

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

Avaliação do efeito antitumoral *in vitro* de nanocápsulas de núcleo lipídico de tretinoína sobre células de adenocarcinoma de pulmão, linhagem A549

Eduarda Schultze

Pelotas, 2013

EDUARDA SCHULTZE

Avaliação do efeito antitumoral *in vitro* de nanocápsulas de núcleo lipídico de tretinoína sobre células de adenocarcinoma de pulmão, linhagem A549

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia
da Universidade Federal de Pelotas,
como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Tiago Collares
Co-Orientador (es): Prof. Dra. Fabiana Seixas
Prof. Dr. Vinicius Farias Campos

Pelotas, 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S387a Schultze, Eduarda

Avaliação do efeito antitumoral in vitro de nanocápsulas de núcleo lipídico de tretinoína sobre células de adenocarcinoma de pulmão, linhagem A549 / Eduarda Schultze ; Tiago Collares, orientador ; Fabiana Seixas, Vinicius Farias Campos, co-orientador. - Pelotas, 2013.
53 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2013.

1. Tretinoína. 2. Câncer de pulmão. 3. Ácido retinóico. 4. P21.
5. Nanocápsulas. I. Collares, Tiago, orient. II. Seixas, Fabiana, co-orient. III. Campos, Vinicius Farias, co-orient. IV. Título.

CDD: 616.99424

Dedico este trabalho àquelas que foram incansáveis
em estar ao meu lado, trabalhando, discutindo
(temas científicos e não) e fazendo tudo ficar mais fácil,
Karine Rech Begnini e Virginia Yurgel.

Meus sinceros agradecimentos à **Aline Ourique**, sem a qual este trabalho não existiria, e à equipe da Faculdade de Farmácia da UFRGS, Professoras Dras. **Silvia Guterres** e **Adriana Pohlmann** e Professor Dr. **Ruy Bech**.

Agradeço ao meu orientador Professor Dr. **Tiago Collares** por ter aceitado me orientar ao longo deste trabalho e por ter me proporcionar o retorno à vida acadêmica.

Agradeço a minha co-orientadora Professora Dra. **Fabiana Seixas** pelas orientações recebidas ao longo deste tempo e pelo apoio que recebi em decisões difíceis e ao co-orientador Professor Dr. **Vinicius Farias Campos** pelo auxílio técnico-científico.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório por todos os momentos de convívio harmonioso, discussões filosóficas e científicas e pelo sagrado momento do café.

Por fim e não menos importante, agradeço a todos os meus amigos, familiares e pessoas que de alguma forma ouviram minhas reclamações, vibraram com minhas vitórias e torceram pelo meu sucesso.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Sibeles Borsuk, Ufpel

Prof. Dr. Alan McBride, Ufpel

Profa. Dra. Isabel Oliveira de Oliveira, Ufpel

RESUMO

Schultze, Eduarda. **Avaliação do efeito antitumoral *in vitro* de nanocápsulas de núcleo lipídico de tretinoína sobre células de adenocarcinoma de pulmão, linhagem A549**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas

Derivados e análogos retinóides têm sido largamente estudados como agentes antitumorais devido a seus efeitos sobre a proliferação e diferenciação celular. Tretinoína (TT), também conhecida como ácido retinóico é um derivado retinóide que tem sido usado como adjuvante no tratamento de leucemia promielocítica aguda com excelentes índices de remissão da doença. Este composto exerce atividade antiproliferativa em diversos tipos de tumores. Entretanto, células de adenocarcinoma de pulmão humano em geral exibem uma forte resistência aos efeitos da tretinoína, a qual pode estar relacionada com a deficiência na internalização celular de tretinoína nesse tipo de célula. Uma estratégia para aumentar a atividade antiproliferativa de tretinoína é aumentar a captação celular do composto através de carreadores como lipossomas ou outras vesículas como nanocápsulas ou nanoesferas. Neste trabalho nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tretinoína (TT-LCNC) foram avaliadas quanto ao seu potencial de inibir o crescimento, induzir a apoptose e interferir com o ciclo celular de células de adenocarcinoma de pulmão, linhagem A549, resistentes ao tratamento com TT livre. Os resultados demonstraram que TT-LCNC foi capaz de superar a resistência celular ao tratamento com TT, reduzindo a viabilidade celular e induzindo apoptose, superexpressão de P21 e parada do ciclo celular em G1.

Palavras-chave: Tretinoína, ácido retinóico, nanocápsulas, câncer de pulmão, P21

ABSTRACT

Schultze, Eduarda. **In Vitro Antitumor Activity of Tretinoin-Loaded Lipid-Core Nanocapsules on human lung adenocarcinoma cell line (A549)**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Retinoid derivatives and analogs have been widely studied as antitumor agents due to their effects on cell proliferation and differentiation. Tretinoin (TT), also known as retinoic acid is a retinoid derivative that has been used as an adjuvant in the treatment of acute promyelocytic leukemia with excellent rates of remission. This compound has antiproliferative activity in various tumor types. However, non small cell lung cancer in general exhibit strong resistance to the effects of TT, which may be related to the deficiency in the cellular up-take of TT in that cell type. A strategy to enhance the antiproliferative activity of TT is to increase the cellular internalization of the compound through carriers such as liposomes or other vesicles or nanospheres or nanocapsules. Here we evaluated TT lipid-core nanocapsules (TT-LCNC) for their power to inhibit growth, induce apoptosis and interfere with the cell cycle of lung adenocarcinoma, A549 cell line, which is resistant to treatment with TT. The results showed that TT-LCNC was able to overcome the cellular resistance to treatment with TT, reducing cell viability and inducing apoptosis, upregulation of P21 and cell cycle arrest in G1 phase.

Keywords: tretinoin, retinoic acid, nanocapsules, lung cancer, P21.

Lista de Figuras

Resumo gráfico.....	42
Figura 1 Efeito das TT-LCNC sobre a proliferação das células de linhagem A549	43
Figura 2 Análise morfológica das células de linhagem A549 após 72h de incubação com 20 μ M de TT, TT-LCNC e LCNC	44
Figura 3 Tratamento com TT-LCNC aumenta a taxa de morte celular sobre células de linhagem A549	45
Figura 4 Indução de apoptose por TT-LCNC em células de linhagem A549	46
Figura 5 Perfil de expressão gênica de células A549 tratadas com TT, TT-LCNC e LCNC	47
Figura 6 Indução de parada do ciclo celular por TT-LCNC	48

Lista de Tabelas

Tabela 1	<i>Primers</i> utilizados para reação de PCR em tempo real	41
----------	--	----

Lista de abreviações:

Câncer de pulmão de células não-pequenas - NSCLC

Elementos responsivos ao ácido retinóico – RARE

Elementos responsivos a retinóides X - RXRE

Fator de ativação de apoptose 1 – Apaf-1

Fator de necrose tumoral - TNF

Nanocápsulas de núcleo lipídico - LCNC

Nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tretinoína – TT-LCNC

Receptor de ácido retinóico – RAR

Receptor retinóide X – RXR

Tretinoína - TT

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Câncer	11
1.2. Terapias antitumorais.....	12
1.3. Apoptose	12
1.4. Parada do ciclo celular.....	14
1.5. Tretinoína	15
1.6. Câncer de Pulmão	17
1.7. Nanocarreadores	18
2. OBJETIVOS:.....	21
3. ARTIGO	22
ABSTRACT	24
1. INTRODUCTION	25
2. MATERIALS AND METHODS	27
2.1 Preparation of nanocapsules	27
2.2 Characterization of nanocapsules.....	27
2.3.Cell Culture	28
2.4. Determination of cytotoxicity by MTT assay	28
2.5 Viability assessment and LIVE/DEAD assay.....	29
2.6. Measurement of apoptosis by Annexin V staining.....	30
2.7. Cell cycle analyses	30
2.8. RNA extraction, cDNA synthesis and Real-Time PCR	30
2.9. Data analysis	31
3. RESULTS	32
3.1. Production and characterization of lipid-core nanocapsules	32
3.2. TTN-LNC inhibited cell proliferation of A549 cells.....	32
3.3. TTN-LNC alters morphology of A549 cells	32
3.4. TTN-LNC reduces the cell viability.....	33
3.5 Apoptosis induction by TTN-LNC on A549 cells	33

3.6 Analysis of gene expression	33
3.7. TTN-LNC-induced cell cycle arrest	34
4. DISCUSSION	34
5. CONCLUSION	37
ACKNOWLEDGMENTS	37
REFERENCES	38
4. CONCLUSÃO	49
5. REFERÊNCIAS	50

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

Câncer é o termo utilizado para um conjunto de doenças em que as células se dividem de maneira anormal, descontrolada e com capacidade de invadir outros tecidos que não o seu de origem (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2013). Dados da Organização Mundial da Saúde indicam que são esperados para 2030, 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. No Brasil, as estimativas mais recentes, de 2012, que valerão também para o ano de 2013, apontam a ocorrência de cerca de 518.000 casos novos de câncer. Dentre os tipos de câncer mais incidentes estão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon/reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireóide para o sexo feminino (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2013).

A carcinogênese envolve alteração no DNA de uma ou mais células normais, geralmente em genes de controle do crescimento, levando a um crescimento celular autônomo e descontrolado. Durante o desenvolvimento do câncer, as células adquirirão algumas características biológicas que sustentam esse processo. Estas características incluem sinalização proliferativa sustentada, evasão de supressores de crescimento, resistência à morte celular, indução de angiogênese, imortalidade replicativa e capacidade de invasão e metástase. Esses processos são acompanhados por uma instabilidade genômica e pela presença de inflamação no local, o que culmina por acelerar e agravar o desenvolvimento da neoplasia (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). Os autores citam ainda duas outras características importantes na manutenção da carcinogênese: a capacidade de reprogramação do mecanismo energético, o que permite a sobrevivência de células mais internas de tumores sólidos, onde há acesso limitado aos nutrientes, e a capacidade de evasão do sistema imune. Qualquer uma dessas características pode ser alvo de terapias antitumorais (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011).

1.2. Terapias antitumorais

O que se espera de uma terapia antitumoral é uma alta capacidade de inibir a proliferação das células alteradas, um eficiente índice de remissão do tumor e uma baixa incidência de efeitos colaterais. Duas abordagens que vem sendo muito descritas na literatura para o tratamento de diversos tipos de câncer são: a indução de diferenciação celular, o que leva as células a retomarem o seu estado de crescimento controlado e a reduzirem sua taxa de proliferação (BROWN; HUGHES, 2012) (NIU et al., 2010); e a indução de parada permanente do ciclo celular, chamada senescência celular. Entretanto, a ação mais comum de um agente terapêutico antitumoral é a indução de apoptose.

1.3. Apoptose

Apoptose é um mecanismo de morte celular controlado geneticamente, que está envolvido na regulação da homeostase tecidual (VANGESTEL et al., 2009). A apoptose pode ser desencadeada por diferentes estímulos como estresse celular e outras formas de dano, sinalização mediada por outras células ou privação de fatores de crescimento (ELMORE, 2007). Existem duas rotas apoptóticas principais: uma via extrínseca, da qual faz parte a ativação de receptores como o Fas ou o receptor de TNF, e a via intrínseca, que está relacionada com danos internos à célula, como danos ao DNA e ao citoesqueleto. A via extrínseca é iniciada pela ativação de receptores de morte na superfície celular, os quais desencadeiam uma cascata de sinalização que envolve a ativação da caspase 8 (VANGESTEL et al., 2009).

As caspases (cysteine-aspartic proteases) são uma família de cisteíno-proteases que são sintetizadas na forma inativa de pró-caspases e são ativadas quando interagem com proteínas específicas. Estas proteases são responsáveis por clivar outras proteínas em domínios específicos após resíduo de ácido aspártico (LAMKANFI et al., 2007). Quando recrutada pela cascata da via extrínseca, a caspase 8 ativa a caspase 3. A ativação da caspase 3 leva a degradação de

proteínas celulares necessárias para a manutenção da sobrevivência e integridade celular (ELMORE, 2007). A via intrínseca de ativação das caspases acontece quando uma série de estímulos pró-apoptóticos culminam com a liberação do citocromo c pela mitocôndria, independentemente da ativação da caspase 8. O Citocromo c interage com as proteínas Apaf-1 e Caspase 9 para promover ativação da caspase 3. As caspases 3, 6 e 7 são caspases efetoras que clivam substratos protéicos, incluindo lâmina nuclear e moléculas de actina do citoesqueleto, ativando os processos apoptóticos (ADAMS; CORY, 2007).

A célula que entra na rota apoptótica tem as seguintes características: condensação do núcleo e do citoplasma, sem alterações das organelas até quase o final do processo; formação de circunvoluções na membrana; formação de corpos apoptóticos, não ocorrendo extravasamento do material citoplasmático; e a célula morta normalmente é encontrada entre células vivas e é removida do tecido por células vizinhas ou por fagócitos especializados, frente à exposição de sinais de reconhecimento em sua superfície (VANGESTEL et al., 2009). Entre os sinais de reconhecimento pelos fagócitos está a externalização do fosfolípido aniônico, fosfatidilserina, a qual é muito utilizada como marcador de apoptose em testes *in vitro*. (WLODKOWIC; SKOMMER; DARZYNKIEWICZ, 2012).

Muitos agentes antitumorais agem induzindo apoptose (VANGESTEL et al., 2009). Entretanto, muitas células tumorais desenvolveram mecanismos de resistência à morte celular e, portanto, ao tratamento com agentes indutores de apoptose. Um dos mecanismos tumorais mais comuns de evasão da apoptose é a perda da função do gene supressor tumoral *TP53* (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). Este gene codifica a proteína P53, que desencadeia a rota apoptótica em resposta a danos no DNA. Com essa proteína afuncional, a célula perde um importante mecanismo de checagem de dano celular. As células cancerígenas podem, ainda, aumentar a expressão de genes anti-apoptóticos, como o *Bcl-2*, e fatores de crescimento, através da regulação negativa de agentes pró-apoptóticos, como o *Bax*.

Outras formas de morte celular programada têm sido amplamente descritas (MADDIKA et al., 2007) (LEIST; JAATTELA, 2001). A chamada morte celular semelhante à apoptose ocorre sem a ativação de caspases efetoras e possui

características semelhantes às células apoptóticas como condensação da cromatina e presença de moléculas de reconhecimento para fagócitos. Existe ainda outra forma de morte independente de caspases, que cursa sem a condensação da cromatina, mas com outras características apoptóticas, como a redução do potencial transmembrana mitocondrial e a externalização de fosfatidilserina (MATEO et al., 1999). Considerando que muitas células cancerígenas apresentam deficiências nas rotas apoptóticas comuns, drogas potenciais que agem em outras rotas de morte estão emergindo (LEIST; JAATTELA, 2001).

1.4. Parada do ciclo celular

Ainda que a maioria das terapias anticancerígenas vise matar as células alteradas, uma opção terapêutica interessante é a indução de parada do ciclo celular, fazendo com que as células não se dupliquem (JAIN et al., 2013). O ciclo celular é um processo altamente controlado pelo qual a célula passa a fim de fazer a duplicação do DNA e subsequente divisão celular. Este processo pode ser dividido em interfase e fase M (de mitose). A interfase pode ser dividida ainda em quatro períodos principais: G0, G1, S e G2. Chama-se G0 o período em que a célula não recebe estímulos de divisão, podendo permanecer nesta fase por horas, dias ou por uma vida inteira, como as células neuronais. G1 é a fase em que a célula está se preparando para duplicar seu DNA. Nesta fase, a célula responde a estímulos positivos ou negativos, sendo levada ao crescimento, à diferenciação, à multiplicação ou à apoptose, bem como à produção de enzimas e outras moléculas necessárias para a próxima fase do ciclo, a fase de síntese. Na fase S ocorre a duplicação do DNA. Na fase G2 ocorre a síntese de RNA, de proteínas e de outras estruturas necessárias para o início da divisão celular (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003) (MADDIKA et al., 2007).

Na maioria das células, há vários pontos no ciclo celular, chamados pontos de checagem, em que o ciclo pode ser detido ou atrasado se eventos anteriores não foram concluídos. Por exemplo, a entrada em mitose é impedida se a replicação do DNA não for completa, e a separação dos cromossomos na mitose pode ser atrasada se alguns cromossomos não estiverem devidamente ligados ao fuso

mitótico. A progressão através de G1 e G2 é atrasada por mecanismos de bloqueio se o DNA nos cromossomos estiver danificado por radiação ou compostos químicos. Atrasos nesses pontos de verificação de danos ao DNA proporcionam tempo para que o DNA danificado possa ser reparado. Após a liberação do mecanismo de trava do ciclo celular, a progressão ao longo da fase continua. Estes pontos de checagem evitam que a célula duplique descontroladamente, acumulando danos que podem transformar a célula numa célula tumoral (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

Os pontos de verificação são ainda importantes por outros fatores. É através deles que o sistema de controle pode ser regulado por sinais extracelulares de outras células. Esses sinais, que podem promover ou inibir a proliferação celular tendem a agir regulando a progressão através de um ponto de controle em G1. Além disso, a maioria das mudanças genéticas que promove a tumorigênese envolve uma desregulação da progressão do ciclo celular em G1 (FOSTER et al., 2010).

Muitos agentes terapêuticos que induzem parada irreversível do ciclo celular, chamada de senescência celular têm sido estudados (VANGESTEL et al., 2009). Um exemplo é a Tretinoína, ou ácido retinóico, um derivado de vitamina A que, dentre outras ações, induz parada do ciclo celular em G1 (SOPRANO; QIN; SOPRANO, 2004).

1.5. Tretinoína

Tretinoína (TT), ou ácido retinóico, é um metabólito ativo de vitamina A (retinol) que desempenha um papel importante na mediação do crescimento e diferenciação de células normais e transformadas. Esse composto é essencial para diversas funções biológicas como crescimento, visão, reprodução, desenvolvimento embrionário, diferenciação de tecidos epiteliais, e respostas imunológicas (SOPRANO; QIN; SOPRANO, 2004). Tretinoína, bem como muitos de seus análogos e derivados (chamados de retinóides), tem sido estudada através de ensaios clínicos, testes em animais de laboratórios, modelos celulares e através de abordagens epidemiológicas, apresentando um bom valor terapêutico em oncologia devido à sua ação antiproliferativa e de indução de diferenciação (ORLANDI et al., 2003).

Tretinoína tem a capacidade de induzir completa remissão na maioria dos pacientes com leucemia promielocítica aguda, através da indução de diferenciação dos blastos (REGO et al., 2013). Além disto, este composto tem se mostrado eficaz, sozinho ou por efeito sinérgico com outros agentes, contra diversos tipos de câncer, como câncer de cabeça e pescoço, câncer de células escamosas de boca e câncer de pulmão (HIGUCHI et al., 2003) (XU et al., 2008) (ARRIETA et al., 2010).

A ação da tretinoína se dá por modulação da transcrição gênica através da interação com receptores de ácido retinóico ($RAR\alpha$, β , γ), convertendo-os de repressores a ativadores da transcrição (ALTUCCI; GRONEMEYER, 2001). Estes receptores nucleares são codificados por genes distintos dentro do genoma e são membros da superfamília de receptores para hormônios esteróides e da tireóide. RAR são fatores de transcrição que atuam como heterodímeros com receptores retinóides X ($RXR\alpha$, β , γ) RAR - RXR , os quais podem ainda atuar como homodímeros RXR - RXR , e se ligam ao DNA em seqüências chamadas de elementos responsivos ao ácido retinóico (RAREs) ou elementos responsivos a retinóides X (RXREs), localizados na região promotora de genes alvo (SOPRANO; QIN; SOPRANO, 2004). RARs podem ser ativados tanto por tretinoína como por ácido 9-*cis*-retinóico, enquanto que os RXRs são exclusivamente ativados pelo ácido 9-*cis*-retinóico (BUSHUE; WAN, 2010). Três receptores ($RAR\alpha$, $RXR\alpha$ e $RXR\beta$) são largamente expressos, enquanto os outros ($RAR\beta$, $RAR\gamma$ e $RXR\gamma$) mostram um padrão de expressão mais complexo, tecido-específico. Assim, a maioria dos tecidos são alvos potenciais da ação dos retinóides (RHINN; DOLLE, 2012).

Muitos estudos têm demonstrado que o nível de expressão de $RAR\beta$ está reduzido em muitos tipos celulares de câncer e também em muitas amostras tumorais, incluindo câncer de pulmão (SOPRANO; QIN; SOPRANO, 2004) (XU, 2007). Este nível reduzido de $RAR\beta$ está relacionado com a tumorigênese e a resistência ao tratamento com retinóides. De fato, tem sido descrito que câncer de pulmão de células não pequenas, o qual apresenta resistência ao tratamento com ácido retinóico, apresenta também expressão reduzida de $RAR\beta$ (GERADTS et al., 1993) (INUI et al., 2003). Entretanto, a expressão deste receptor pode ser induzida por tretinoína (ALTUCCI et al., 2007) (RHINN; DOLLE, 2012).

1.6. Câncer de Pulmão

O câncer de pulmão é a principal causa mundial de mortes por câncer (BUNN, Jr., 2012). No Brasil, estimativas do Instituto Nacional do Câncer para 2012 prevêm 17.210 casos novos de câncer de pulmão em homens e 10.110 em mulheres. O tabagismo é a principal causa de câncer de pulmão e a cessação do tabagismo é o principal método de prevenção da mortalidade por esse tipo de neoplasia (BUNN, Jr., 2012). O câncer de pulmão é uma doença heterogênea com dois subtipos principais: o de células não pequenas (NSCLC), mais comum, sendo cerca de 85% dos casos, e o de células pequenas (SCLC). NSCLC compreende dois tipos: adenocarcinoma, mais comum em mulheres, especialmente fumantes, e carcinoma de células escamosas, mais frequente em homens e em idosos de ambos os sexos. Apesar dos avanços recentes feitos em oncologia clínica e experimental, o prognóstico de câncer de pulmão ainda é desfavorável, com uma taxa de sobrevida global em 5 anos de apenas cerca de 11% (ZHANG et al., 2012).

Vários fatores prognósticos independentes para a sobrevivência de pacientes com NSCLC foram identificados, como estado físico, estágio da doença, idade, sexo e quantidade de peso perdido, dos quais o mais importante é o estágio do tumor. Segundo a Aliança Global Contra o Câncer de Pulmão, o estadiamento do câncer de pulmão é definido como: estágio I – o câncer está presente somente em uma parte do pulmão; estágio II: a doença se disseminou para os gânglios linfáticos ou tecidos próximos; estágio III: o câncer se disseminou de forma mais extensa dentro do tórax e, em geral, para os gânglios linfáticos maiores; e estágio IV: o câncer se disseminou para outras partes do corpo, por exemplo, para o fígado ou ossos. Em estágio inicial NSCLC é tratado principalmente por ressecção cirúrgica, com quimioterapia adjuvante para pacientes em estágio IB, II e III da doença (GADGEEL; RAMALINGAM; KALEMKERIAN, 2012). No entanto, mesmo na fase inicial da doença, cerca de 30% dos pacientes sofrem de recidiva e morrem dentro de 5 anos de cirurgia. Pacientes com NSCLC localmente avançado de estágio III são normalmente tratados com terapia combinada de diferentes modalidades. NSCLC avançado ainda é uma doença incurável.

O câncer de pulmão é um tipo de neoplasia para a qual está sendo estudada a utilização de TT. Em ensaio clínico de fase II em pacientes com NSCLC foi demonstrado que o tratamento com TT aumentou a taxa de resposta, bem como prolongou o tempo de sobrevida livre de progressão (ARRIETA et al., 2010). Entretanto, muitas células tumorais pulmonares exibem resistência ao tratamento com TT (GERADTS et al., 1993), a qual pode estar relacionada com a redução da expressão de RAR α e β (INUI et al., 2003) e com a deficiência na internalização celular deste composto (KAWAKAMI et al., 2006). Tem-se proposto que a superação da resistência celular possa ser alcançada através do uso de sistemas eficientes de entrega de drogas, como lipossomas ou nanocápsulas (GAO; ZHANG; SUN, 2012).

1.7. Nanocarreadores

Uma abordagem pela qual o interesse dos pesquisadores da área da oncologia celular vem aumentando é o uso de carreadores de escala nanométrica. Dentre vários benefícios que esses carreadores podem apresentar, destacam-se o aumento da seletividade de um agente terapêutico, a melhora na sua solubilidade e estabilidade e a redução de seus efeitos colaterais (SULTANA et al., 2012). Vários pesquisadores vêm estudando a associação de tretinoína (TT) a nanocarreadores a fim de aprimorar suas atividades antitumorais (OURIQUE et al., 2010) (CHANSRI et al., 2008) (TRAPASSO et al., 2009), bem como superar a resistência que algumas células apresentam ao tratamento (KAWAKAMI et al., 2006). Além disso, tretinoína é um composto que isomeriza dependendo das condições do meio e que apresenta uma fotosensibilidade elevada, características que podem ser atenuadas por sistemas de entrega de droga que estabilizam o composto (BUSHUE; WAN, 2010) (TRAPASSO et al., 2009).

Kawakami et al. (2006) demonstraram que a incorporação de tretinoína em lipossomas catiônicos compostos por DOTAP/colesterol foi capaz de superar a resistência apresentada pelas células de linhagem de adenocarcinoma de pulmão (A549) aos efeitos inibidores de crescimento de tretinoína livre (KAWAKAMI et al., 2006). Os autores discutiram que esta superação da resistência se deveu ao aumento da internalização celular do composto promovido pela incorporação aos

lipossomas. Entretanto, a instabilidade inerente dos carreadores a base de lípidos na presença de componentes do soro resulta na liberação rápida e instantânea das drogas quimioterápicas, o que tem limitado a sua utilização como sistema de entrega de agentes terapêuticos para tratamento do câncer (JOO et al., 2013). Além disso, ainda que lipossomas catiônicos proporcionem uma maior taxa de absorção celular do que os aniônicos e neutros, aqueles são removidos mais rapidamente pelos rins do que estes e apresentam uma interação eletrostática forte com proteínas plasmáticas, o que pode resultar em agregação (GAO; ZHANG; SUN, 2012). Dessa forma, outros nanocarreadores tem sido estudados para servirem de sistema de entrega de tretinoína, bem como outros retinóides.

Nanoesferas e nanocápsulas tem sido largamente estudadas para o uso como carreadores de agentes terapêuticos. Nanoesferas são definidas como uma estrutura polimérica matricial onde drogas podem ser fisicamente aprisionadas ou dispersas. Nanocápsulas, entretanto, são caracterizadas por um núcleo lipofílico envolvido por uma camada polimérica, nas quais as drogas podem estar dissolvidas no núcleo lipofílico, dispersos no interior da partícula ou adsorvidos na interface partícula/água.

Em 2008, nanocápsulas de tretinoína foram produzidas a fim de avaliar o benefício desta formulação na fotoestabilidade do composto (OURIQUE et al., 2008). No entanto, esta formulação apresentou uma estabilidade limitada na armazenagem. Foram produzidas então, em 2010, nanocápsulas de núcleo-lipídico contendo tretinoína (TT-LCNC), e sua estabilidade físico-química, bem como efeitos fotoprotetores frente à exposição da droga à radiação UV foram avaliados (OURIQUE et al., 2010). Esta formulação apresentou uma alta estabilidade físico-química, característica aquosa e fotoestabilidade adequada sobre radiação UVA e UVB. Além disso, TT-LCNC se mostrou mais eficiente a longo prazo quando comparada com tretinoína livre em tratamento de linhagem celular de células de leucemia promielocítica aguda. Os autores consideraram TT-LCNC como um inovador e promissor sistema terapêutico nanométrico para a administração parenteral de tretinoína no tratamento de pacientes com leucemia pró-mielocítica aguda.

Os benefícios apresentados pela nanoencapsulação de TT em nanocápsulas de núcleo lipídico frente a sua estabilidade e ação antitumoral em células leucêmicas, bem como os benefícios apresentados por outras nanoformulações de TT frente a sua ação antitumoral em células resistentes, justificam o uso da formulação de TT-LCNC para avaliação do efeito antitumoral sobre células de adenocarcinoma de pulmão resistentes ao tratamento com TT.

2. OBJETIVOS:

Geral:

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a superação da resistência de células de adenocarcinoma de pulmão (A549) ao efeito antitumoral de TT *in vitro*, através da utilização de nanocápsulas de núcleo lipídico (TT-LCNC).

Específico:

Utilizando-se células de adenocarcinoma de pulmão, linhagem A549, buscou-se avaliar:

- 1- A capacidade antiproliferativa *in vitro* de uma formulação já caracterizada de tretinoína nanoencapsulada;
- 2 - A capacidade da nanoformulação de induzir apoptose nestas células;
- 3 – A capacidade desta formulação de interferir com o ciclo celular e;
- 3 – A indução ou repressão da transcrição de genes relacionados à ativação ou inibição das rotas apoptóticas e vias de controle do ciclo celular.

3. ARTIGO

O presente artigo foi formatado com as normas do periódico

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics

Encapsulation in lipid-core nanocapsules overcomes lung cancer cell resistance to tretinoin

Eduarda Schultze^{a,#}, Aline Ourique^{b,#}, Virginia Campello Yurgel^a, Karine Rech Begnini^a, Helena Thurow^a, Priscila Marques Moura de Leon^a, Vinicius Farias Campos^a, Odir Antônio Dellagostin^a, Silvia R. Guterres^b, Adriana R. Pohlmann^{b,c}, Fabiana Kömmling Seixas^a, Ruy Carlos Ruver Beck^{b,*}, Tiago Collares^{a,*}

^a *Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB), Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular, Biotecnologia/Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil*

^b *Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre, 90610-000, RS, Brazil*

^c *Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, PBox 15003, Porto Alegre, 91501-970, RS, Brazil*

* Corresponding authors:

Tiago Collares, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Capão do Leão, RS, Brazil, Cep: 96010-900. RS, Brazil; E-mail: collares.t@gmail.com; Phone number: +555332757350; Ruy Carlos Ruver Beck, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre, 90610-000, RS, Brazil; Email: ruy.beck@ufrgs.br

Word Count: 5395

Number of tables: 1

Number of Figures: 6

1

¹ Abbreviations: LNC – lipid-core nanocapsules; TTN – tretinoin; TTN-LNC – tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules

ABSTRACT

Tretinoin is a retinoid derivative that has antiproliferative effect on several kinds of tumors. Human lung adenocarcinoma epithelial *cell line (A549) exhibit a profound resistance to the effects of tretinoin. Nanocarriers seem to be a good alternative to overcome cellular resistance to drugs. The aim of this study was to test whether tretinoin-loaded lipid core nanocapsules exert an antitumor effect on A549 cells. A549 cells were incubated with free tretinoin (TTN), blank nanocapsules (LNC) and tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules (TTN-LNC). Data from evaluation of DNA content and Annexin V binding assay by flow cytometry showed that TTN-LNC induced apoptosis and cell cycle arrest at the G1-phase while TTN did not. TTN-LNC showed higher cytotoxic effects than TTN on A549 cells evaluated by MTT and Live/Dead cell viability assay. Gene expression profiling identified up regulated expression of gene P21 by TTN-LNC, supporting the cell cycle arrest effect. These results showed for the first time that TTN-LNC are able to overcome the resistance of adenocarcinoma cell line A549 to treatment with TTN by inducing apoptosis and cell cycle arrest, providing support for its use in applications on lung cancer therapy.*

Keywords: tretinoin; apoptosis, nanocapsules; P21; antitumor activity.

1. INTRODUCTION

Retinoids are metabolites of vitamin A that play many roles in the body. Retinoids analogs and derivatives have been extensively investigated as promising anticancer agents due to their antiproliferative and prodifferentiation effects [1] [2] [3] [4]. Tretinoin (TTN) also known as all-*trans* retinoic acid is a naturally occurring retinoid that plays an essential role in regulation of differentiation, growth, and development of normal and malignant epithelial cells in various tissues [5]. TTN and its derivatives have been recognized as a group of cancer chemopreventive and therapeutic agents [6] [6]. It have been used as effective agent to induce remission in patients with acute promyelocytic leukemia [7] [7]. This compound also has effect in other types of tumor as solid tumor [7], brain tumor stem cells [8] and squamous cells carcinoma [9]. The mechanism of action is mainly through regulation of gene expression by nuclear receptors, known as retinoic acid receptors (RAR), which have three subunits called RAR α , β and γ [4]. RARs form heterodimers with another type of nuclear receptors, retinoid X receptors (RXRs) and bind to retinoic acid response elements (RAREs) in the promoter region of target genes [6]. Tretinoin binds to RAR subunit of heterodimer RAR-RXR and induces transcription. These receptors can also interact with other pathways independently of interaction with RAREs [10].

Lung cancer is a heterogeneous disease with two main subtypes: non-small cell lung cancer (NSCLC) and small cell lung cancer (SCLC). NSCLC can be subdivided in adenocarcinoma, squamous-cell lung carcinoma, and large-cell lung carcinoma. The treatment for this type of cancer depends on the stage of disease and includes surgery, radiotherapy and chemotherapy. TTN has aroused a deep interest as a potential therapeutic agent for lung cancer [11] [12]. However many

NSCLC exhibited a *profound resistance to the effects of tretinoin* [13]. *The intracellular delivery of tretinoin may be involved in this resistance* [14]. One strategy to overcome tretinoin resistance could be to enhance cellular uptake of this compound by its nanoencapsulation [14] [15].

TTN incorporated in DOTAP/cholesterol liposomes showed a potent cytotoxic effect on A549 cells, which are insensitive to the effects of free TTN [14]. This result was assigned to increased internalization of TTN promoted by the cationic liposomes. Further studies have investigated the benefits provided by incorporation into liposomes or other drug delivery systems compared to the action of free TTN [16]. However there are no reports on the use of tretinoin lipid-core nanocapsules TTN as a strategy to improve the antitumor effect on lung cancer cells.

Tretinoin loaded nanocapsules were reported in 2008 as having a significant protection of the drug against UVC radiation. However, the formulation showed a poor stability during storage, dropping the drug content below 90% after 1 month of storage [17]. To improve the physicochemical stability of tretinoin-loaded polymeric nanocarriers our group changed the type of nanocapsules, preparing a lipid-core nanocapsules containing TTN. Lipid-core nanocapsules are polymeric nanocapsules present a core composed of a dispersion of a liquid lipid, capric/caprylic triglyceride, and a solid lipid, sorbitan monostearate. TTN-LNC was described as having high physicochemical stability and others important characteristics such as aqueous characteristics, which is desirable for a formulation for parenteral use [18]. Besides that TTN-LNC showed an adequate photostability under UVA and UVC exposition protecting the drug during the manipulation and/or the administration procedure. These are relevant characteristics considering the TTN instability against UV radiation and its high hydrophobicity and low aqueous solubility.

Taking all our previous results on the feasibility to encapsulate tretinoin in aqueous dispersions by its nanoencapsulation into account, the aim of this study was to test if tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules would be able to overcome the tretinoin resistance of human lung adenocarcinoma epithelial cell line, A549 to TTN treatment.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Preparation of nanocapsules

TTN-LNC were prepared as described before [18] by interfacial deposition of polymer, using poly(ϵ -caprolactone) at 1% (w/v) as a biodegradable polymer. Two hundred fifty mg of polymer, 0.77% (w/v) of sorbitan monostearate, 3.3% (v/v) of caprylic/capric triglyceride mixture and 0.05% (w/v) of tretinoin were dissolved in 67 mL of acetone. This organic solution was added to 134 mL of an aqueous phase containing 0.77% (w/v) of polysorbate 80 under moderate magnetic stirring during 10 minutes. Acetone was removed and the aqueous phase concentrated by evaporation at 40°C under reduced pressure to obtain 25 mL. The concentration of tretinoin was set to 0.5 mg.mL⁻¹. Blank lipid-core nanocapsules (LNC) were prepared in a similar way, but without the addition of the drug into the organic phase. All preparations were kept protected from the light during all the time.

2.2 Characterization of nanocapsules

Characterization of nanocapsules was previously described for three independent batches [18]. In the present study we confirm the following characteristics: particle size, polydispersity index, zeta potential and drug content. Particle size as well as the polydispersity index (PDI) were analyzed by photon

correlation spectroscopy (PCS) (Zetasizer[®] Nanoseries ZEN3600, Malvern Instruments, Worcestershire, England) after adequate dilution (1:500, v/v) of an aliquot of the suspension in filtered water (0.45 µm, Millipore, Bedford, USA). The zeta potential (ζ-potential) (Zetasizer[®] Nanoseries ZEN3600, Malvern Instruments, Worcestershire, England) measurements were performed at 25°C according to the electrophoretic mobility principle after diluting (1:500, v/v) the samples with a filtered (0.45 µm, Millipore, Bedford, USA) 10 mM NaCl aqueous solution. Drug content was evaluated by HPLC according to the method previously validated [20].

2.3. Cell Culture

The human lung adenocarcinoma cells (A549) were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (PABCAM, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil). They were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), purchased, respectively from Vitrocell Embriolife (Campinas, Brazil) and Gibco (Grand Island, NY, USA). Cells were grown at 37°C in an atmosphere of 95% humidified air and 5% CO₂. The experiments were performed with cell in the logarithmic phase of growth.

2.4. Determination of cytotoxicity by MTT assay

The viability of the A549 cell line was determined by measuring the reduction of soluble MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] to water insoluble formazan [19]. A549 cells were seeded on a 96-well cluster dish at a density of 1×10^4 cells per well and grown at 37°C in a 5 % CO₂ atmosphere. Twenty-four hours later, cells were incubated with medium containing tretinoin (TTN), blank lipid-core nanocapsules (LNC) or tretinoin-loaded lipid-core nanocapsule (TTN-LNC)

at various concentrations (1, 5, 10 and 20 μ M) for 24, 48 and 72 h at 37 °C. After these periods cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS; Gibco[®], Carlsbad, USA); five mg/mL of MTT solution was added to each well and cells were incubated for 3 h at 37 °C in 5% CO₂. The medium was removed and then 200 μ L of DMSO was added to each well, in order to dissolve formazan crystals using a shaker for 20 min at 150 rpm. The absorbance of each well was read on a microplate reader at a wavelength of 492 nm. The inhibition (%) of cell proliferation was determined as follows: growth inhibition rate (%) = $[1 - (\text{Abs}_{492} \text{ treated cells} / \text{Abs}_{492} \text{ control cells})] \times 100$ [19]. Obtained results are a media of three independent experiments in triplicates for each experiment.

2.5 Viability assessment and LIVE/DEAD assay

The LIVE/DEAD cell viability assay (Invitrogen[™], Carlsbad, USA) was conducted following the manufacturer's instructions. Live cells were able to take up calcein and could be analyzed by green fluorescent light emission (488 nm). Ethidium bromide homodimer diffuses through the now permeable membrane of dead cells and binds to DNA, which was detected by the red fluorescent signal (546 nm). The LIVE/DEAD assay was analyzed with a fluorescence microscope Olympus IX71 (Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) by multicolour imaging. After excitation at 480 nm and emission at 510 nm the fluorescent images were stored as TIFF files using a digital camera (Olympus, Tokyo, Japan) attached to a fluorescence microscope (DP 12; IX 71; Olympus, Tokyo, Japan). The recorded images was analyzed using Cell[^]F software (Cell[^]F, Olympus, Tokyo, Japan). The data were expressed as the mean $\pm$ SEM of percentage of dead cell, based 3 different fields of view, with 100 cells in each field.

2.6. Measurement of apoptosis by Annexin V staining

The A549 cells were seeded on a 6-well cluster dish at a density of 1×10^5 cells per well. Twenty-four hours later, the medium containing 5 or 20 μM of TTN, LNC, or TTN-LNC was added to the plates. After 72h of incubation, cells were trypsinized, collected and centrifuged. After washing in phosphate-buffered saline, the viable cell number in each well was counted using the Guava ViaCount Assay (Guava Technologies, Industrial Boulevard Hayward, USA). Apoptosis was assessed by using the Guava Nexin kit and the Guava TUNEL assay (Guava Technologies, Industrial Boulevard Hayward, USA).

2.7. Cell cycle analyses

Cells (2×10^5 cells per well) were cultured in triplicate in 6-well plates by 24 hours and synchronized by growing without serum for additional 24 hours. Cells were pre-incubated with 5 and 20 μM of TTN and TTN-LNC, as well as the relative amounts of LNC for 24h. After this, for flow cytometry analysis using Guava Cell Cycle Reagent (EMD Millipore Corporation, Billerica, USA), supernatant and cells were harvested, fixed with 70% ethanol and stained according to manufactures. Data acquisition and analysis were performed on flow cytometer (guava easyCyte™ Plus, EMD Millipore Corporation, Billerica, USA).

2.8. RNA extraction, cDNA synthesis and Real-Time PCR

To evaluate the gene expression profile of cell cycle-related, apoptotic, and oxidative stress-related genes, total RNA extraction and cDNA was synthesized as previously described [20]. Cells were seeded on a 6-well cluster dish at a density of

1×10^5 cells per well and grown at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere. Cells were then incubated for 72h with 5 and 20 μM of TTN, TTN-LNC or LNC. After the incubation period, RNA samples were isolated using TRIzol[®] Reagent (Invitrogen[™], Carlsbad, USA) and samples were DNase-treated with a DNA-free[®] kit (Ambion[®], Carlsbad, USA). First-strand cDNA synthesis was performed with 2 μg of RNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems[®], Carlsbad, USA). All steps described were performed according to the manufacturer's protocol.

Real-Time PCR reactions were run on a Stratagene[®] Mx3005P[™] Real-Time PCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems[™], UK) using primers described in Table 1. Initial validation experiments were conducted to ensure that all primer pairs had equivalent PCR efficiencies. Amplification was carried out at cycling conditions of 95°C for 2 min, followed by 40 cycles of at 95°C for 15 sec, 60°C for 60 sec followed by conditions to calculate the melting curve. The real-time PCR data were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method, according to [21].

2.9. Data analysis

Data sets were analyzed using a factorial ANOVA followed by a Tukey test for multiple comparisons. Three treatments were considered: free tretinoin, blank nanocapsules and tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules. Chi-square was used to analyze the cell cycle data. Significance was considered at P value < 0.05 in all analyses. All data were expressed as mean $\pm$ SEM.

3. RESULTS

3.1. Production and characterization of lipid-core nanocapsules

Formulations of TTN-LNC were previously described [18]. Each preparation used in the present study was evaluated regarding their drug content, showing values between 0.45 and 0.55 mg.mL⁻¹, in accordance with the theoretical value (0.5 mg.mL⁻¹). Encapsulation efficiency of tretinoin in lipid-core nanocapsules was previously reported as higher than 99.9% [18]. Mean particle sizes were below 250 nm (225 ± 2 nm and 208 ± 2 nm for TTN-LNC and LNC, respectively). Low polydispersity indices (0.08 ± 0.01 and 0.15 ± 0.01 for TTN-LNC and LNC) showed an adequate homogeneity of the particle sizes. Zeta potential were negative, regardless the presence of the drug (-12.7 ± 0.9 mV and -11.0 ± 0.6 mV for TTN-LNC and LNC)

3.2. TTN-LNC inhibited cell proliferation of A549 cells

The results from MTT assay showed that incubation with TTN by 24h, 48h or 72h did not induce cytotoxicity on A549 cells, confirming the resistance of these cells to treatment. However TTN-LNC showed a dose-dependent cytotoxicity with an inhibition rate upper to 50% with concentration of 20 µM. At 72h the inhibition rate of 20 µM of TTN and TTN-LNC as well as the equivalent volume of LNC was respectively 14.0%, 64.2% and 11.2% (Fig. 1).

3.3. TTN-LNC alters morphology of A549 cells

A549 cells are human alveolar basal epithelial cells, squamous in nature and grow adherently, as a monolayer, in vitro. Cells treated with TTN-LNC showed

apoptotic morphology such as loss of attachments to other cells and extracellular matrix and rounding up. Cells incubated with TTN or LNC were similar to control (Fig. 2).

3.4. TTN-LNC reduces the cell viability

The Figure 3 top panel shows that TTN-LNC reduces significantly the cell viability, while TTN and LNC did not affect the cell viability. Fig.3 bottom panel shows the mean of dead cells calculated from three different areas of the plate. Samples without treatment (A), with TTN (B) and with LNC (C) showed no more than 5% of dead cells, while sample incubated with TTN-LNC (D) showed an average of 38% of dead cells.

3.5 Apoptosis induction by TTN-LNC on A549 cells

In order to analyze the apoptotic induction by TTN, LNC and TTN-LNC, A549 cells were assessed by flow cytometry with annexin V-PE/7-AAD staining. Figure 4 shows that cells treated with TTN-LNC showed a rate of 11% of early apoptosis and 24.8% of late apoptosis/dead cells. Cells treated with TTN and LNC showed a rate of apoptosis similar to control.

3.6 Analysis of gene expression

An evaluation of gene expression profile was performed to assess which pathway was involved in TTN-LNC cytotoxic effect. Surprisingly, none of the apoptotic genes tested was significantly induced by TTN-LNC, except from P21 (Figure 5, D). Transcripts of P21 of cells treated with both concentration of 5 μ M and 20 μ M of TTN-LNC were increased more than 2-fold related to control (Figure 5).

3.7. TTN-LNC-induced cell cycle arrest

Data from flow cytometry of cells stained with propidium iodide showed that the population with the amount of DNA related to the G0/G1 phase of cell cycle was significantly increase in cells treated with TTN-LNC (Figure 5). Cells without treatment showed a rate of 49.6% of cells in G0/G1 phase, while cells incubated for 24 h with TTN-LNC showed a rate of 57.8% of cells in G0/G1 phase. Consequently, the rate of cells in S and G2/M phase decreased related to control (9.93% and 25.73% from TTN-LNC treatment versus 13.98% and 30.68% from control). Unexpectedly, the treatment with LNC also increased significantly the rate of cells in G0/G1 phase (60.5%), which needs to be better understood. Additionally the presence of Sub-G1 population is representative of apoptotic cells. Wells incubated with TTN-LNC showed significantly more apoptotic cells.

4. DISCUSSION

A large number of studies have investigated tretinoin therapy in combination with chemotherapy on different kinds of tumors showing a promising therapeutic value [12] [22] [23] [24]. However many lung cancer cells exhibit resistance to TTN, which may explain why some patients do not respond well to treatment [13] [25]. In this study we demonstrate by the first time that a formulation of tretinoin-loaded lipid core nanocapsules may overcome the cell resistance showed by human adenocarcinoma epithelial cell line (A549) to TTN anticancer effects. The formulation evaluated in this study was previously developed [18]. However, we confirm some of their important properties before use in the present study. Formulations showed feasible properties, as particle size below 250 nm, low polydispersity indices (< 0.25)

and negative zeta potential, regardless the presence of the drug. These characteristics are according to our previous study [18] and allow us to investigate their properties against lung cancer cells.

The MTT assay was performed to detect cytotoxic effect of free tretinoin (TTN), TTN-LNC and unloaded-nanocapsules (LNC). TTN did not show inhibition of cell growth at all tested concentrations, confirming the cell resistance for this compound. TTN-LNC was able to increase significantly the rate of growth inhibition even with lowest concentrations. However, the treatment with LNC also showed a reduction in the number of viable cells, which was not sustained over the time. This result may indicate an interference of nanocapsules in cell metabolism or even interference in cellular MTT uptake. Nevertheless, TTN-LNC showed significantly higher growth inhibition than LNC, which reflect an additional activity. Furthermore, in treatment with LNC the percentage of non viable cells evaluated by Live/Dead assay was similar to control, while in treatment with TTN-LNC this percentage was significantly higher, showing that LNC did not affect cell viability.

TTN exerts anti-cancer activities mainly because of its differential effects and control of cell proliferation. However, a large number of studies have demonstrated that TTN induces apoptosis of cancer cells [7] [26]. Here we demonstrated that TTN did not induce apoptosis on A549 cells at tested concentrations, but analyses of Annexin-V/7-AAD staining as well as DNA fragmentation by flow cytometry showed that TTN-LNC increases significantly this rate. These results supported the benefits of TTN encapsulation on its anti-tumor effect.

Apoptosis is one of the programmed cell death process targeted by the antitumor agents. Many therapies as chemotherapy and radiotherapy induce cellular stress and DNA damage, triggering the intrinsic apoptotic pathway [27]. This pathway

is mediated by the mitochondria and controlled by the balance and interactions between pro- and antiapoptotic members of the Bcl-2 family proteins, such as Bax and Bcl-2 [28]. The results of expression analyses showed that the transcripts of anti- and pro-apoptotic genes, Bcl-2 and Bax were not significantly altered by the treatment, suggesting that the intrinsic apoptotic pathway was not activated.

Caspases are intracellular cysteine proteases which are cleaved and activated, causing most of the biochemical changes observed in apoptotic cells [29]. Apoptotic extrinsic pathway activates caspase 8 and apoptotic intrinsic pathway activates caspase 9. Both caspase 8 and 9 can activate effectors caspases, like caspase 3. Ours data showed that TTN-LNC does not induced up-regulation of caspase 3, 8 or 9 what suggest that the anticancer activity of this compound may not be through apoptosis dependent of Bcl-2 or caspases expression. Some reports have been showing other types of programmed cell death that may present apoptosis features by caspase-independent pathways [27] [30]. Transcriptional products of apoptosis induction factor (AIF) and Endonuclease G (Endo G), which are responsible for DNA degradation in caspase-independent apoptotic pathway, were also not increased by the treatments tested in this study.

Some studies have related the induction of p21 by retinoic acid [31]. Here we demonstrated that TTN-LNC up-regulated the p21 transcription and promoted cell cycle arrest at G1 phase of A549 cell line. p21 protein is a cyclin dependent kinase inhibitor that is able to inactivate cyclin dependent kinase 2 (CDK2), as well as interact with other proteins implicated in various cellular processes [32]. p21 blocks the expression of S phase specific genes through regulation of cyclin E CDK2 and arrest the cell cycle in G1 phase. This protein can also suppress the cell proliferation by other pathways such as interaction with DNA-polymerase δ subunit [32]. The

promoter region of *p21* gene contains many regulatory sequences. These sites provide a potential regulation of this gene by a large amount of inducers or repressors related to cell cycle and differentiation and stress, including retinoic acid. We suggest that TTN-LNC was able to enhance the internalization of TTN in A549 cells and that TTN induced expression of P21 by interacting with its receptor in the promoter region of the gene. *p21* expression is also regulated by the protein p53, however, the *p53* gene was not up-regulated by TTN-LNC. Induction of *p21* by TTN without induction of p53 and its association with differentiation, senescence and inhibition of cell proliferation has been reported [33] [34] [35].

Our results showed for the first time the ability of TTN-LNC overcome lung cancer cell resistance to TTN, providing support to future applications on lung cancer therapy. Due to complex activity of tretinoin on cancer cells, more studies are necessary to elucidate the exact mechanisms by which TTN-LNC was efficient to induce cell growth inhibition, decrease in cell viability and cell cycle arrest.

5. CONCLUSION

We conclude that TTN-LNC was able to overcome de resistance of adenocarcinoma cell line A549 to tretinoin, inducing apoptosis, reducing the cell viability and causing cell cycle arrest in G1 phase, by P21 up-regulation.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Brazilian funding agencies CAPES, CNPq and FAPERGS.

Competing interests: The authors have no conflict of interest.

REFERENCES

- [1] C. Chomienne, N. Balitrand, P. Ballerini, S. Castaigne, T.H. de, and L. Degos, All-trans retinoic acid modulates the retinoic acid receptor-alpha in promyelocytic cells, *J. Clin. Invest*, 88 (1991) 2150-2154.
- [2] M. Orlandi, B. Mantovani, K. Ammar, E. Avitabile, M.P. Dal, and G. Bartolini, Retinoids and cancer: antitumoral effects of ATRA, 9-cis RA and the new retinoid IIF on the HL-60 leukemic cell line, *Med. Princ. Pract.*, 12 (2003) 164-169.
- [3] L. Altucci and H. Gronemeyer, The promise of retinoids to fight against cancer, *Nat. Rev. Cancer*, 1 (2001) 181-193.
- [4] D.R. Soprano, P. Qin, and K.J. Soprano, Retinoic acid receptors and cancers, *Annu. Rev. Nutr.*, 24 (2004) 201-221.
- [5] M. Rhinn and P. Dolle, Retinoic acid signalling during development, *Development*, 139 (2012) 843-858.
- [6] N. Bushue and Y.J. Wan, Retinoid pathway and cancer therapeutics, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 62 (2010) 1285-1298.
- [7] M.C. Chen, C.Y. Huang, S.L. Hsu, E. Lin, C.T. Ku, H. Lin, and C.M. Chen, Retinoic Acid Induces Apoptosis of Prostate Cancer DU145 Cells through Cdk5 Overactivation, *Evid. Based. Complement Alternat. Med.*, 2012 (2012) 580736.
- [8] C.S. Niu, M.W. Li, Y.F. Ni, J.M. Chen, J.M. Mei, J. Li, and X.M. Fu, Effect of all-trans retinoic acid on the proliferation and differentiation of brain tumor stem cells, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 29 (2010) 113.
- [9] Q. Xu, Z. Zhang, P. Zhang, and W. Chen, Antisense oligonucleotides and all-trans retinoic acid have a synergistic anti-tumor effect on oral squamous cell carcinoma, *BMC. Cancer*, 8 (2008) 159.
- [10] L.M. Austenaa, H. Carlsen, A. Ertesvag, G. Alexander, H.K. Blomhoff, and R. Blomhoff, Vitamin A status significantly alters nuclear factor-kappaB activity assessed by in vivo imaging, *FASEB J.*, 18 (2004) 1255-1257.
- [11] R. Connolly, N.K. Nguyen, and S. Sukumar, Molecular Pathways: Current Role and Future Directions of the Retinoic Acid Pathway In Cancer Prevention and Treatment, *Clin. Cancer Res.*, (2013).
- [12] O. Arrieta, Gonzalez-De la Rosa CH, E. Arechaga-Ocampo, G. Villanueva-Rodriguez, T.L. Ceron-Lizarraga, L. Martinez-Barrera, M.E. Vazquez-Manriquez, M.A. Rios-Trejo, M.A. Alvarez-Avitia, N. Hernandez-Pedro, C. Rojas-Marin, and J. De la Garza, Randomized phase II trial of All-trans-retinoic acid with chemotherapy based on paclitaxel and cisplatin as first-line

treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer, *J. Clin. Oncol.*, 28 (2010) 3463-3471.

- [13] J. Geradts, J.Y. Chen, E.K. Russell, J.R. Yankaskas, L. Nieves, and J.D. Minna, Human lung cancer cell lines exhibit resistance to retinoic acid treatment, *Cell Growth Differ.*, 4 (1993) 799-809.
- [14] S. Kawakami, S. Suzuki, F. Yamashita, and M. Hashida, Induction of apoptosis in A549 human lung cancer cells by all-trans retinoic acid incorporated in DOTAP/cholesterol liposomes, *J. Control Release*, 110 (2006) 514-521.
- [15] Z. Gao, L. Zhang, and Y. Sun, Nanotechnology applied to overcome tumor drug resistance, *J. Control Release*, 162 (2012) 45-55.
- [16] E. Trapasso, D. Cosco, C. Celia, M. Fresta, and D. Paolino, Retinoids: new use by innovative drug-delivery systems, *Expert. Opin. Drug Deliv.*, 6 (2009) 465-483.
- [17] A.F. Ourique, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, and R.C. Beck, Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study, *Int. J. Pharm.*, 352 (2008) 1-4.
- [18] A.F. Ourique, S. Azoubel, C.V. Ferreira, C.B. Silva, M.C. Marchiori, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, and R.C. Beck, Lipid-core nanocapsules as a nanomedicine for parenteral administration of tretinoin: development and in vitro antitumor activity on human myeloid leukaemia cells, *J. Biomed. Nanotechnol.*, 6 (2010) 214-223.
- [19] K.R. Begnini, C. Rizzi, V.F. Campos, S. Borsuk, E. Schultze, V.C. Yurgel, F. Nedel, O.A. Dellagostin, T. Collares, and F.K. Seixas, Auxotrophic recombinant *Mycobacterium bovis* BCG overexpressing Ag85B enhances cytotoxicity on superficial bladder cancer cells in vitro, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (2012).
- [20] F. Nedel, V.F. Campos, D. Alves, A.J. McBride, O.A. Dellagostin, T. Collares, L. Savegnago, and F.K. Seixas, Substituted diaryl diselenides: cytotoxic and apoptotic effect in human colon adenocarcinoma cells, *Life Sci.*, 91 (2012) 345-352.
- [21] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.*, 29 (2001) e45.
- [22] M. Bryan, E.D. Pulte, K.C. Toomey, L. Pliner, A.C. Pavlick, T. Saunders, and R. Wiedner, A pilot phase II trial of all-trans retinoic acid (Vesanoid) and paclitaxel (Taxol) in patients with recurrent or metastatic breast cancer, *Invest New Drugs*, 29 (2011) 1482-1487.
- [23] K.A. David, N.P. Mongan, C. Smith, L.J. Gudas, and D.M. Nanus, Phase I trial of ATRA-IV and Depakote in patients with advanced solid tumor malignancies, *Cancer Biol. Ther.*, 9 (2010) 678-684.

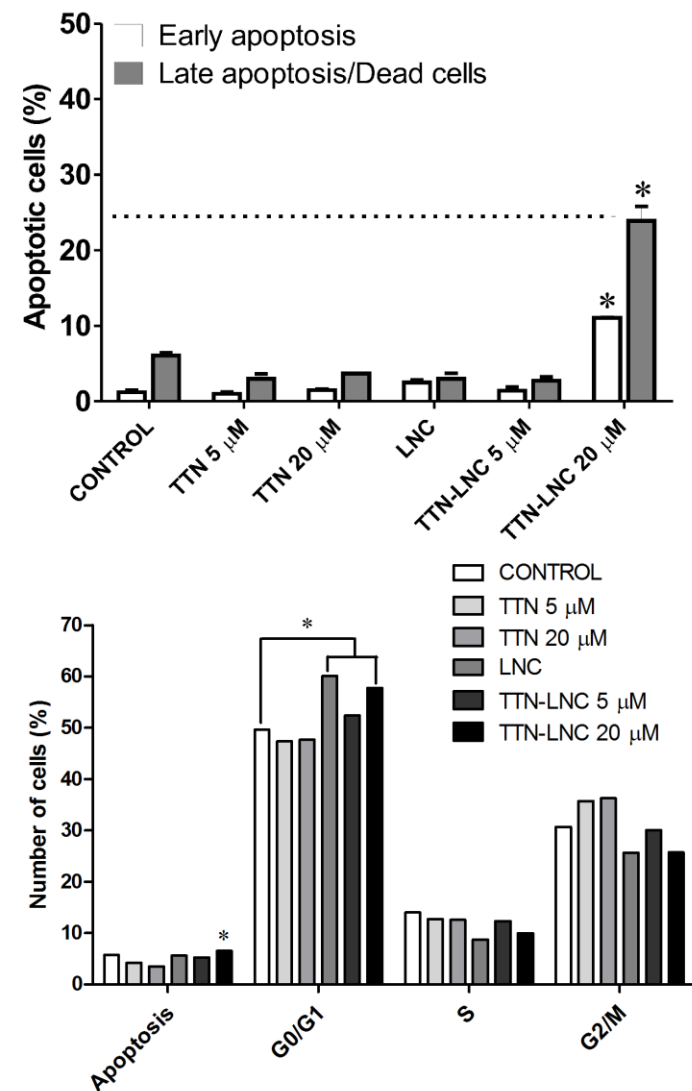
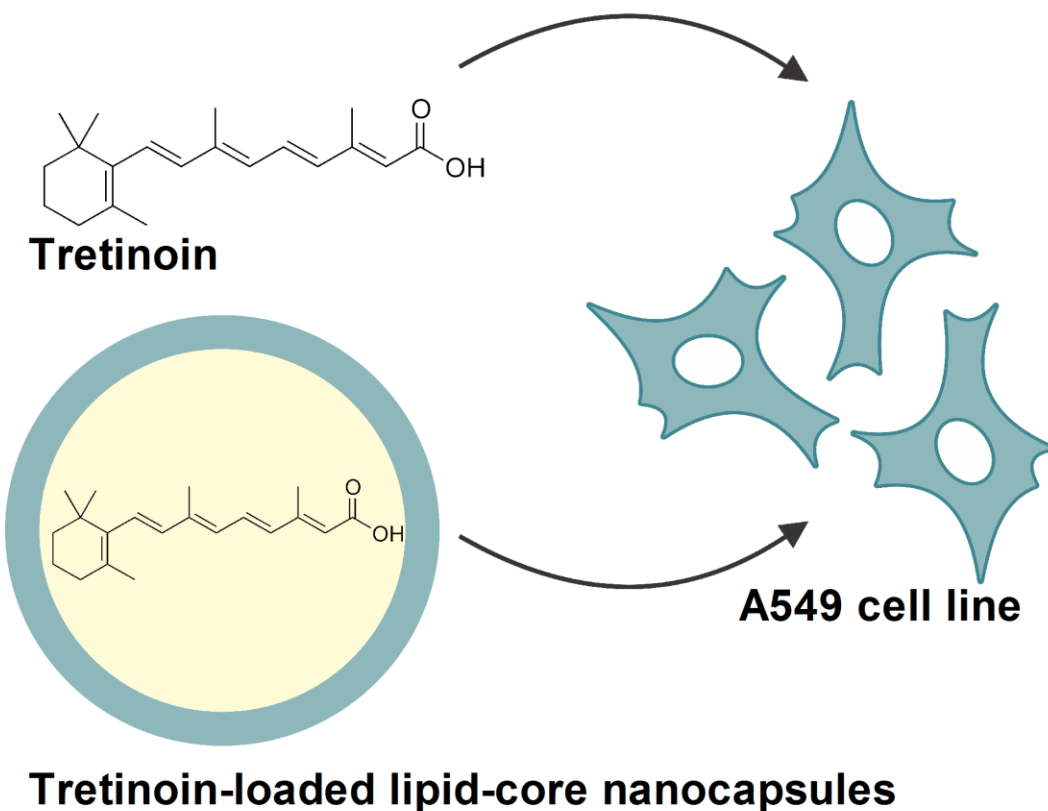
- [24] S.H. Park, W.C. Gray, I. Hernandez, M. Jacobs, R.A. Ord, M. Sutharalingam, R.G. Smith, D.A. Van Echo, S. Wu, and B.A. Conley, Phase I trial of all-trans retinoic acid in patients with treated head and neck squamous carcinoma, *Clin. Cancer Res.*, 6 (2000) 847-854.
- [25] A. Raif, G.M. Marshall, J.L. Bell, J. Koach, O. Tan, C. D'andreti, W. Thomas, E. Sekyere, M. Norris, M. Haber, M. Kavallaris, and B.B. Cheung, The estrogen-responsive B box protein (EBBP) restores retinoid sensitivity in retinoid-resistant cancer cells via effects on histone acetylation, *Cancer Lett.*, 277 (2009) 82-90.
- [26] L. Dhandapani, P. Yue, S.S. Ramalingam, F.R. Khuri, and S.Y. Sun, Retinoic acid enhances TRAIL-induced apoptosis in cancer cells by upregulating TRAIL receptor 1 expression, *Cancer Res.*, 71 (2011) 5245-5254.
- [27] C. Vangestel, C. Van de Wiele, G. Mees, and M. Peeters, Forcing cancer cells to commit suicide, *Cancer Biother. Radiopharm.*, 24 (2009) 395-407.
- [28] J.M. Adams and S. Cory, The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy, *Oncogene*, 26 (2007) 1324-1337.
- [29] M. Lamkanfi, N. Festjens, W. Declercq, T. Vanden Berghe, and P. Vandenabeele, Caspases in cell survival, proliferation and differentiation, *Cell Death. Differ.*, 14 (2007) 44-55.
- [30] M. Leist and M. Jaattela, Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2 (2001) 589-598.
- [31] T. Otsuki, H. Sakaguchi, T. Hatayama, P. Wu, A. Takata, and F. Hyodoh, Effects of all-trans retinoic acid (ATRA) on human myeloma cells, *Leuk. Lymphoma*, 44 (2003) 1651-1656.
- [32] V.S. Romanov, V.A. Pospelov, and T.V. Pospelova, Cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Waf1): contemporary view on its role in senescence and oncogenesis, *Biochemistry (Mosc.)*, 77 (2012) 575-584.
- [33] O. Clark, S. Daga, and A.W. Stoker, Tyrosine phosphatase inhibitors combined with retinoic acid can enhance differentiation of neuroblastoma cells and trigger ERK- and AKT-dependent, p53-independent senescence, *Cancer Lett.*, 328 (2013) 44-54.
- [34] B. Su, X. Chen, C. Zhong, N. Guo, J. He, and Y. Fan, All-trans retinoic acid inhibits mesangial cell proliferation by up-regulating p21Waf1/Cip1 and p27Kip1 and down-regulating Skp2, *J. Nephrol.*, 25 (2012) 1031-1040.
- [35] Q. Wu, Z. Chen, and W. Su, Growth inhibition of gastric cancer cells by all-trans retinoic acid through arresting cell cycle progression, *Chin Med. J. (Engl.)*, 114 (2001) 958-961.

Table 1. Primers sequences used in this study.

Primers	Sequence 5'→ 3'
p53 For	AGCGAGCACTGCCCAACA
p53 Rev	CACGCCCACGGATCTGAA
Bcl-2 For	GTGTGGAGAGCGTCAACC
Bcl-2 Rev	CTTCAGAGACAGCCAGGAG
Bax For	ATGCGTCCACCAAGAAGC
Bax Rev	ACGGCGGCAATCATCCTC
KRAS For	TTATAAGGCCTGCTGAAAATGACTGAA
KRAS Rev	TGAATTAGCTGTATCGTCAAGGCACT
Casp9 For	CCAGAGATTCGCAAACCAGAGG
Casp9 Rev	GAGCACCGACATCACCAAATCC
Survivin For	CTGTGGGCCCCTTAGCAAT
Survivin Rev	TAAGCCCGGGAATCAAAACA
p21 For	CCTAATCCGCCCACAGGAA
p21 Rev	ACCTCCGGGAGAGAGGAAAA
MYC For	TCAGCAACAACCGAAAATGC
MYC Rev	TTCCGTAGCTGTTCAAGTTTGTG
GAPDH For	GGATTTGGTCGTATTGGG
GAPDH Rev	TCGCTCCTGGAAGATGG

Graphical abstract:

Tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules overcomes the A549 cell line resistance to tretinoin



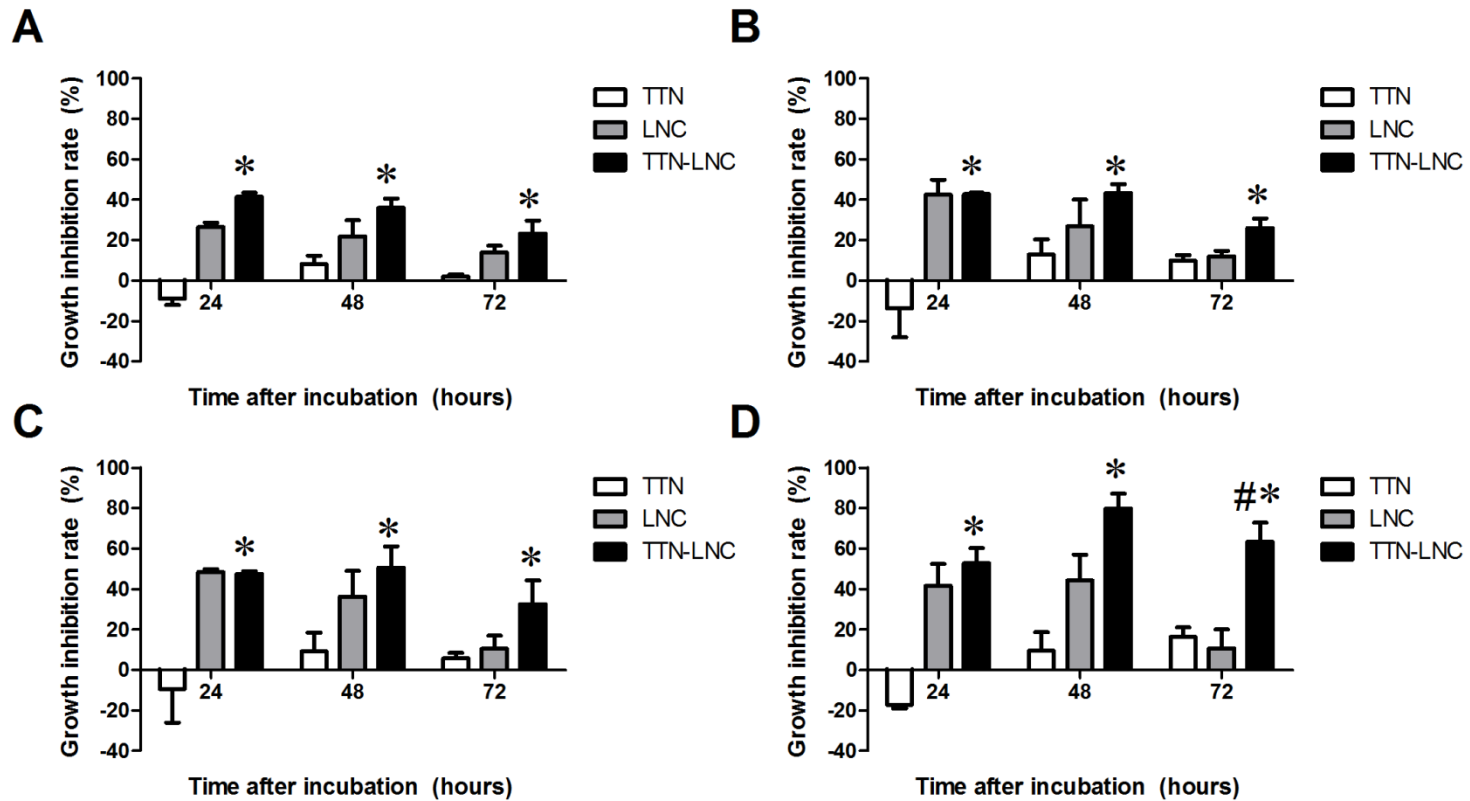


Figure 1 - Effect of tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules (TTN-LNC) on proliferation of A549 cell line. Cells were incubated with (A) 1 μ M, (B) 5 μ M, (C) 10 μ M (D) and 20 μ M of tretinoin (TTN) and TTN-LNC and the relative amount of blank lipid-core nanocapsules (LNC) for 24, 48 and 72 hours. Cytotoxicity was assessed by MTT assay. Data are expressed as mean $\pm$ SEM from three independent experiments, each performed in triplicate. * and # represents significance ($P < 0.05$) compared with TTN and LNC respectively

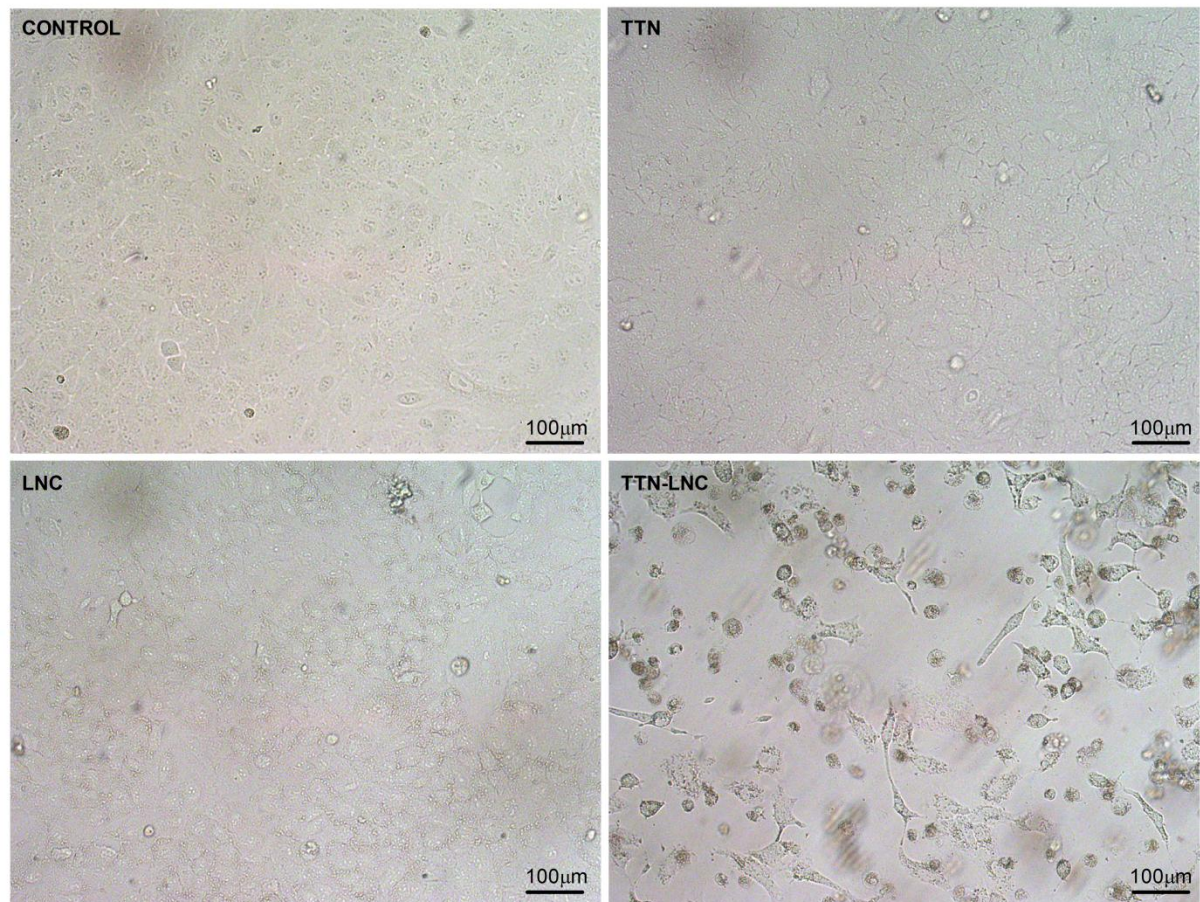


Figure 2 - Morphological analyzes of A549 incubated without treatment (control) or with 20 µM of TTN, TTN-LNC and the relative amount of LNC after 72h. Cells treated with TTN-LNC showed morphology similar to apoptotic cells, with cell shrinkage and lose of cell-cell contact.

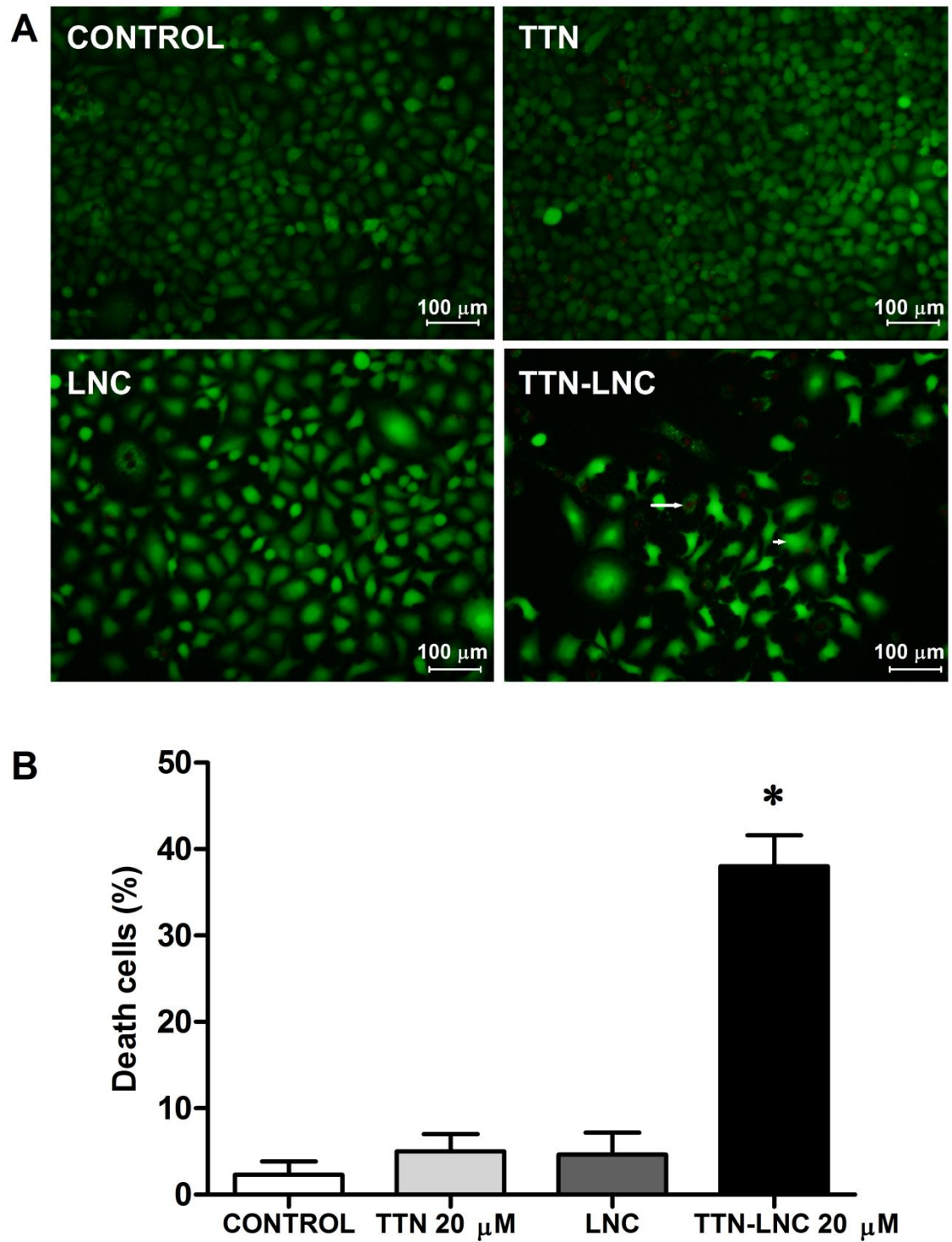


Figure 3 – Tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules (TTN-LNC) increased A549 cell death. Lung cancer cells were treated with tretinoin (B), TTN-LNC (D) and the relative amount of blank nanocapsules (C) for 72 h. Quantitative analysis of cell death was estimated by LIVE/DEAD assay. The graphic shows the mean $\pm$ SEM of three different areas of the plate. Long arrow indicates dead cell and short arrow indicates live cell. * represents significance ($P < 0,05$) compared with control. Barr indicates 100 μ m.

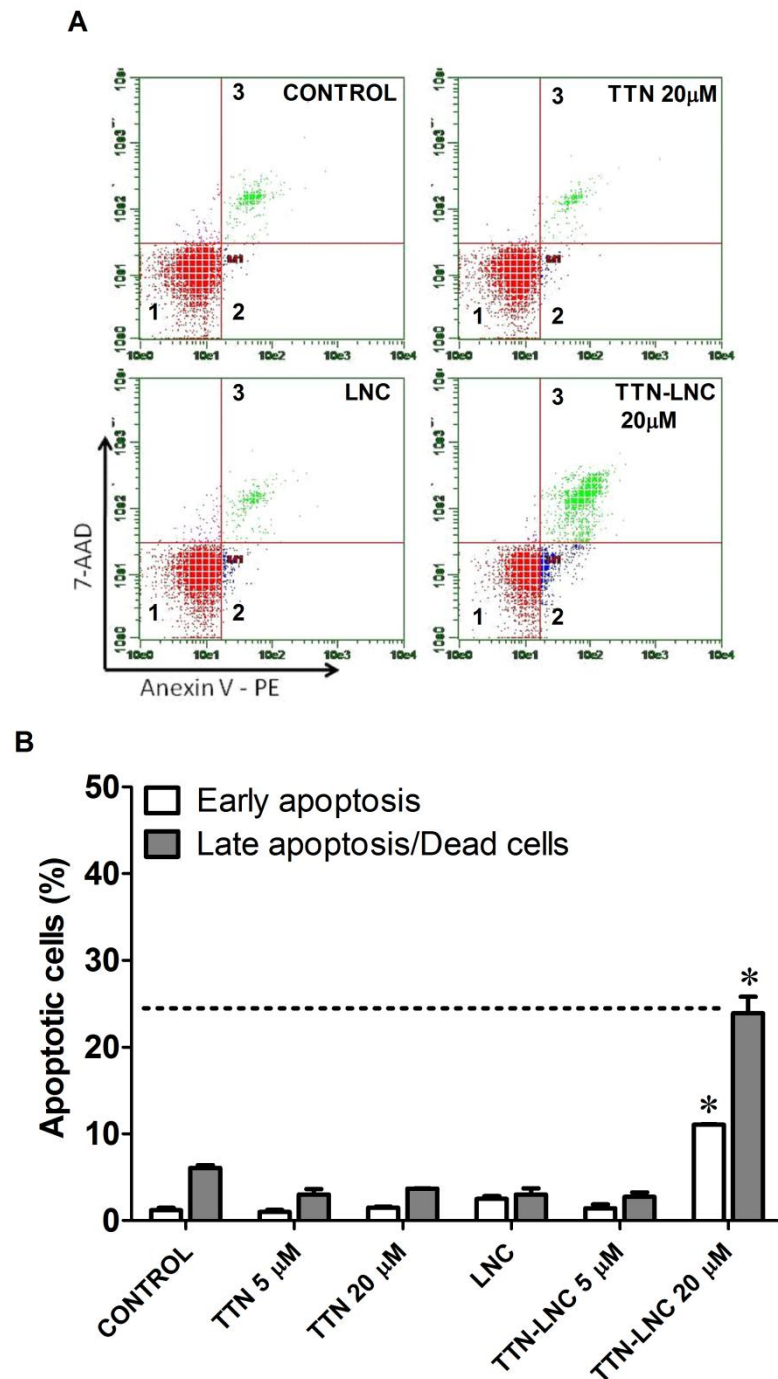


Figure 4 - Induction of apoptosis by tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules (TTN-LNC) in A549 cells. Cells treated with tretinoin (TTN), TTN-LNC and the relative amounts of LNC were examined for apoptosis by 7-AAD and Annexin V-PE staining. Dot plot **(A)** of staining cells shows non-apoptotic cells: Annexin V(-) and 7-AAD(-) **(1)** ; Early apoptotic cells: Annexin V(+) and 7-AAD(-) **(2)** and late stage apoptotic and dead cells: Annexin V(+) and 7-AAD(+) **(3)**. The graphic **(B)** represents mean $\pm$ SEM of early and late apoptosis for three independent experiments. TTN-LNC significantly ($P < 0.05$) enhances the rate of both early and late apoptosis.

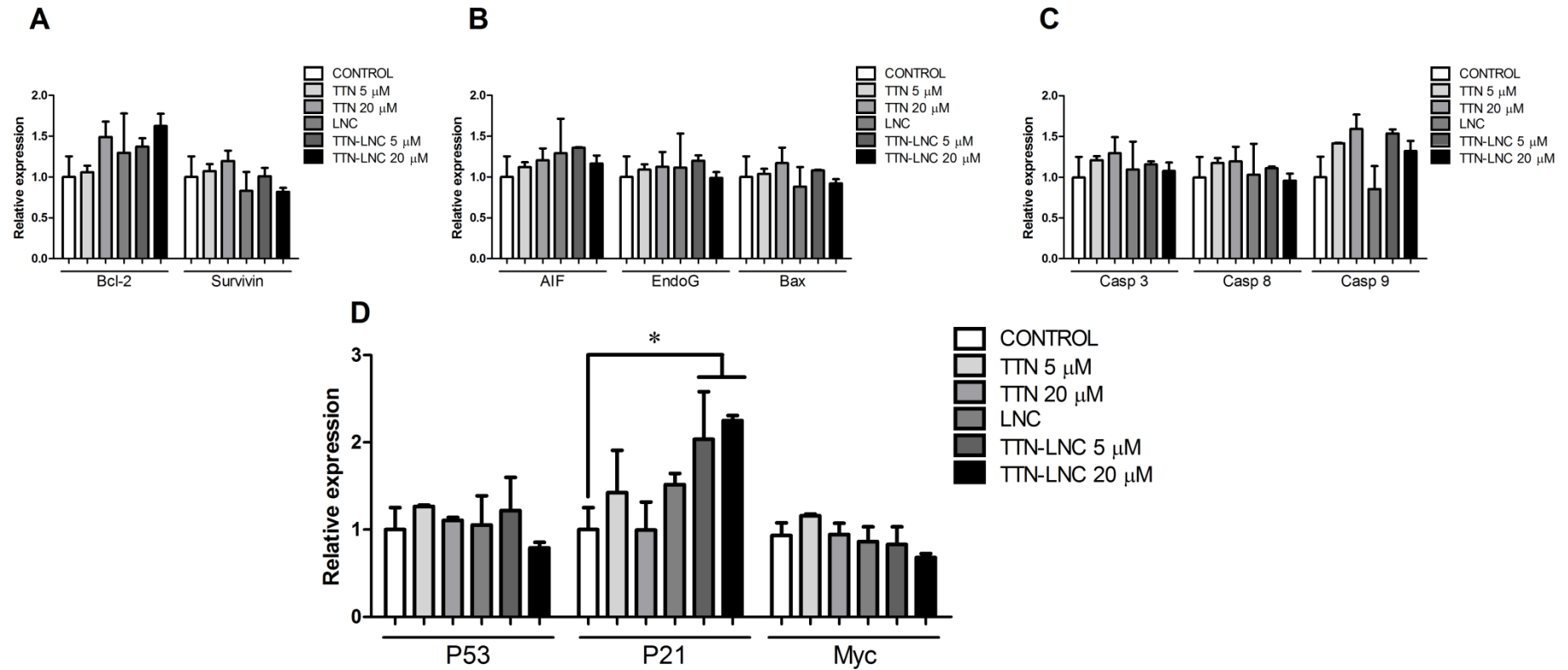


Figure 5 – Gene expression profile. Cells were incubated with 5 or 20 μ M of TTN and TTN-LNC and the highest amount of LNC. The RNA was extracted and cDNA was synthesized. Real Time PCR was performed with primers of anti-apoptotic (A), pro-apoptotic (B), caspases (C) and transcription factors genes (D). Only P21 relative expression in treatment with TTN-LNC at both 5 or 20 μ M showed significant difference compared to control. Data represents mean $\pm$ SEM of three different experiments performed in duplicate. * $P < 0,05$

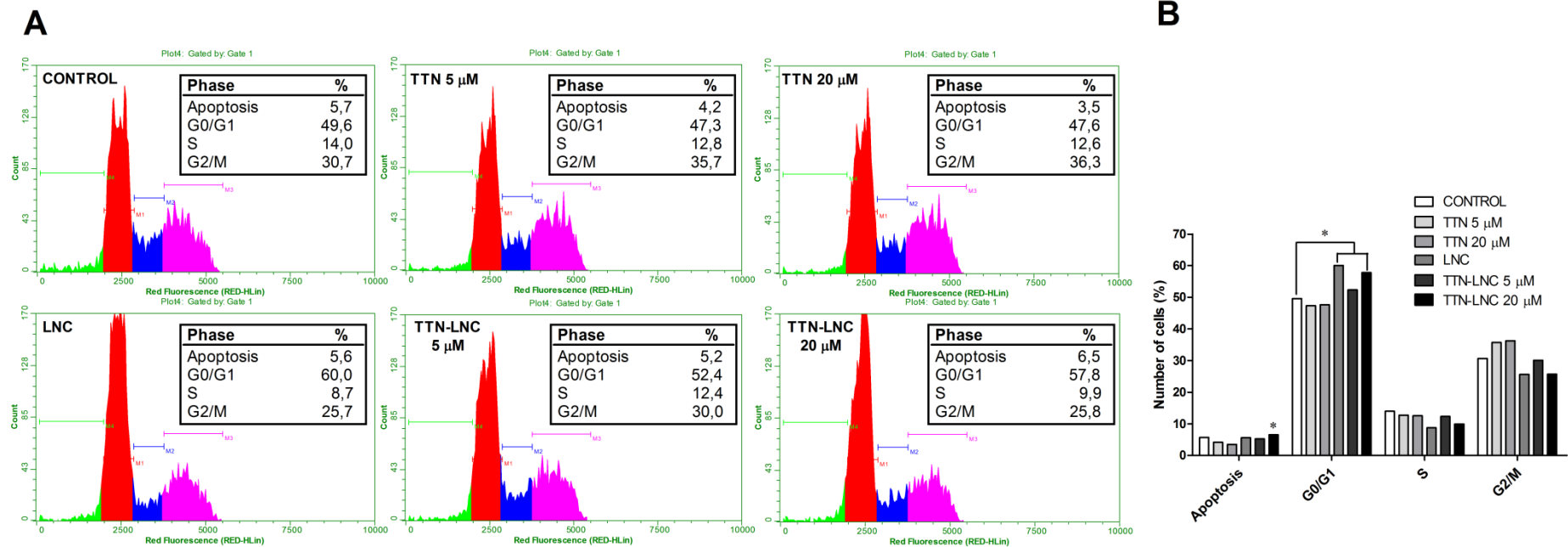


Figure 6 – Induction of cell cycle arrest and apoptosis by TTN-LNC. Cells were synchronized, incubated with 5 or 20 μ M of TTN and TTN-LNC and the highest amount of LNC, harvested, fixed, stained and analyzed by flow cytometry. A shows the DNA content histogram and B shows the percentage of cells in each cycle phase. TTN-LNC and LNC induced cell cycle arrest in G1 phase. TTN-LNC induced apoptosis. * $P < 0,05$

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho demonstramos que nanocápsulas de núcleo lipídico de tretinoína (TT-LCNC) foram capazes de superar a resistência que as células de adenocarcinoma de pulmão humano, linhagem A549, apresentam aos efeitos antitumorais de TT. Esta superação foi demonstrada a partir da indução de citotoxicidade, medida pelo ensaio de Live/Dead e MTT; apoptose, medida por citometria de fluxo através da avaliação da externalização de fosfatidilserina, bem como fragmentação de DNA; e parada do ciclo celular, medida também por citometria de fluxo através da avaliação de conteúdo de DNA corado com iodeto de propideo. Além do mais, pode se demonstrar que esse efeito está ocorrendo via regulação da expressão de P21, uma proteína inibidora de ciclinas que controla, dentre outros mecanismos, a passagem do ciclo celular de G1 para S. Os resultados encontrados estão de acordo com os efeitos de TT descritos na literatura. Com isso o trabalho evidenciou um possível potencial terapêutico dessa formulação para o tratamento de câncer de pulmão resistente a TT.

5. REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, v.26, p.1324-1337, 2007.
- ALTUCCI, L.; GRONEMEYER, H. The promise of retinoids to fight against cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v.1, p.181-193, 2001.
- ALTUCCI, L.; LEIBOWITZ, M. D.; OGILVIE, K. M.; DE LERA, A. R.; GRONEMEYER, H. RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v.6, p.793-810, 2007.
- ARRIETA, O.; GONZALEZ-DE LA ROSA CH; ARECHAGA-OCAMPO, E.; VILLANUEVA-RODRIGUEZ, G.; CERON-LIZARRAGA, T. L.; MARTINEZ-BARRERA, L.; VAZQUEZ-MANRIQUEZ, M. E.; RIOS-TREJO, M. A.; ALVAREZ-AVITIA, M. A.; HERNANDEZ-PEDRO, N.; ROJAS-MARIN, C.; DE LA GARZA, J. Randomized phase II trial of All-trans-retinoic acid with chemotherapy based on paclitaxel and cisplatin as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer. **J. Clin. Oncol.**, v.28, p.3463-3471, 2010.
- BROWN, G.; HUGHES, P. Retinoid differentiation therapy for common types of acute myeloid leukemia. **Leuk. Res. Treatment.**, v.2012, p.939021, 2012.
- BUNN, P. A., JR. Worldwide overview of the current status of lung cancer diagnosis and treatment. **Arch. Pathol. Lab Med.**, v.136, p.1478-1481, 2012.
- BUSHUE, N.; WAN, Y. J. Retinoid pathway and cancer therapeutics. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.62, p.1285-1298, 2010.
- CHANSRI, N.; KAWAKAMI, S.; YOKOYAMA, M.; YAMAMOTO, T.; CHAROENSIT, P.; HASHIDA, M. Anti-tumor effect of all-trans retinoic acid loaded polymeric micelles in solid tumor bearing mice. **Pharm. Res.**, v.25, p.428-434, 2008.
- ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol. Pathol.**, v.35, p.495-516, 2007.
- FOSTER, D. A.; YELLEN, P.; XU, L.; SAQCENA, M. Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s). **Genes Cancer**, v.1, p.1124-1131, 2010.
- GADGEEL, S. M.; RAMALINGAM, S. S.; KALEMKERIAN, G. P. Treatment of lung cancer. **Radiol. Clin. North Am.**, v.50, p.961-974, 2012.
- GAO, Z.; ZHANG, L.; SUN, Y. Nanotechnology applied to overcome tumor drug resistance. **J. Control Release**, v.162, p.45-55, 2012.
- GERADTS, J.; CHEN, J. Y.; RUSSELL, E. K.; YANKASKAS, J. R.; NIEVES, L.; MINNA, J. D. Human lung cancer cell lines exhibit resistance to retinoic acid treatment. **Cell Growth Differ.**, v.4, p.799-809, 1993.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, p.57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, p.646-674, 2011.

HIGUCHI, E.; CHANDRARATNA, R. A.; HONG, W. K.; LOTAN, R. Induction of TIG3, a putative class II tumor suppressor gene, by retinoic acid in head and neck and lung carcinoma cells and its association with suppression of the transformed phenotype. **Oncogene**, v.22, p.4627-4635, 2003.

Instituto Nacional de Câncer. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Instituto Nacional do Câncer . 2013. 15-2-2013.

Ref Type: Online Source

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil. 2013. Rio de Janeiro : Inca, 2011. 16-2-2013.

Ref Type: Online Source

INUI, N.; SASAKI, S.; SUDA, T.; CHIDA, K.; NAKAMURA, H. The loss of retinoic acid receptor alpha, beta and alcohol dehydrogenase3 expression in non-small cell lung cancer. **Respirology**, v.8, p.302-309, 2003.

JAIN, M. V.; PACZULLA, A. M.; KLONISCH, T.; DIMGBA, F. N.; RAO, S. B.; ROBERG, K.; SCHWEIZER, F.; Lengerke, C.; DAVOODPOUR, P.; PALICHARLA, V. R.; MADDIKA, S.; LOS, M. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. **J. Cell Mol. Med.**, v.17, p.12-29, 2013.

JOO, K. I.; XIAO, L.; LIU, S.; LIU, Y.; LEE, C. L.; CONTI, P. S.; WONG, M. K.; LI, Z.; WANG, P. Crosslinked multilamellar liposomes for controlled delivery of anticancer drugs. **Biomaterials**, v.34, p.3098-3109, 2013.

KAWAKAMI, S.; SUZUKI, S.; YAMASHITA, F.; HASHIDA, M. Induction of apoptosis in A549 human lung cancer cells by all-trans retinoic acid incorporated in DOTAP/cholesterol liposomes. **J. Control Release**, v.110, p.514-521, 2006.

LAMKANFI, M.; FESTJENS, N.; DECLERCQ, W.; VANDEN BERGHE, T.; VANDENABEELE, P. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. **Cell Death. Differ.**, v.14, p.44-55, 2007.

LEIST, M.; JAATTELA, M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v.2, p.589-598, 2001.

MADDIKA, S.; ANDE, S. R.; PANIGRAHI, S.; PARANJOTHY, T.; WEGLARCZYK, K.; ZUSE, A.; ESHRAGHI, M.; MANDA, K. D.; WIECHEC, E.; LOS, M. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. **Drug Resist. Updat.**, v.10, p.13-29, 2007.

MATEO, V.; LAGNEAUX, L.; BRON, D.; BIRON, G.; ARMANT, M.; DELESPESE, G.; SARFATI, M. CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. **Nat. Med.**, v.5, p.1277-1284, 1999.

NIU, C. S.; LI, M. W.; NI, Y. F.; CHEN, J. M.; MEI, J. M.; LI, J.; FU, X. M. Effect of all-trans retinoic acid on the proliferation and differentiation of brain tumor stem cells. **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, v.29, p.113, 2010.

ORLANDI, M.; MANTOVANI, B.; AMMAR, K.; AVITABILE, E.; DAL, M. P.; BARTOLINI, G. Retinoids and cancer: antitumoral effects of ATRA, 9-cis RA and the new retinoid IIF on the HL-60 leukemic cell line. **Med. Princ. Pract.**, v.12, p.164-169, 2003.

OURIQUE, A. F.; AZOUBEL, S.; FERREIRA, C. V.; SILVA, C. B.; MARCHIORI, M. C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. Lipid-core nanocapsules as a nanomedicine for parenteral administration of tretinoin: development and in vitro antitumor activity on human myeloid leukaemia cells. **J. Biomed. Nanotechnol.**, v.6, p.214-223, 2010.

OURIQUE, A. F.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. **Int. J. Pharm.**, v.352, p.1-4, 2008.

REGO, E. M.; KIM, H. T.; RUIZ-ARGUELLES, G. J.; UNDURRAGA, M. S.; URIARTE, M. D.; JACOMO, R. H.; GUTIERREZ-AGUIRRE, H.; MELO, R. A.; BITTENCOURT, R.; PASQUINI, R.; PAGNANO, K.; FAGUNDES, E. M.; CHAUFFAILLE, M. D.; CHIATTONE, C. S.; MARTINEZ, L.; MEILLON, L. A.; GOMEZ-ALMAGUER, D.; KWAAN, H. C.; GARCES-EISELE, J.; GALLAGHER, R.; NIEMEYER, C. M.; SCHRIER, S. L.; TALLMAN, M.; GRIMWADE, D.; GANSER, A.; BERLINER, N.; RIBEIRO, R. C.; LO-COCO, F.; LOWENBERG, B.; SANZ, M. A. Improving acute promyelocytic leukemia (APL) outcome in developing countries through networking, results of the International Consortium on APL. **Blood**, 2013.

RHINN, M.; DOLLE, P. Retinoic acid signalling during development. **Development**, v.139, p.843-858, 2012.

SOPRANO, D. R.; QIN, P.; SOPRANO, K. J. Retinoic acid receptors and cancers. **Annu. Rev. Nutr.**, v.24, p.201-221, 2004.

SULTANA, S.; KHAN, M. R.; KUMAR, M.; KUMAR, S.; ALI, M. Nanoparticles-mediated drug delivery approaches for cancer targeting: a review. **J. Drug Target**, 2012.

TRAPASSO, E.; COSCO, D.; CELIA, C.; FRESTA, M.; PAOLINO, D. Retinoids: new use by innovative drug-delivery systems. **Expert. Opin. Drug Deliv.**, v.6, p.465-483, 2009.

VANGESTEL, C.; VAN DE WIELE, C.; MEES, G.; PEETERS, M. Forcing cancer cells to commit suicide. **Cancer Biother. Radiopharm.**, v.24, p.395-407, 2009.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif.**, v.36, p.131-149, 2003.

WLODKOWIC, D.; SKOMMER, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances. **Exp. Oncol.**, v.34, p.255-262, 2012.

XU, Q.; ZHANG, Z.; ZHANG, P.; CHEN, W. Antisense oligonucleotides and all-trans retinoic acid have a synergistic anti-tumor effect on oral squamous cell carcinoma. **BMC. Cancer**, v.8, p.159, 2008.

XU, X. C. Tumor-suppressive activity of retinoic acid receptor-beta in cancer. **Cancer Lett.**, v.253, p.14-24, 2007.

ZHANG, L. Q.; WANG, J.; JIANG, F.; XU, L.; LIU, F. Y.; YIN, R. Prognostic value of survivin in patients with non-small cell lung carcinoma: a systematic review with meta-analysis. **PLoS. One.**, v.7, p.e34100, 2012.