myrosinase activity, and production of metabolites of glucosinolates in cabbage (*Brassica oleracea* Var. capitata) cooked for different durations. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 54, 7628–7634, 2006.

SAIF, M. W.; RUBIN, M. S.; FIGUEROA, J. A.; KERR, R. O. Multicenter phase II trial of Genexol-PM (GPM), a novel Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel in patients with advanced pancreatic cancer (APC): Final results. **Gastrointestinal Cancers Symposium**, 269, 2008.

SALEM, S. D.; ABOU-TARBOUSH, F. M.; SAEED, N. M.; AL-QADASI, W. D.; FARAH, M. A.; AL-BUHAIIRI, M.; AL-HARBI, N.; ALHAZZA, I.; ALSBEIH, G. Involvement of p53 in gemcitabine mediated cytotoxicity and radiosensitivity in breast cancer cell lines. **Gene**, 498, 300–307, 2012.

SALMONM, S. E. Em Farmacologia Básica & Clínica, Katzung, B.G., ed.; Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, 629-655, 1998.

SÁVIO, A. L. V.; DA SILVA, G. N.; SALVADORI, D. M. F. Inhibition of bladder cancer cell proliferation by allyl isothiocyanate (mustard essential oil). **Mutation Research**, 771, 29–35, 2015.

SÁVIO, A. L. V.; SILVA, G. N. ; CAMARGO, E. A.; SALVADORI, D. M. F. Cell cycle kinetics, apoptosis rates, DNA damage and TP53 gene expression in bladder cancer cells treated with allyl isothiocyanate (mustard essential oil). **Mutation Research**, 762, 40–46, 2014.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, 26 (5), 726-737, 2003.

SCHMOLKA, I. R. Poloxamers in the pharmaceutical industry. In: TARCHA, P.J. Polymers for Controlled Drug Delivery, 10, 189-214. **CRC Press: Boca Raton**, 1991.

SHABSIGH, A.; KORETS, R.; VORA, K. C.; BROOKS, C. M.; CRONIN, A. M.; SAVAGE, C.; RAJ, G.; BOCHNER, B. H.; DALBAGNI, G.; HERR, H. W.; DONAT, S. M. Defining early morbidity of radical cystectomy for patients with bladder cancer using a standardized reporting methodology. **European Urology**, 55, 164–174, 2009.

SHAPIRO, T. A.; FAHEY, J. W.; WADE, K. L.; STEPHENSON, K. K.; TALALAY, P. Human metabolism and excretion of cancer chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of cruciferous vegetables. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, 7, 1091–1100, 1998.

SHARIAT, S. F.; SFAKIANOS, J. P.; DROLLER, M. J.; KARAKIEWICZ, P.I.; MERYN, S.; BOCHNER, B. H. The effect of age and gender on bladder cancer: a critical review of the literature. **BJU International**, 105, 300–8, 2010.

SIMONS, C. T. ; CARSTENS, M. I.; CARSTENS, E. Oral Irritation by Mustard Oil: Self-desensitization and Cross-desensitization with Capsaicin. **Chemical Senses**, 28, 459–465, 2003.

SLEPNEV, V. I.; KUZNETSOVA, L. E.; GUBIN, A. N.; ALAKHOV, V. Y.; BATRAKOVA, E. V.; KABANOV, A. V. Micelles of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene) block copolymer (pluronic) as a tool for low-molecular compound delivery into a cell: phosphorylation of intracellular proteins with micelle incorporated [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP. **International Journal of Biochemistry**, 26, 587-595, 1992.

SON, Y. O.; KIM, J.; LIM, L. C.; CHUNG, Y.; CHUNG, G. H.; LEE, J. C. Ripe fruits of *Solanum nigrum* inhibits growth and induces apoptosis in MCF-7 cells. **Food and Chemical Toxicology**, 41, 1421-1428, 2003.

STOCKLE, M.; MEYENBURG, W.; WELLEK, S.; VOGES, G. E.; ROSSMANN, M.; GERTENBACH, U.; THÜROFF, J. W.; HUBER, C.; HOHENFELLNER, R. Adjuvant polychemotherapy of nonorgan-confined bladder cancer after radical cystectomy revisited: long-term results of a controlled prospective study and further clinical experience. **Journal of Urology**, 153, 47–52, 1995.

STOCKLE, M.; MEYENBURG, W.; WELLEK, S.; VOGES, G.; GERTENBACH, U.; THÜROFF, J. W.; HUBER, C.; HOHENFELLNER, R. Advanced bladder cancer (stages pT3b, pT4a, pN1 and pN2): improved survival after radical cystectomy and 3 adjuvant cycles of chemotherapy. Results of a controlled prospective study. **Journal of Urology**, 148, 302–306, 1992.

STOLNIK, S.; ILLUM. L.; DAVIS, S. S. Long circulating microparticulate drug carriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 16, 195–214, 1995.

STORM, G.; BELLLOT, S. O.; DAEMEN, T.; LASIC, D. D. Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 17, 31–48, 1995.

SULTANA, T.; SAVAGE, G. P.; MCNEIL, D. L.; PORTER, N. G.; MARTIN, R. J.; DEO, B. Effects of fertilisation on the allyl isothiocyanate profile of above-ground tissue of New Zealand-grown wasabi. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 82, 1477–1482, 2002.

SVÁTEK, R. S.; HOLLENBECK, B. K.; HOLMÄNG, S.; LEE, R.; KIM, S. P.; STENZL, A.; LOTAN, Y. The economics of bladder cancer: costs and considerations of caring for this disease. **European Urology**, 66 (2), 253–62, 2014.

TAKÁTS, Z.; VÉKEY, K.; HEGEDÜS, L. Qualitative and quantitative determination of poloxamer surfactants by mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry: RCM**, 15 (10), 805-10, 2001.

TANG, L.; ZHANG, Y. Dietary isothiocyanates inhibit the growth of human bladder carcinoma cells. **Journal of Nutrition**, 134 (8), 2004–2010, 2004.

TANG, L.; ZIRPOLI, G. R.; GURU, K.; MOYSICH, K. B.; ZHANG, Y.; AMBROSONE, C. B.; MCCANN, S. E.. Consumption of raw cruciferous vegetables is inversely associated with bladder cancer risk. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, 17, 938-944, 2008.

TANNOCK, I. F.; LEE, C. Evidence against apoptosis as a major mechanism for reproductive cell death following treatment of cell lines with anti-cancer drugs. **British Journal of Cancer**, 84, 100–5, 2001.

TEPLY, B. A.; KIM, J. J. Systemic therapy for bladder cancer – a medical oncologist’s perspective. **Journal of Solid Tumors**, 4 (2), 25–35, 2014.

TORCHILIN, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 63, 131–135, 2011.

UEMATSU, Y.; HIRATA, K.; SUZUKI, K.; IIDA, K.; UETA, T.; Determination of isothiocyanates and related compounds in mustard extract and horseradish extract used as natural food additives. **Shokuhin Eiseigaku Zasshi**, 43 (1), 10–17, 2002.

VALDEZ, B. C.; WANG, G.; MURRAY, D.; NIETO, Y.; LI, Y.; SHAH, J.; TURTURRO, F.; WANG, M.; WEBER, D. M.; CHAMPLIN, R. E.; QAZILBASH, M. H.; ANDERSSON, B. S. Mechanistic studies on the synergistic cytotoxicity of the nucleoside analogs gemcitabine and clofarabine in multiple myeloma: relevance of p53 and its clinical implications. **Experimental Hematology**, 41 719–730, 2013.

VALLE, J.; ARMSTRONG, A.; NEWMAN, C.; ALAKHOV, V.; PIETRZYNSKI, G.; BREWER, J.; CAMPBELL, S.; CORRIE, P.; ROWINSKY, E.; RANSON, M. A phase 2 study of SP1049C, doxorubicin in P-glycoprotein-targeting pluronics, in patients with advanced adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. **Investigational New Drugs**, 29, 1029–1037, 2010.

WALLERAND, H.; BAKKAR, A. A.; DIEZ DE MEDINA, S. G.; PAIRON, J. C.; YANG, Y. C.; VORDOS, D. Mutations in TP53, but not FGFR3, in urothelial cell carcinoma of the bladder are influenced by smoking: contribution of exogenous versus endogenous carcinogens. **Carcinogenesis**, 26, 177–184, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Banco de dados. Disponível em <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acessado em 15 de junho de 2015.

XIAO, D.; SRIVASTAVA, S. K.; LEW, K. L.; ZENG, Y.; HERSHBERGER, P.; JOHNSON, C. S.; TRUMP, D. L.; SINGH, S. V. Allyl isothiocyanate, a constituent of cruciferous vegetables, inhibits proliferation of human prostate cancer cells by causing G2/M arrest and inducing apoptosis. **Carcinogenesis**, 24, 891–897, 2003.

YIN, D. X.; SCHIMKE, R. T. BCL-2 expression delays drug-induced apoptosis but does not increase clonogenic survival after drug treatment in HeLa cells. **Cancer Research**, 55, 4922–4928, 1995.

ZHANG, L., KOSARAJU, S. L. Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants. **European Polymer Journal**, 43 (7), 2956-2966, 2007.

ZHANG, W.; SHI, Y.; CHEN, Y.; HAO, J.; SHA, X.; FANG, X. The potential of Pluronic polymeric micelles encapsulated with paclitaxel for the treatment of melanoma using subcutaneous and pulmonary metastatic mice models. **Biomaterials**, 32, 5934-5944, 2011.

ZHANG, Y. Allyl isothiocyanate as a cancer chemopreventive phytochemical. **Molecular Nutrition and Food Research**, 54 (1), 127-135, 2010.

ZHANG, Y. Understanding the gender disparity in bladder cancer risk: the impact of sex hormones and liver on bladder susceptibility to carcinogens. **Journal of environmental science and health**, 31, 287–304, 2013.

ZHANG, Y.; TANG, L.; GONZALEZ, V. Selected isothiocyanates rapidly induce growth inhibition of cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, 2, 1045–1052, 2003.