

Desenvolvimento de formulações para entrega de fármacos para o tratamento de lesões cancerígenas provocadas pelo vírus do Papiloma Humano (HPV)

Versão final após defesa

Izamara Gomes Maocha

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2^o ciclo de estudos)

Orientador (a): Prof^a. Doutora Carla Patrícia Alves Freire Madeira Cruz
Co-orientador: Prof. Doutor Josué Leandro de Oliveira e Carvalho

Março de 2021

Dedicatória

Aos meus pais pelo incansável apoio, e ao meu avô minha referência de força e perseverança. À vocês dedico este trabalho.

O meu mais profundo agradecimento.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Carla Cruz, pela oportunidade de integrar e desenvolver a minha dissertação de mestrado neste grupo, pelo acompanhamento e partilha de saber, pela paciência e esforço constante que tanto contribuíram para a realização deste trabalho de pesquisa.

Ao meu co-orientador, Doutor Josué Carvalho, por todo o conhecimento transmitido. Obrigada pela disponibilidade, pelo incentivo constante, pela prontidão no esclarecimento de dúvidas e resolução de problemas que eventualmente foram surgindo ao longo do trabalho, pela paciência, pelas críticas construtivas, por todo o suporte dado na construção deste trabalho que em muito contribuíram para o meu crescimento académico.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório de RMN, em especial a Jéssica Nunes, por toda a ajuda, paciência e conhecimentos transmitidos que foram de grande importância na realização deste trabalho de pesquisa.

À Universidade da Beira Interior, e a todo o grupo do Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS-UBI), que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização desta dissertação.

Aos meus pais, por serem os meus melhores orientadores da vida. Obrigada pelos valores à mim transmitidos, que tanto contribuíram para o meu crescimento e educação. Por acreditarem em mim e nunca me deixarem desistir dos meus objetivos e sonhos. Por serem o meu alicerce e a minha força e juntos seguirmos sempre de mãos dadas. Obrigada pelo apoio incondicional, mesmo frente às diversas dificuldades encontradas pelo caminho. Não foi fácil, mas com dedicação e perseverança conseguimos. Sem vocês nada disto seria possível. À vocês a minha imensa gratidão.

Aos meus irmãos, por sempre estarem presente mesmo com a distância, e por serem a minha força para nunca desistir. O nosso amor e união é o que nos mantém cada vez mais fortes em tudo o que fazemos. Obrigada por serem a minha alegria de viver. Amo-vos muito.

Ao meu namorado, que me incentiva todos os dias a correr atrás dos meus sonhos. Obrigada pela compreensão, companheirismo, paciência e carinho para comigo. Por todas as lutas travadas sempre lado a lado, mesmo estando do outro lado do oceano. Obrigada por nunca soltares a minha mão. Teu apoio foi essencial durante estes dois anos. Amo-te muito.

Ao meu avô, por todos os ensinamentos, sabedoria e valores transmitidos. Obrigada pelas palavras de conforto e incentivo, e pelo cuidado mesmo estando longe. Como sempre digo, minha referência de vida e integridade.

À todos os meus familiares, em especial a minha tia Vera Pires, pela preocupação demonstrada, pela paciência e por todo o apoio durante a realização deste mestrado.

Meus agradecimentos também se destinam à todos os meus amigos em Cabo Verde e no Brasil, que mesmo distantes sempre fizeram-se presentes. Obrigada pelo apoio incondicional e por me ensinarem o verdadeiro significado da palavra amizade.

Aos amigos e colegas que me acolheram em Portugal, especialmente em Covilhã, pelo amparo e por me fazerem sentir-se em casa. Obrigada pelas palavras de conforto, pelas horas de estudo e de conversas na biblioteca, pelos cafés, pelas saídas e por todo o apoio ao longo destes 2 anos.

Aos meus colegas de casa, que foram essencial para a minha rápida adaptação. Obrigada pelas conversas diárias, pelos momentos de descontração, pelas dúvidas esclarecidas, pelas horas de estudo em conjunto e por todo o apoio. Formamos uma família bonita, que levarei comigo no coração para sempre.

Por fim, este trabalho de dissertação enquadra-se no projeto DREAM (ref. UTAP-EXPL/NTec/0015/2017) UTAustin FCT, pelo que direciono os meus agradecimentos pelo financiamento para o desenvolvimento desta dissertação.

À todos e a cada um em especial,

O meu mais sincero obrigada.

Resumo

O vírus do Papiloma Humano, (HPV) é um dos agentes infecciosos de transmissão sexual mais comum e é responsável por mais de 5 % de todos os cânceros humanos. Dos 200 genótipos capazes de infectar os humanos, 40 podem infectar o trato anogenital e causar lesões benignas ou pré-cancerosas. Mais de 90% de todos os casos de cancro do colo do útero são devido a infecções causadas pelo HPV de alto risco. Na grande maioria dos casos, as infecções provocadas pelo HPV apenas são detectadas quando as lesões já são de elevado grau e evoluem para cancro. Embora existam vacinas profiláticas contra o HPV, estas são ineficazes nos casos de infecção latente, não sendo deste modo benéficas para indivíduos já infectados e com lesões causadas pelo mesmo.

Diversos sistemas de entrega de fármacos anticancerígenos com elevada especificidade tem sido desenvolvido para o tratamento de cancro, nomeadamente lesões cancerosas uterinas provocadas pelo HPV. O uso de formulações vaginais é frequentemente indicado para a aplicação tópica e tem sido frequentemente utilizado no tratamento de lesões vaginais.

Este trabalho tem como objetivo desenvolver e caracterizar formulações contendo óleo essencial de *Thymus vulgaris* (TEO) na sua constituição e compostos tais como mitoxantrona (MTX) e do derivado de laranja de acridina (C₈), de forma a avaliar a sua ação anticancerígena, nas células do cancro do colo do útero. O tomilho, para além de propriedades antifúngicas e antibacterianas, também apresenta propriedades anticancerígenas resultantes do aumento específico dos radicais livres e do stress oxidativo causado nas células cancerosas.

O seu efeito antiproliferativo foi avaliado por ensaios de viabilidade celular através do ensaio colorimétrico do reagente brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-l)-2,5-difenil tetrazólio MTT) nas linhas celulares HeLa e NHDF. Para avaliação da permeabilidade dos compostos no tecido vaginal da porca, foi utilizada a câmara de Ussing e posterior quantificação pelo método da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As formulações também foram caracterizadas quanto aos valores de pH e capacidade tampão, osmolalidade, viscosidade e bioadesão.

Os resultados demonstraram que houve um aumento no efeito antiproliferativo das formulações com MTX e C₈ na presença de TEO, possivelmente indicando que o TEO pode ser um potencializador do efeito antiproliferativo de MTX e C₈ nas linhas

celulares do cancro do colo do útero. Entretanto o TEO apresentou alguma toxicidade tanto nas células HeLa como nas células saudáveis (NHDF), apresentando um efeito antiproliferativo maior nas células HeLa, na maioria das formulações nas concentrações de 1 % e 0,4 %. Os resultados da caracterização das formulações revelaram que nem sempre apresentaram as propriedades tecnológicas ideais (pH, capacidade de tamponamento, osmolalidade, viscosidade e bioadesão); no entanto, obteve-se os resultados esperados com as diluições fisiológicas no fluido vaginal.

No geral, os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que as formulações contendo o TEO na sua constituição, principalmente a de T1% + C₈ são as mais promissoras em termos de custo-benefício e e aplicação tópica do composto ativo para o tratamento de lesões causadas pelo HPV.

Palavras-chave

Óleo essencial de *Thymus vulgaris*, formulações vaginais, simulante de fluido vaginal, derivado de laranja de acridina, mitoxantrona.

Abstract

Human papillomavirus (HPV) is one of the most common sexually transmitted infectious agents being also responsible for 5% of all human cancers. More than 200 types of HPV have been recognized capable of infecting humans, more than 40 infect the genital tract, causing benign or precancerous lesions. 90% of cervical cancer cases are due to high-risk HPVs and usually is detected when HPV infection remain over long periods. Although prophylactic vaccines can prevent infections by HPV types, they are ineffective to people who are already infected with HPV, because vaccines do not treat infection. They provide maximum benefit if a person receives them before he or she is sexually active.

Several types of delivery systems developed for cancer revealed high specificity to uterine cancerous lesions caused by HPV. The vaginal formulations is often indicated for the topical application of drugs and has been frequently used in the treatment of vaginal lesions.

This work aims to develop and characterize formulations containing *Thymus vulgaris* essential oil (TEO) in its constitution and compounds mitoxantrone (MTX) and acridine orange derivative (C₈) in order to evaluate its action in terms of cytotoxic effect on cervical cancer cells HeLa. Thyme have showed effective bactericidal and antifungal activities and also anticancer properties resulting from the specific increase of the free radicals and oxidative stress caused in cancer cells.

The antiproliferative effect was assessed by colorimetric assay of [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium MTT reagent in HeLa and NHDF cell lines. The permeability of the compounds was evaluated in the Ussing chamber using vaginal tissue and quantified by the high-performance liquid chromatography (HPLC) method. The formulations were also characterized in terms of pH buffering capacity, osmolality, viscosity and bioadhesion.

The TEO formulations loaded with MTX and C₈ showed an increase of antiproliferative effect, indicating that TEO may be an enhancer of the cytotoxic effect of MTX and C₈ in cervical cancer cell lines. However, TEO showed some toxicity in both HeLa cells and normal cells (NHDF), presenting a greater antiproliferative effect in HeLa cells, in most formulations at concentrations of 1% and 0.4%. The formulations did not present the ideal technological properties (pH, buffering capacity, osmolality, viscosity and

bioadhesion); however, in dilutions of vaginal fluid simulant presented the expected results.

Overall, the formulations containing thyme and T1% + C₈ developed under this project are the most promising in terms of cost-benefit and topical application for the treatment of lesions caused by HPV.

Keywords

Thymus vulgaris essential oil, vaginal formulations, vaginal fluid simulant, acridine orange derivative, mitoxantrone.

Índice

Capítulo 1	1
Introdução	1
1.1 Lesões pré cancerosas e cancerosas provocadas pelo HPV	1
1.2 Vírus do papiloma humano	4
1.2.1 Tipos de HPV	4
1.2.2 Estrutura e organização do genoma do HPV	6
1.2.3 Ciclo de vida do HPV	7
1.3 Tratamento das lesões derivadas de infecções pelo HPV	9
1.3.1 Tratamento das verrugas genitais	9
1.3.2 Terapêuticas destrutivas das NIC	10
1.3.3 Tratamento dos CCU	12
1.3.3.1 Tratamentos cirúrgicos	13
1.3.3.2 Radioterapia	13
1.3.3.3 Quimioterapia	14
1.3.3.4 Terapias direcionadas	14
1.3.3.5 Imunoterapia	15
1.4 Formulações vaginais para entrega de fármacos	15
1.4.1 Ambiente vaginal	15
1.4.2 Formulações vaginais	16
1.4.3 Óleo essencial de tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>)	18
1.4.4 Mitoxantrona	20
1.4.4.1 Mecanismo de ação do MTX nas células cancerígenas	21
1.4.5 Derivados de laranja de acridina	22
1.4.6 Produção e caracterização de formulações vaginais	24
Capítulo 2	29
Objetivos	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
Capítulo 3	31
Materiais e métodos	31
3.1 Materiais	
3.2 Preparação das formulações	31

3.2.1	Preparação da formulação base	31
3.2.2	Preparação das formulações com TEO	31
3.2.3	Preparação das formulações com MTX	32
3.2.4	Preparação das formulações com C ₈	32
3.2.5	Preparação da formulação com Tween 80	32
3.3	Preparação dos simulantes de fluído vaginal	33
3.4	Avaliação das formulações no meio de cultura	33
3.5	Caracterização tecnológica das formulações	33
3.5.1	pH e capacidade de tamponamento	33
3.5.2	Análise viscosimétrica	33
3.5.3	Determinação da osmolalidade	35
3.5.4	Determinação da bioadesão	35
3.6	Ensaio <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	35
3.6.1	Cultura de células	36
3.6.2	Ensaio de viabilidade celular	36
3.6.3	Ensaio de permeação dos compostos no tecido	36
3.6.3.1	Determinação da concentração dos compostos (HPLC)	37
3.7	Análise estatística	38
	Capítulo 4	40
	Resultados e discussão	41
4.1	Avaliação das formulações em meio de cultura	41
4.2	Caracterização tecnológica das formulações	43
4.2.1	pH e capacidade de tamponamento	43
4.2.2	Análise viscosimétrica	48
4.2.3	Determinação da osmolalidade	49
4.2.4	Determinação da bioadesão	50
4.3	Ensaio <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	51
4.3.1	Ensaio de viabilidade celular	51
4.3.2	Ensaio de permeação dos composto no tecido vaginal da porca	53
	Capítulo 5	63
	Conclusão e Perspetivas Futuras	63
	Capítulo 6	67
	Referências bibliográficas	67
	Capítulo 7	75
	Anexos	75

Lista de Figuras

- Figura 1. Perspetiva geral da estrutura epidemiológica da infecção pelo HPV. A infecção pelo HPV pode progredir para verrugas genitais ou para NIC (Graus 1, 2, 3) com possível progressão para CCU. No entanto, pode ocorrer regressão das lesões de maior grau para as de menor grau. Apenas o CCU confere um risco adicional de mortalidade. HPV= Papilomavirus humano; NIC= Neoplasia Intraepitelial cervical; CCU= Cancro de cólo do útero.....2
- Figura 2. Representação ilustrativa das alterações celulares do colo uterino na presença de infecção por HPV.....3
- Figura 3. Principais marcos envolvidos na patologia do HPV.....4
- Figura 4. Ilustração dos tipos de HPV pertencentes a cada género e o tropismo de cada um. Representados em vermelho os tipos de HPV de alto risco (cancerígenos). Os tipos do grupo α geralmente apresentam tropismo pelo epitélio cutânea e pela mucosa. Os representados na parte cinza são os cutâneos considerados de baixo risco, em rosa os da mucosa de alto risco e em laranja os com tropismo pela mucosa e considerados de baixo risco.....5
- Figura 5. Ilustração da estrutura típica do genoma de três sub-géneros do HPV. (A) Apesar de todos compartilharem uma organização genética comum, o tamanho e a posição das suas regiões podem variar. Os tipos de HPV pertencentes ao β - papiloma vírus não possuem a região E5. As setas marcadas no mapa genómico do α -papiloma vírus representam a região das principais proteínas oncogénicas. (B) Representação esquemática da estrutura do HPV contendo o DNA do vírus no interior de uma cápside proteica.....6
- Figura 6. Ilustração do ciclo de vida e do processo de carcinogénese do HPV em células do epitélio escamoso.....8
- Figura 7. Representação esquemática do epitélio vaginal.16
- Figura 8. Estrutura química dos monoterpénos. A esquerda o timol e a direita o carvacrol.19
- Figura 9. Esquema ilustrativo da atividade anticancerígena do timol nas células cancerosas.....19
- Figura 10. Possível mecanismo anticancerígeno do timol por vias de apoptose e anti-apoptose. a) Via anticancerígena numa célula cancerosa: o timol pode causar danos graves ao DNA pela indução de ROS, e conseqüente aumento do stress oxidativo/ disfunção mitocondrial ou ativação do fator nuclear das células T e ativando a via da apoptose. b) Via anticancerígena numa célula normal: o timol reduz a ativação das

células T, resultando na regulação negativa da via apoptótica e sobrevivência da célula.....	20
Figura 11. Estrutura química do MTX	21
Figura 12. Representação esquemática da intercalação da molécula do MTX no DNA da célula.....	22
Figura 13. Representação do modelo proposto do monoaduto MTX-DNA ativado com formaldeído.....	22
Figura 14. Esquematização da estrutura química de derivados de acridinas a título de exemplo. A laranja, a estrutura da laranja de acridina.....	23
Figura 15. Estrutura química do ligando C ₈	24
Figura 16. Exemplo do gráfico do cromatograma do MTX e do C ₈	38
Figura 17. Resultado da análise da viscosidade e solubilidade das formulações em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de antibiótico, contendo 0,5 % de DMSO, após deixadas em contacto com o meio por 48 horas.....	41
Figura 18. Capacidade de tamponamento das formulações com dispersão em NaCl 0,9% (A) e em SFV (B). Na dispersão com NaCl a titulação foi feita usando HCl dado que todas as formulações apresentaram pH >5 e com SFV utilizou-se NaOH uma vez que o pH foi menor que 5.....	43
Figura 19. Variação do pH das formulações dispersas em NaCl 0,9 % com adição de NaOH.....	44
Figura 20. Variação do pH das formulações dispersas no SFV com adição de NaOH.....	45
Figura 21. Resultados da análise viscosimétrica das medições direta e após diluição com o SFV, a 37 °C. Os resultados da viscosidade expressos como taxa de cisalhamento correspondem a média e ao desvio-padrão, de 3 determinações (n=3).....	46
Figura 22. Resultado de um dos ensaios de viabilidade celular nas HeLa, das formulações após 1h incubadas com o reagente MTT.....	55
Figura 23. Viabilidade celular relativa das células HeLa e NHDF determinada pelo ensaio de MTT após 24h de incubação com as formulações em estudo.....	56
Figura 24. Perfis de viabilidade celular relativa comparativo entre as células HeLa e NHDF, de todas as formulações testadas neste estudo, em diluições variáveis de 0,1 % a 10 % (m / v). O resultados apresentam-se divididos em duas colunas, em que do lado esquerdo está representado os perfis da viabilidade celular de cada formulação nas HeLa e do lado direito os perfis nos NHDF. As formulações estão representadas do seguinte modo : A) T 1%. a verde, B) F.Base + C ₈ . a azul, C) F.Base + MTX a vermelho, D) T 1% + C ₈ a amarelo e E) T 1 %+ MTX a lilás e os controlos representados a preto.	

Os resultados correspondem a média e os desvios padrão para um $n=3$ e análise estatística realizada pela *One-way* ANOVA e teste de comparação múltipla de *Dunnnett's* ($n=3$, $p < 005$), em que * representa estatisticamente diferente.....58

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Métodos de tratamento das verrugas genitais.....	9
Tabela 2 – Métodos de tratamentos destrutivos das lesões intraepiteliais cervicais.....	11
Tabela 3– Sistema de estadiamento do cancro do colo do útero da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO).....	12
Tabela 4 – Função dos excipientes e matérias-primas usados	30
Tabela 5 – Condições do método utilizado para análise textuométrica.....	34
Tabela 6 – Concentrações das formulações testadas nas HeLa e nos NHDF.....	35
Tabela 7 – Recolha das amostras de cada célula durante o ensaio.....	37
Tabela 8 - Estudos de pH e titulação ácido-base , realizados em dispersão com solução salina normal (NaCl 0,9%) e no simulante de fluido vaginal. Estão representados as médias e os desvios padrão, n=2	41
Tabela 9 – Resultados da osmolalidade das formulações em estudo. Na diluição fisiológica todas as formulações foram afetadas, com diferenças estatísticas (ANOVA two-way, $p < 0,05$), n=3.....	48
Tabela 10 – Valores de pH e osmolalidade de produtos comerciais testados.....	49
Tabela 11 – Caracterização de formulações vaginais comerciais.....	49
Tabela 12 – Parâmetros bioadesivos das formulações. Força máxima de desprendimento (N), distância de desprendimento (mm) e trabalho de bioadesão (N.mm), representados pelas médias e desvio-padrão, para um n=3. Análise estatística do trabalho de adesão pela <i>One-Way</i> ANOVA e teste de comparação múltipla de Turkey (n=5, $p < 0,05$). * representa diferença estatística com o resultado do controlo.....	52
Tabela 13 – Resultado da análise da HPLC dos controlos. FB – formulação base. SFV– Simulante de fluido vaginal. T1% - Formulação de tomilho a 1%. CD – câmara dadora. CR – Câmara receptora.....	60
Tabela 14 – Resultados da quantificação do C ₈ e do MTX através da cromatografia de alta eficiência, ao longo de 56 horas.....	61

Lista de Acrónimos

ANOVA	Análise de variaância
CCU	Cancro de colo do útero
CU	Cancro do útero
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
C ₈	10- (8- (4-iodobenzamida) octil)) - 3,6-bis (dimetilamina) iodeto de acridínio
CD	Camâra dadora
CR	Camâra receptora
CTA	Capacidade de tamponamento absoluta
CTR	Capacidade de tamponamento relativa
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio-padrão
FBS	Soro fetal bovino
FDA	<i>Food and drugs administration</i>
FIGO	Federação internacional de ginecologia e obstetrícia
GC	Guanina-citosina
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>
G ₄	G-quadruplex
HeLa	Células cervicais humanas cancerosas
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
HSIL	Lesões intraepiteliais escamosas de alto grau
HPV	Vírus do papiloma humano
ICC	Carcinoma invasivo cervical
LCR	Região longa de controlo
LSIL	Lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
MTX	Mitoxantrona
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NHDF	Fibroblastos humanos dérmicos normais
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NIV	Neoplasia intraepitelial vulvar
OMS	Organização mundial da saúde
Pa	Pascal
PDGFR	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	Potencial de hidrogénio
pRb	Proteína de retinoblastoma
PD-1	Proteína de morte celular programada 1
ROS	Éspecies reativas do oxigénio
RPM	Rotações por minuto

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Radioterapia
RTMI	Radioterapia de moderada intensidade
SFV	Simulante de fluído vaginal
SFVm	Simulante de fluído vaginal modificado
SILs	Lesões intraepiteliais escamosas
TEO	Óleo essencial de tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>)
TVR	Traquelectomia vaginal radical
VEGF	Fator endotelial de crescimento vascular
ZT	Zona de transformação

Capítulo 1

Introdução

Um dos grandes problemas de saúde enfrentado pelas mulheres jovens e sexualmente ativas, mundialmente, são as neoplasias intraepiteliais cervicais.¹ A infecção contínua por alguns dos tipos de papilomavírus humano (HPV) considerados de alto risco, resultam em lesões intraepiteliais escamosas (SILs). Caso estas ocorram no colo do útero (CU), as lesões designam-se de Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (NIC) e na região vulvar são denominadas de Neoplasias intraepiteliais vulvares (NIV). Quando não diagnosticadas e tratadas precocemente podem progredir para cancro malignos, especificamente, cancro do colo do útero (CCU), segundo tipo de cancro que mais afeta as mulheres com menos de 50 anos, e o quarto mais diagnosticado nas mulheres a nível global e importante problema de saúde pública.²

1.1 Lesões pré-cancerosas e cancerosas provocadas pelo

HPV

As SILs, terminologia dada pelo sistema de Bethesda, foi proposta de forma a simplificar a classificação dada anteriormente pelo sistema de Richart, que classificava as NIC em três graus histológicos: NIC 1, NIC 2, NIC 3 e carcinoma *in situ*. De acordo com o sistema Bethesda, as lesões designadas como NIC 1 são classificadas como lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL) e as NIC 2, NIC 3 e carcinoma *in situ* classificadas como lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL).²

A persistência da infecção por HPV, devido a diversos fatores como múltiplos parceiros sexuais, tabagismo, cervicite, etc., implica que a carga viral do vírus aumente e permaneça em níveis altos no organismo, levando ao desenvolvimento de lesões cervicais e o aumento da gravidade das mesmas.³ A NIC é bastante comum no cólo uterino. Caracteriza-se por lesões intraepiteliais pré-invasivas com a capacidade de regredir naturalmente para o epitélio normal, persistir na lesão ou nos casos mais graves progredir para um carcinoma invasivo.⁴

NIC 1, é dada por um diagnóstico histológico correlacionado à replicação viral, e considerada de baixo potencial de malignidade. Caracteriza-se basicamente por uma infecção viral pelo HPV, em geral autolimitada e que dificilmente progride para um carcinoma, representando apenas 1 a 2% dos casos de cancro.^{5,6} A maioria destas lesões são eliminadas pelo sistema imunológico no período de seis a doze meses após o seu aparecimento, apresentando uma taxa de regressão em mulheres jovens de mais de 90% e 70 a 80% em mulheres adultas. Entretanto, quando a infecção se torna persistente e não é tratada devidamente, estas lesões podem progredir para lesões de alto grau, as NIC 2 e NIC 3 e conseqüentemente para um carcinoma (Figura 1).⁶

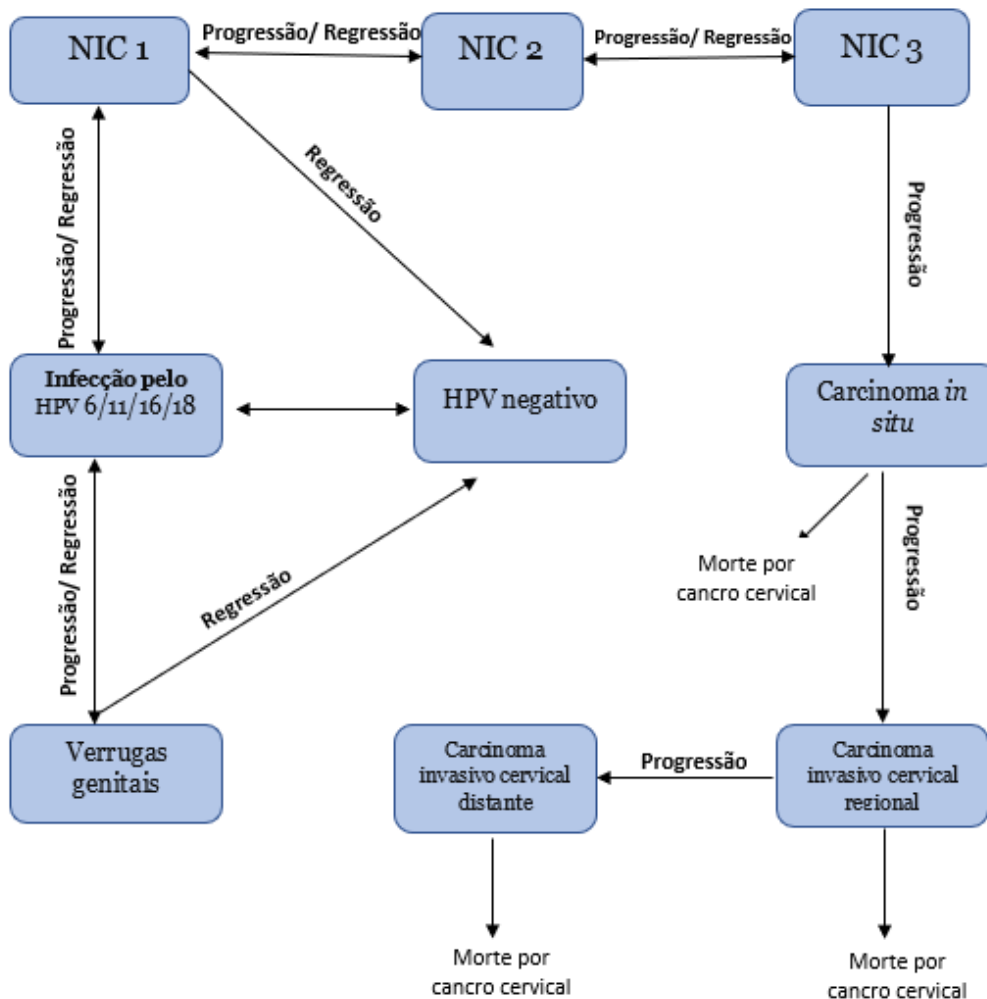


Figura 1. Perspetiva geral da estrutura epidemiológica da infecção pelo HPV. (Adaptado da referência 7) A infecção pelo HPV pode progredir para verrugas genitais ou para NIC (Graus 1, 2, 3) com possível progressão para CCU. No entanto, pode ocorrer regressão das lesões de maior grau para as de menor grau. Apenas o CCU confere um risco adicional de mortalidade. HPV= Papilomavírus humano; NIC= Neoplasia Intraepiteliais cervical; CCU= Cancro de cólo do útero.

Normalmente as lesões NIC1 apresentam células epiteliais superficiais alteradas com núcleos grandes, hiper cromáticos e halos citoplasmáticos perinucleares, característico dos condilomas. Estudos prévios demonstraram que as lesões NIC 2, assim como a NIC 1, apresentam uma alta taxa de regressão, embora a taxa de progressão seja maior.

Já as lesões NIC 3 são consideradas altamente malignas, com elevado potencial para progredir para um carcinoma invasivo, com uma taxa de 0,2% a 4% em até doze meses.⁸ No entanto, as lesões NIC 2 e NIC 3 apesar de estarem correlacionados na maioria das vezes com tipos de HPV de alto risco, quando decorrentes de infeções por HPVs considerados de baixo risco, podem

levar até 5 anos para se instalarem e 20 a 30 anos para progredirem para um carcinoma invasivo.⁹

As lesões de alto grau (NIC 2 e NIC 3) embora apresentem um alto grau de malignidade e assumam implicitamente o mesmo prognóstico, é impraticável determinar se têm ou não a mesma probabilidade de progressão e regressão. Caracterizam-se por um elevado número de células pré-cancerosas na superfície do colo uterino. Há um aumento de células atípicas, com diferentes variações na relação núcleo/citoplasma, e uma perda progressiva da diferenciação até que todo o tecido esteja totalmente comprometido com células atípicas com elevado potencial de se tornarem malignas (carcinoma) e invadirem outros tecidos (Figura 2).⁹

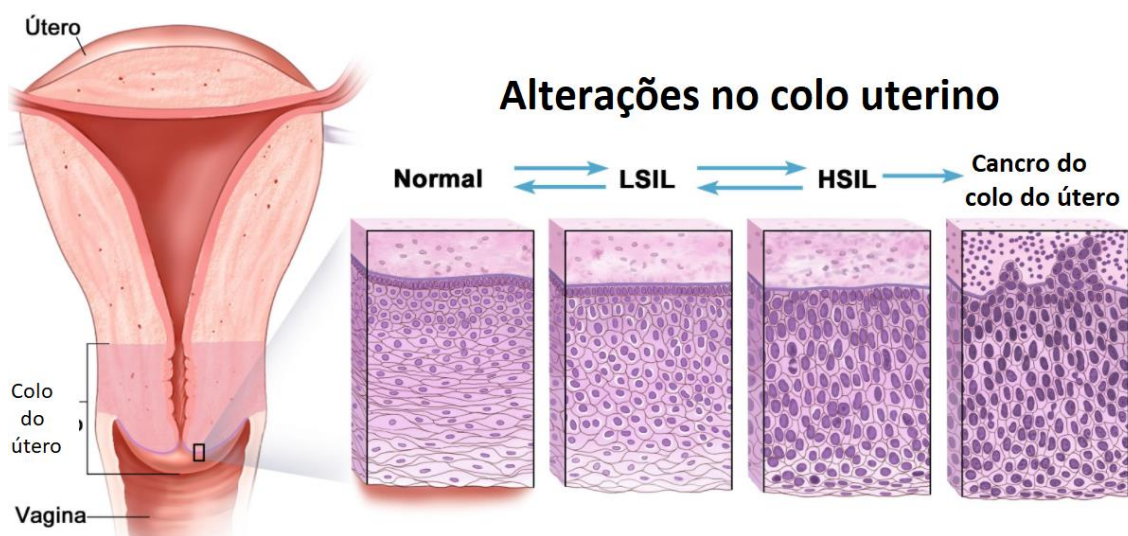


Figura 2. Representação ilustrativa das alterações celulares do colo uterino na presença de infecção por HPV. (Adaptado de referência ¹⁰)

O risco de desenvolvimento de um carcinoma do colo uterino é relativamente maior em mulheres diagnosticadas com NIC¹¹. O carcinoma *in situ* (CIS) é caracterizado pela malignidade pré-invasiva limitada ao epitélio, em que as células cancerígenas não possuem a capacidade de invadir a membrana basal.¹²

Quando há a invasão da membrana basal pelas células pré-cancerosas de alto grau, é designado de carcinoma invasivo cervical (ICC), variando dos estágios I (localizado no colo do útero) ao IV (quando atinge órgãos distantes). Quando constituído por células semelhantes às do epitélio escamoso, o ICC é denominado de carcinoma de células escamosas invasivas, e quando apresenta elementos glandulares e escamosos juntos este é denominado de adenocarcinoma.¹²

1.2 Vírus do Papiloma Humano (HPV)

Há mais de 40 anos foi comprovado o importante papel do HPV no desenvolvimento da maioria dos cânceros cervicais, sendo considerado o agente infeccioso sexualmente transmissível mais comum no mundo (Figura 3).^{13,12} É responsável por mais de 5% de todos os cânceros humanos, e 30% de todos os cânceros relacionados a agentes infecciosos.^{13,14} Estima-se que o número de novos casos de cânceros decorrentes de infecções por HPV seja de aproximadamente 630 000, dos quais 570 000 em mulheres e 60 000 nos homens, sendo o número de mortes de 250 000, por ano no mundo inteiro.^{15,14} Também é reportada sua correlação com outros cânceros anogenitais, de cabeça e pescoço e de alguns tipos específicos à cânceros cutâneos, sendo por isso um foco intensivo de diversas pesquisas.^{13,7}

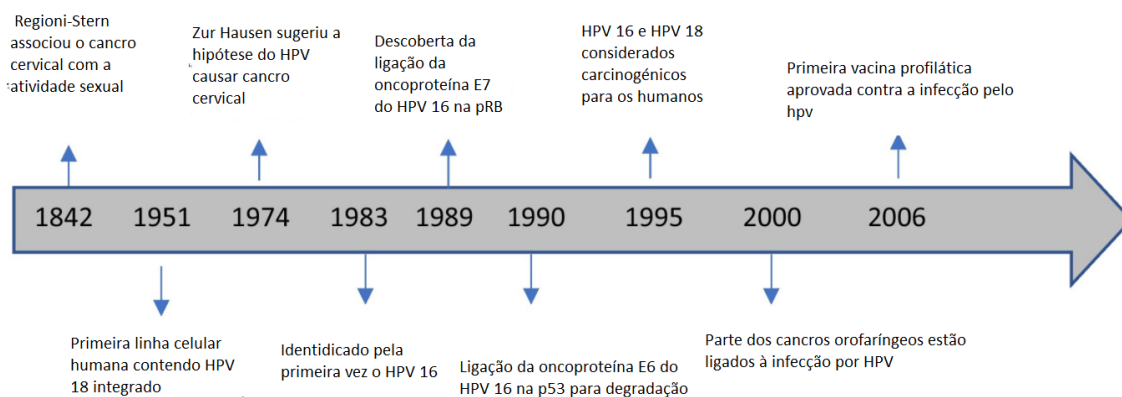


Figura 3. Principais marcos envolvidos na patologia do HPV. (Adaptado de referência ¹⁵)

1.2.1 Tipos de HPV

Considerados bastante heterogêneos, mais de 300 genótipos de papilomavírus já foram identificados, dos quais cerca de 200 são capazes de infectar os humanos, e destes 40 podem infectar o trato anogenital e causar lesões benignas ou pré-cancerosas.^{15,16} Os tipos de HPV encontrados em humanos são classificados em 5 géneros, baseado nas diferenças da sua sequência de DNA genómica, e são nomeadamente, α -papilomavírus, β -papilomavírus, γ -papilomavírus, μ -papilomavírus e ν -papilomavírus, sendo que os géneros α , β e γ -papilomavírus representam os maiores grupos (Fig. 4).^{15,17} O género α , considerado o maior, compreende 64 tipos de HPVs que são capazes de infectar o colo uterino e as mucosas anal e peniana.¹⁸

Os tipos de HPV são divididos em dois grandes grupos, baixo risco e alto risco, definida pela afinidade de ligação das oncoproteínas aos genes supressores tumorais (p53 e pRb), que se fundamenta no risco da célula infectada perder o controlo do ciclo celular e transformar-se em maligna.¹⁹

Os HPVs de baixo risco, dentre eles os HPV 6,11, 40, 42, 43, 54, 61, 72, estão mais associados ao desenvolvimento de verrugas ou condilomas anogenitais, enquanto que os de alto risco, nomeadamente os HPVs 16, 18, 31,33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 estão relacionados com câncros anogenitais e lesões neoplásicas precursoras.^{16,20} O DNA dos HPVs de tipos considerados de alto risco, está presente em aproximadamente 99% dos CCU, em que o tipo mais prevalente é o HPV 16, seguido pelos tipos 18, 31, 33 e 45.²¹

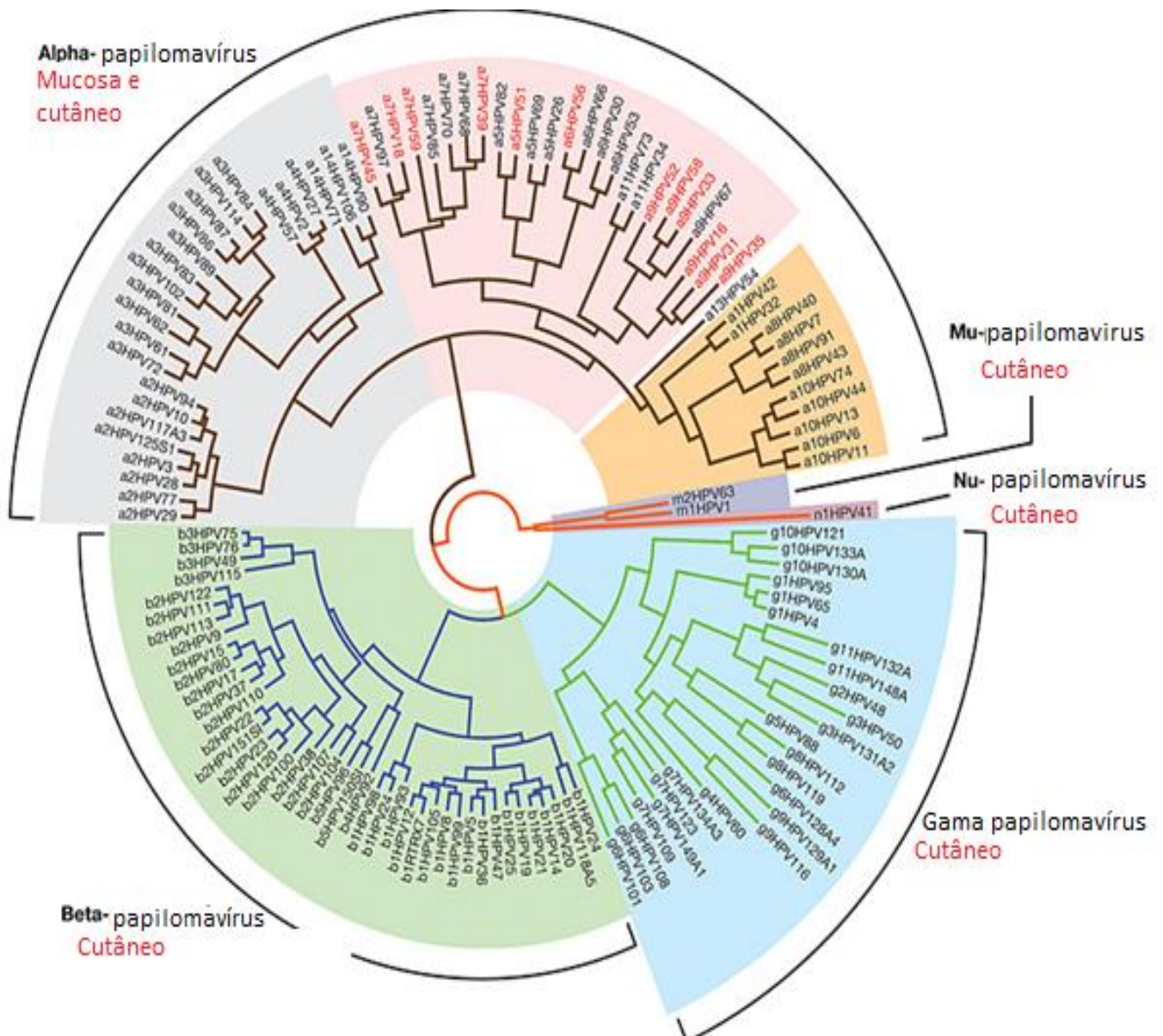


Figura 4. Ilustração dos tipos de HPV pertencentes a cada gênero e o tropismo de cada um. Representados em vermelho os tipos de HPV de alto risco (cancerígenos). Os tipos do grupo α geralmente apresentam tropismo pelo epitélio cutânea e pela mucosa. Os representados na parte cinza são os cutâneos considerados de baixo risco, em rosa os da mucosa de alto risco e em laranja os com tropismo pela mucosa e considerados de baixo risco. (Adaptado de referência ¹⁷)

1.2.2 Estrutura e organização do genoma do HPV

O HPV é um pequeno vírus pertencente à família *Papillomaviridae*, contendo DNA circular de cadeia dupla. É um vírus icosaédrico não envelopado (diâmetro 50-55 nm) com um genoma episomal de aproximadamente 8 000 pares de base (pb)¹⁵, que pode ser dividido em 3 regiões. Uma região inicial denominada de “Early” (E) com quadros de leitura aberta para 7 proteínas regulatórias expressas precocemente, nomeadamente E1, E2, E4, E5, E6 e E7; uma região tardia “Late” (L) contendo quadros de leitura aberta para duas proteínas estruturais da cápside expressas tardiamente, L1 e L2; e uma região reguladora, denominada de Região Longa de Controlo (LCR) (Figura 5).^{17,22}

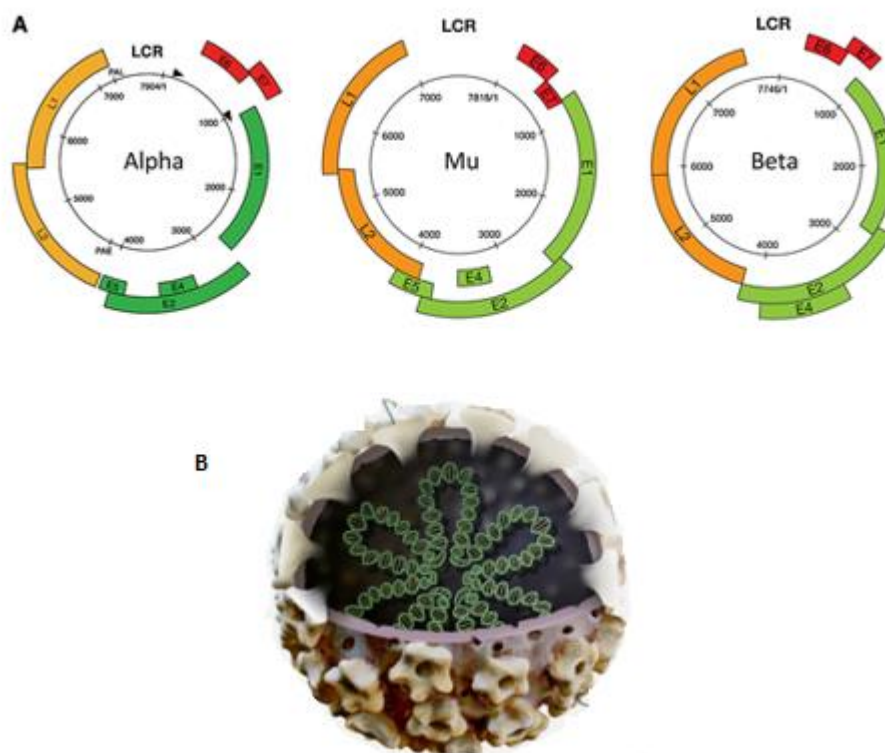


Figura 5. Ilustração da estrutura típica do genoma de três sub-gêneros do HPV. (A) Apesar de todos compartilharem uma organização genética comum, o tamanho e a posição das suas regiões podem variar. Os tipos de HPV pertencentes ao β - papiloma vírus não possuem a região E5. As setas marcadas no mapa genômico do α -papiloma vírus representam a região das principais proteínas oncogénicas. (B) Representação esquemática da estrutura do HPV contendo o DNA do vírus no interior de uma cápside proteica. (Adaptado de referência ^{17, 23}).

A denominação das regiões contidas no genoma viral (iniciais e tardias) está relacionada com as posições dos genes dentro do genoma e da janela temporal de expressão durante o ciclo do HPV. As proteínas codificadas pelos genes da região inicial (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) são as responsáveis pela replicação, transcrição viral e a transformação oncogénica.²

A proteína codificada pelo E2 desempenha um papel auxiliar na replicação viral e também funciona como regulador negativo da expressão dos genes virais E6 e E7, como reportado em alguns estudos.¹⁶

Os genes E6 e E7, que são oncogenes, codificam as principais proteínas transformadoras dos HPVs considerados oncogénicos (como HPV16 e 18), mas também desempenham papéis importantes no ciclo de vida normal do vírus.¹⁶ A expressão de E6 e E7 é necessária durante a infecção para que as células se mantenham mitoticamente ativas.¹⁵

As proteínas L1 e L2 são expressas no final da diferenciação nas camadas superiores do epitélio, e é sempre seguida da expressão da E4. A L1 é a proteína principal da cápside enquanto a L2 a proteína menor.²

1.2.3 Ciclo de vida do HPV

O HPV por ser um vírus específico, infecta e replica apenas num epitélio escamoso e com capacidade de diferenciação.¹⁶ O ciclo viral inicia-se com a infeção de uma das células em divisão da camada basal do epitélio pelo HPV, decorrente de microlesões no epitélio. A ativação do ciclo celular ocorre conforme a célula infectada se diferencia e cria um ambiente favorável para que ocorra a replicação e a amplificação do genoma viral.¹⁵ Posteriormente à entrada na célula, o genoma do HPV é transportado para o núcleo e começam a ser expressas as primeiras proteínas virais.²² Após algum tempo começa a diferenciação dos queratinócitos através da ativação dos genes virais tardios, em que são expressas as proteínas virais tardias L1 e L2, que auxiliam a amplificação do genoma e produção de viriões, nas camadas superiores de diferenciação do epitélio.²⁰ O vírus e a célula, inicialmente, replicam-se juntos e o número de cópias é mantido em torno de 50 a 100 cópias nas células filhas. Essa fase é mediada pelas proteínas virais E5, E6 e E7.¹⁶ Nos HPV de alto risco (cancerígenos), enquanto as células se dividem, a expressão das proteínas virais é altamente controlada, sendo os oncogenes E6 e E7 expressos em níveis muito baixos¹⁸, no entanto nos casos de malignidade inicial, há uma perda do controlo da expressão de E6 e E7, e a expressão génica na célula torna-se desregulada.¹⁵ O mecanismo de ação das oncoproteínas E6 e E7 passa por interromper o controlo do ciclo celular através da sua interação com a proteína supressora de tumor p53 e da proteína retinoblastoma (pRb). A proteína E6 degrada o p53 através da via ubiquitina proteassoma e a E7, através da ligação a pRb, bloqueia a atividade do fator de transcrição E2F, resultando na perda do controlo do ciclo celular, facilitando a progressão do ciclo celular.¹⁹

A integração do DNA viral no genoma do hospedeiro é essencial para desencadear o processo de carcinogénese induzida pelo HPV, sendo a E2 a região mais afetada durante o processo, podendo levar à sua deleção. Essa integração pode ocorrer pela instabilidade genómica causada pelas oncoproteínas E6 e E7, devido as quebras aumentadas das cadeias de DNA tanto do hospedeiro como do genoma viral. Por ser a região genómica mais afetada, o E2 deixa de atuar como um regulador negativo do E6 e E7, e estes começam a ser expressos de forma descontrolada levando a carcinogénese. Para além da integração genómica, estudos demonstraram que os mecanismos de hipermetilação do HPV também levam ao bloqueio da região E2, causando uma expressão desregulada dos oncogenes.¹⁵

Ao perder a sua capacidade de replicar produtivamente e sintetizar novas partículas, o genoma viral do HPV pode permanecer por muitos anos em células epiteliais em divisão ativa, resultando em uma infecção persistente.²² Entretanto numa infecção normal, após a divisão celular da camada basal, a célula infectada se tornará em uma célula amplificadora, destinada a completar a diferenciação epitelial e movimentar-se através das camadas epiteliais.²² O tempo decorrente entre a infecção e a geração do vírus infeccioso é cerca de 3 semanas.¹⁶

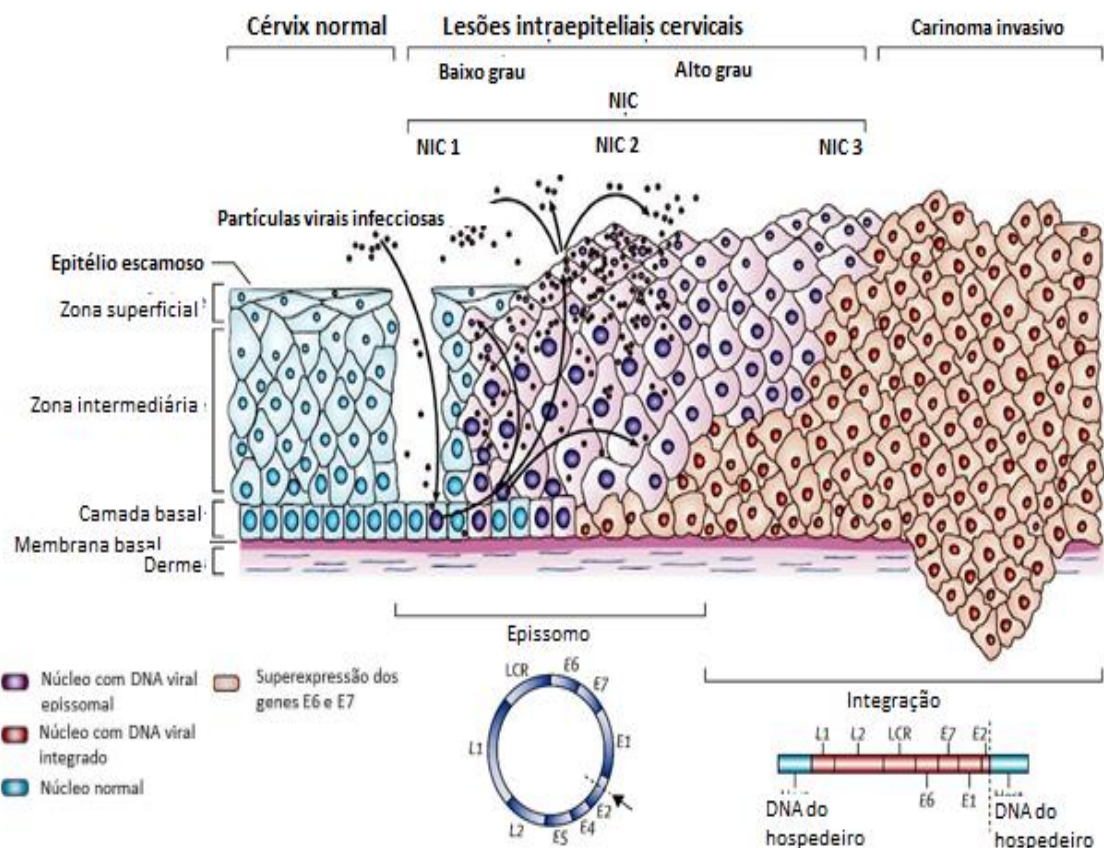


Figura 6. Ilustração do ciclo de vida e do processo de carcinogênese do HPV em células do epitélio escamoso. (Adaptado de referência ²⁴)

1.3 Tratamento das lesões derivadas de infecções pelo HPV

Na grande maioria dos casos, as infecções pelo HPV nas mulheres apenas são detectadas quando as lesões já passaram do NIC 1 ou então quando já há desenvolvimento de um cancro. Estão disponíveis atualmente no mercado, três vacinas profiláticas contra o HPV, a Cervarix®, que é uma vacina bivalente contra os HPVs de alto risco 16 e 18, a Gardasil®, vacina quadrivalente direcionada para os HPVs 6, 11, 16, e 18 e a Gardasil 9®, que é uma vacina nonavalente direcionada para tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58². Embora sejam vacinas bastante eficientes na profilaxia do HPV, são ineficazes em casos de infecção pré-existente pelo HPV, logo não sendo benéficas para os indivíduos já infectados pelo vírus.¹¹

O objetivo inicial do tratamento das lesões causadas pelo HPV é diminuir a transmissibilidade da infecção principalmente quando se tem a presença de verrugas (condilomas), onde parece ser mais significativo eliminar os sintomas, amenizar a carga psicológica e melhor a estética do paciente. Entretanto, ainda não existe um tratamento comprovadamente capaz de eliminar o vírus nem um tratamento ideal para todos os pacientes, estando disponíveis tratamento químicos, físicos e imunomoduladores.^{25,26}

1.3.1 Terapêuticas das verrugas genitais

O tratamento das verrugas genitais, visa eliminar as lesões, melhorando a estética do paciente e um controlo adequado da doença. Inclui tratamentos tópicos (químicos, imunomoduladores ou excisionais) ou sistêmicos (Tabela 1).²⁵

Tabela 1. Métodos de tratamento das verrugas genitais. (Adaptado de referência ²⁶)

Tipo de Tratamento	Mecanismo de ação	Administração	Aplicação intravaginal ou intra-anal
Tópico			
Podofilotoxina	Anti-mitótico	Paciente	Não
Imiquimod	Imunomodulador	Paciente	Não
Sinecatequinas	Anti-oxidante, antiviral e anti-tumoral	Paciente	Desconhecido
5-Fluorouracilo	Quimioterápico	Médico	Sim
Tratamentos destrutivos e cirúrgicos			

Ácido tricoloracético (ATA)	Destruição química das proteínas teciduais	Médico	Sim
Crioterapia	Destruição dérmica induzida por baixas temperaturas	Médico	Sim
Excisão cirúrgica	Excisão do tecido anômalo	Médico	Sim
Laser CO2	Vaporização de lesões por ação de infravermelhos	Médico	Sim
Terapia fotodinâmica	Destruição pela aplicação de feixe de luz	Médico	Sim
Tratamento sistêmico			
Interferon	Imunomodulador	Médico	Sim
Isotretinoína	Imunomodulador	Paciente	Sim

1.3.2 Terapêuticas destrutivas das NIC

A finalidade do tratamento das NIC é impedir a progressão das lesões para um cancro invasivo. A escolha do tratamento para NIC ou CCU inclui ponderações importantes como a história natural e evolutiva das lesões, a segurança do diagnóstico citológico e histológico, os problemas anestesiológicos, os fatores de risco oncológicos, o desempenho clínico, a possibilidade de continuação do tratamento e o desejo da paciente em querer ter filhos ou não.^{27,28}

Visando a remoção/destruição total da zona de transformação (ZT), o tratamento pode ser destrutivo ou excisional (Tabela 2), no entanto qualquer tratamento destrutivo é contra-indicado quando já se tem um envolvimento do canal endocervical ou na presença de doença invasiva e também durante a gravidez. O tratamento excisional objetiva a remoção total da (ZT), em que é recomendável a excisão em peça única e que compreenda toda a lesão.²⁹

Tabela 2: Métodos de tratamentos destrutivos das lesões intraepiteliais cervicais. (Referência 29)

Métodos destrutivos	Princípio
Diatermocoagulação	Uso de um eléctrodo em forma de bola, com temperaturas variáveis entre 50 e 120°C, em que a destruição em profundidade depende da temperatura e da duração da aplicação. Este método deve ser evitado uma vez que a profundidade de destruição não é controlável.
Vaporização LASER CO2	É o método preferível, devido a sua precisão. Usado sob visualização colposcópica, com profundidade de destruição dependente da técnica utilizada pelo operador
Criocoagulação (crioterapia)	Uso de uma sonda metálica de tamanho variável, que se adapta ao colo uterino e provoca congelação tissular através da libertação de dióxido de carbono ou peróxido de azoto, que causa congelação intracelular e destruição da lesão.
Métodos excisivos	Princípio
Excisão da ZT “ a frio”	Maior risco de hemorragia, distorção anatómica e de estenose cervical, entretanto não possui efeitos flogísticos. Geralmente obtém um cone de maior altura. É realizada sob anestesia geral.
Excisão da ZT com ansa diatérmica	De todas é a que apresenta maiores efeitos flogísticos, tendo como limitações as lesões mais extensas e profundas. É uma técnica económica e fácil de implementar, com a vantagem de poder ser efectuada em ambulatório, sob anestesia local.
Excisão da ZT com agulha dérmica	Tem as mesmas vantagens da ansa dérmica, mas é mais versátil permitindo excisão única das lesões mais extensas e mais altas do canal endocervical.
Excisão da ZT com LASER CO2	É o método mais dispendioso, mas com efeitos flogísticos mínimos. Tem como vantagem permitir o controle da excisão da peça operatória, quer em profundidade quer em largura. Realizada sob anestesia local

1.3.3 Tratamentos do CCU

O estadiamento da doença é fundamental para o planeamento do tratamento (Tabela 3). Contrariamente às pacientes com CCU em estágio inicial ou localmente avançado, que têm acesso a tratamentos convencionais, incluindo cirurgia, radioterapia ou quimioterapia, os pacientes com cancro cervical metastático não têm tratamento padrão devido às manifestações heterogêneas da doença.³⁰

Tabela 3: Sistema de estadiamento de cancro do colo do útero da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO).³¹

Estágios	Características
Estágio I	Carcinoma limitado ao colo do útero.
IA	Carcinoma pré-clínico
IA1	Invasão do estroma ≤ 3 mm em profundidade e ≤ 7 mm em extensão.
IA2	Invasão do estroma > 3 mm e ≤ 5 mm em profundidade e ≤ 7 mm em extensão
IB	Lesões clínicas limitadas ao colo ou pré-clínicas com dimensões superiores ao estágio IA.
IB1	Carcinoma clinicamente visível, ≤ 4 cm
IB2	Carcinoma clinicamente visível, >4 cm
Estágio II	Carcinoma estende-se para além do colo, mas não atinge a parede pélvica, nem 1/3 inferior da vagina.
IIA	Tumor envolve até os 2/3 superiores da vagina, sem infiltração óbvia do paramétrio
IIA1	Carcinoma clinicamente visível, ≤ 4 cm, sem envolvimento do paramétrio
IIA2	Carcinoma clinicamente visível, > 4 cm, sem envolvimento do paramétrio
IIB	Carcinoma infiltra o paramétrio, sem atingir a parede pélvica.
Estágio III	Carcinoma estende-se á parede pélvica e/ou invade o 1/3 inferior da vagina.

IIIA	Invasão do 1/3 inferior da vagina, sem atingir a parede pélvica
IIIB	Extensão à parede pélvica, e/ou hidronefrose, e/ou rim não funcionante
Estágio IV	Carcinoma estende-se para além da pelve e/ou invade a mucosa da bexiga e/ou reto
IVA	O tumor invade a mucosa da bexiga e/ou do recto
IVB	Metástases à distância

1.3.3.1 Tratamentos Cirúrgicos

O tratamento cirúrgico do CCU é apontado como o mais eficaz, principalmente quando em estágio inicial e de baixo risco da doença.²⁸ Tem como objetivo a remoção total de todas as células cancerígenas, o que pode incluir a remoção de um cone do colo do útero (conização), a remoção completa do útero e do colo uterino (histerectomia) ou a remoção parcial do CU (traquelectomia), em que o corpo do útero é mantido.²⁹

A histerectomia radical com linfadenectomia pélvica é considerado o tratamento padrão para o CCU em estado inicial, como é o caso de pacientes com doença nos estágios IA2 e IIA1 enquanto que a histerectomia simples ou é mais indicada para pacientes no estágio IA1.³²

Uma opção cirúrgica de tratamento, razoável para poupar a fertilidade em pacientes com cancro nos estágios IA2 ou IB1, é a traquelectomia vaginal radical (TVR), em que é removido o colo do útero, as margens vaginais e os ligamentos de suporte, mantendo intactos o corpo principal e o fundo do útero.³² O tratamento cirúrgico deve ser realizado ou assistido por laparoscopia ou então por laparoscopia robótica.²⁸

1.3.3.2 Radioterapia

A radioterapia (RT), introduzida em 1913 como método de tratamento do CCU, foi pressuposta tão eficaz quanto a cirurgia.²⁸ Pode ser utilizada no CU como tratamento único, visando erradicar o tumor ou como tratamento auxiliar, posteriormente a uma intervenção cirúrgica, associando-se ou não a quimioterapia e em alguns casos pode ser indicado como tratamento complementar com recurso a braquiterapia intra-cavitária, um dos métodos de RT interna.

Existem dois tipos de tratamentos de radioterapia para o CCU. A RT externa, em que é administrada uma radiação através de um aparelho de grande dimensão que incide o feixe de radiação na região alvo, com elevada precisão. Não há necessidade de internamento para este tipo de terapia, e tem um período de duração de 5 a 7 semanas, com até 5 sessões por semana.²⁸

O outro tipo de RT é a intracavitária, ou RT interna, em que a radiação é aplicada com auxílio de implantes contendo substâncias radioativas na vagina da paciente. É um tratamento de curta duração, podendo demorar horas ou dias, e posteriormente retirados os implantes. Implica o internamento da mulher e algumas medidas de proteção de forma a prevenir que outras pessoas sejam expostas a radiação. A Radioterapia de Intensidade Modulada ou Arcoterapia (RIMT), um método de radioterapia intracavitária, é a técnica mais utilizada, pois permite conformar o feixe de radiação e poupar os tecidos saudáveis, diminuindo os efeitos adversos do tratamento.²⁸

Para pacientes considerados de alto risco, com linfonodos pélvicos, margem cirúrgica e/ou paramétrio positivo, recomenda-se a braquiterapia vaginal, considerada útil também quando se tem margens da mucosa vaginal positivas.

Pacientes com estágios avançados do tumor, IIA2 e IIB2, tratados simultaneamente com radioterapia e quimioterapia contendo cisplatina apresentaram uma melhoria significativa da sobrevida.³³

1.3.3.3 Quimioterapia

A indicação da quimioterapia é dada em duas situações: terapia primária no tratamento da doença em estado avançado/recorrente ou juntamente com a radioterapia (quimioradioterapia) para o tratamento de tumores localmente avançados. O CCU é considerado relativamente resistente à quimioterapia, devido às respostas limitadas ao tratamento, ao comprometimento da vascularização de tratamentos anteriores e da função renal, à natureza agressiva dos tumores recorrentes e a curta duração da resposta, que dura aproximadamente 4 a 6 meses. A quimioterapia de primeira linha baseia-se em combinações à base de platina, direcionada para o tratamento de CCU metastático, embora raramente forneça um controlo permanente da doença. Estudos anteriores demonstraram que a combinação de bevacizumabe com quimioterapia de primeira linha melhora significativamente a sobrevida global média por um período de 3,7 meses. Já no caso da quimioterapia de segunda linha as taxas de resposta foram consideradas baixas e não foi evidenciado nenhum benefício de sobrevivência.³⁴

A cisplatina tem sido considerado o tratamento mais ativo para o CCU avançado/recorrente, com uma taxa de resposta de 21-44%, e uma sobrevida média de 6,1 a 7,1 meses.³⁵ Vários estudos demonstraram que a combinação da cisplatina com outros fármacos, como a ifosfamida e paclitaxel, melhorou consideravelmente a resposta, estabelecendo a quimioterapia à base de cisplatina como padrão de tratamento do CCU recorrente ou metastático.^{35, 34}

1.3.3.4 Terapias direcionadas

Uma grande aposta no tratamento de CCU, são as terapias antiangiogénicas, que podem aumentar a sobrevida clínica dos pacientes e oferecer uma qualidade de vida relativamente melhor. Esse tipo de tratamento visa o bloqueio das vias de sinalização específicas de células

cancerosas que estimulam o crescimento.³⁶ A angiogénese desempenha um papel crucial na carcinogénese do CCU.³⁵

O bevacizumabe foi um dos primeiros agentes antiangiogénicos com boa eficácia no CCU, e recomendada pelas diretrizes como o padrão de tratamento.³⁷ É um anticorpo monoclonal anti-VEGF humanizado, que tem como mecanismo de ação bloquear o fator endotelial de crescimento vascular (VEGF) e consequentemente impedir que os tumores estimulem o crescimento dos vasos sanguíneos levando à diminuição dos cancros uterinos atrasando a sua progressão e diminuindo a toxicidade.^{35,34,37}

Além do bevacizumabe, outros fármacos adicionais tem sido estudados como potenciais anticancerígenos no CCU avançado. O pazopanibe, uma pequena molécula intracelular de tirosina quinase, inibidor da angiogénese, que atua no receptor de VEGF e no fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR), e o sorafenibe, que inibe a ação da multiquinase, também foram retratados como possíveis agentes antiangiogénicos eficazes no tratamento do cancro cervical.^{34,35}

1.3.3.5 Imunoterapia

Outra forma de tratamento dos cancros cervicais é a imunoterapia, em que o sistema imunológico do paciente é usado para combater o cancro.

O pembrolizumabe, é considerado um inibidor do ponto de verificação imunológico. Foi aprovado recentemente para uso em pacientes com história de CCU recorrente e metastática que expressam a proteína de morte celular programada 1 (PD-1).³⁷

1.4 Formulações vaginais para entrega de fármacos

1.4.1 Ambiente vaginal

A vagina apresenta um epitélio com uma espessura em torno de 200-300µm, variando de acordo com a idade e os níveis hormonais (Figura 7). Apesar de em condições normais não ter glândulas secretoras e carecer de células caliciformes, esta é considerada uma mucosa. A superfície vaginal é revestida e protegida por uma fina camada de líquido, o muco vaginal, que inclui secreções endometriais e tubárias, transudato vaginal, resíduos de urina e produtos da autólise celular. Estudos anteriores sugerem uma produção de fluído vaginal de até 6g por dia, e o volume presente na vagina de sensivelmente 0,5-1 mL, em que há presença significativa de compostos como ácido láctico, glicerol, ácido acético, ureia e glicose.^{38,39} A produção de muco vaginal varia de acordo com a fase do ciclo celular em que ocorrem as alterações hormonais, com a maior taxa de produção durante a fase ovulatória, e diminuindo consideravelmente (50 a 30%) durante as fases folicular e lútea. As características do muco cervical também variam consoante as fases do ciclo menstrual, apresentando-se mais fino e facilmente penetrável durante a primeira metade do ciclo, e mais espesso e em menores quantidades na segunda fase do ciclo. A viscosidade do muco é aumentada com o uso de hormonas anticoncepcionais e reduzida com as alterações que ocorrem na flora vagina, por exemplo na presença de infeções.³⁸

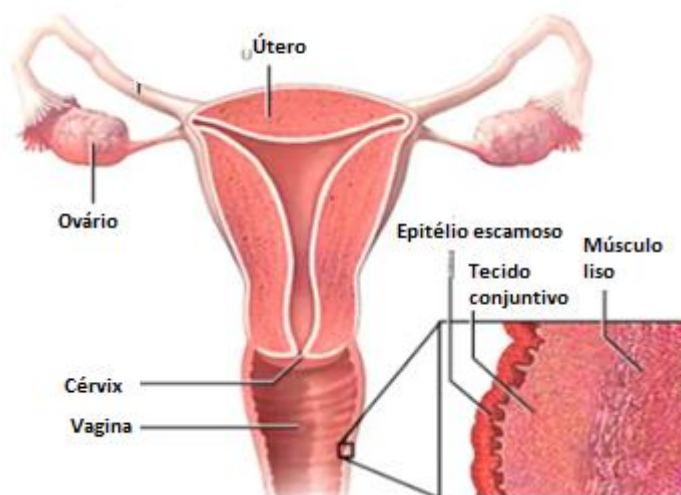


Figura 7. Representação esquemática do epitélio vaginal. (Adaptado de referência ⁴⁰)

A via vaginal é uma importante via de administração de fármacos locais ou sistêmicos, tanto para o tratamento de infecções ou lesões vaginais como também uma alternativa eficaz para a entrega de fármacos locais de forma a minimizar os efeitos adversos da quimioterapia. Suas características específicas como, grande área de superfície, permeabilidade relativamente alta a determinados medicamentos, autoinserção, circulação sanguínea abundante, ausência do efeito de primeira passagem hepática, conferem-lhe um potencial significativo para a entrega de diversos compostos.⁴¹

1.4.2 Formulações vaginais

O desenvolvimento de um produto farmacêutico seguro, eficaz e aceitável, requer uma formulação apropriada, capaz de ultrapassar os diversos obstáculos que a vagina apresenta em termos de administração de fármacos. Estas devem ser de aplicação reversível, fáceis de usar, indolores para a paciente, de elevado custo-benefício e seguras para administração continuada, além de permitir a autoadministração e interferir minimamente no normal funcionamento corporal e na vida diária.⁴²

Atualmente as formas farmacêuticas convencionais mais frequentemente administradas por via vaginal são os supositórios vaginais, comprimidos e as formulações semissólidas (pomadas, géis e cremes), de venda livre ou sujeitos a receita médica. Estas formas farmacêuticas são destinadas à entrega de fármacos anti-infecciosos (antifúngicos, antiprotozoários, antibacterianos, antivirais), queratoplásticos, cicatrizantes, espermicidas, entre outros.

As formulações semissólidas apresentam um aspeto homogêneo, com propriedades viscoelásticas de fluidos não-newtonianos. São as formas farmacêuticas vaginais mais utilizadas e elegidas pelas mulheres no tratamento de problemas vaginais, demonstrando ser tão eficazes

quanto o tratamento por via oral. Apresentam como principais vantagens a aceitabilidade, viabilidade e baixo custo, para além de evitar danos aos tecidos saudáveis e evitar o metabolismo hepático de primeira passagem.⁴² No entanto podem apresentar desvantagens como desconforto, escorrimento, interferência nas relações sexuais, reduzido tempo de residência do medicamento devido ao fluido vaginal, o que pode resultar em uma menor absorção e distribuição do medicamento.⁴³

Como exemplos de formulações semissólidas vaginais comercialmente disponíveis na Europa e nos Estados Unidos da América, com diferentes fins terapêuticos, encontram-se antibacterianos (Dalacin V®), antifúngicos (Dermofix®, Gino-Canesten®, Gino Travogen®, Gyno-Pevaryl®, Lomexin® e Sertopic®) e estrogénios de aplicação vaginal (Blissel®, Colpotrophine® e Ovestin®). Estes foram caracterizados anteriormente por Machado e colaboradores, e demonstraram não apresentar as características tecnológicas ideais quando testadas sob condições fisiológicas, como mostrado. Os problemas de escorrimento e desconforto, estão fortemente relacionados com as características reológicas e osmolalidade dos produtos vaginais.³⁹ Com isto o perfil viscosimétrico ideal para formulações vaginais é o tixotrópico, em que as propriedades da viscosidade variam com a tensão aplicada, ou seja diminuem com o tempo de aplicação da taxa de cisalhamento e voltam a aumentar quando esta cessa e a osmolalidade não deve ser maior que o limite máximo definida pela organização mundial da saúde (OMS), que é 1200 mOsm / Kg.³⁹

1.4.3 Óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)

Thymus vulgaris popularmente conhecido como tomilho, é uma erva aromática e medicinal rica em óleo essencial, de grande interesse comercial, pertencente à família Lamiaceae. Contém na sua constituição monoterpenos oxigenados e hidrocarbonetos monoterpenos como os principais constituintes químicos, sendo que o timol, carvacrol, p-quimeno, borneol, trans-cariofileno e hidrato de cis-sabinemo, são encontrados em maiores concentrações.^{44,45} Sua vasta gama de compostos são responsáveis pelas diversas atividades farmacológicas que este possui, entre elas propriedades antimicrobianas⁴⁶, antifúngicas⁴⁷, antioxidantes e anticancerígenas.⁴⁸

O óleo essencial de tomilho é um dos 10 óleos essenciais extraídos de plantas mais comercializados mundialmente.⁴⁹ É constituído essencialmente por dois compostos fenólicos, timol (2-isopropil-5-metilfenol) e o carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol), no entanto outros componentes como cineol, cimeno, α -pineno e borneol, estão presentes em concentrações mais reduzidas.⁵⁰ Pode conter até 30 monoterpenos, resultando em uma composição química que difere dos restantes óleos derivados de plantas da mesma espécie.⁴⁹ Presume-se que suas atividades farmacológicas estejam relacionadas principalmente com o timol, um dos principais constituintes (10 a 64%)⁵¹ seguido do seu isómero, o carvacrol (0,4 a 20,6%)(Figura 8).⁵⁰

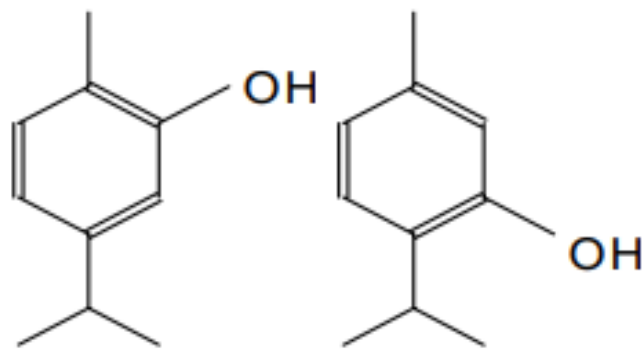


Figura 8. Estrutura química dos monoterpênos, a esquerda, timol e a direita o carvacrol. (Adaptado de referência ⁵²)

Estudos anteriores demonstraram que o timol apresenta citotoxicidade para algumas linhas de células cancerosas ^{53,52}. Embora não esteja muito bem detalhado na literatura, o mecanismo de ação do timol e seus derivados inclui a supressão do crescimento celular, indução da apoptose, produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) intracelular, despolarização do potencial de membrana mitocondrial com ativação da proteína Bax (proteína mitocondrial pró-apoptótica) e interação com as caspases (Figura 9).⁵⁴

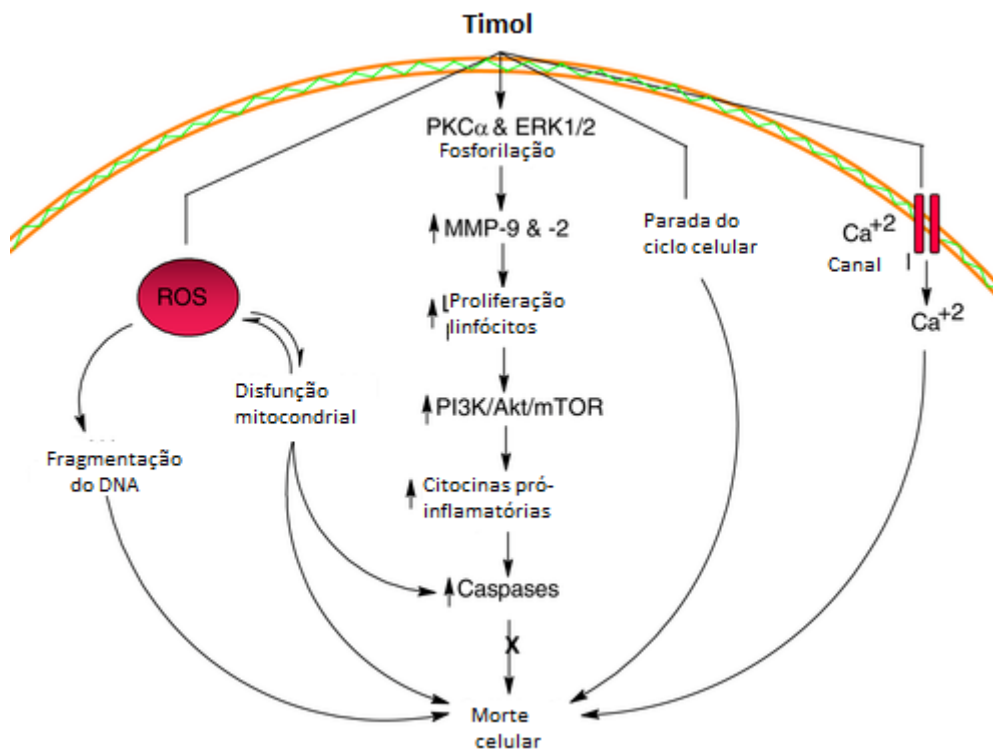


Figura 9. Esquema ilustrativo da atividade anticancerígena do timol nas células cancerosas. (Adaptado de referência ⁵⁴).

O timol pode causar disfunção mitocondrial pelo stress oxidativo causado na célula e consequentemente levar à apoptose intrínseca e extrínseca nas células cancerosas. No entanto, a sua atividade anticancerígena pode também estar relacionada com o efeito antioxidante e citoprotetor, juntamente com a atividade antiapoptótica, anti-inflamatória e antígeno-tóxica que exerce nas células normais (Figura 10).⁴⁴

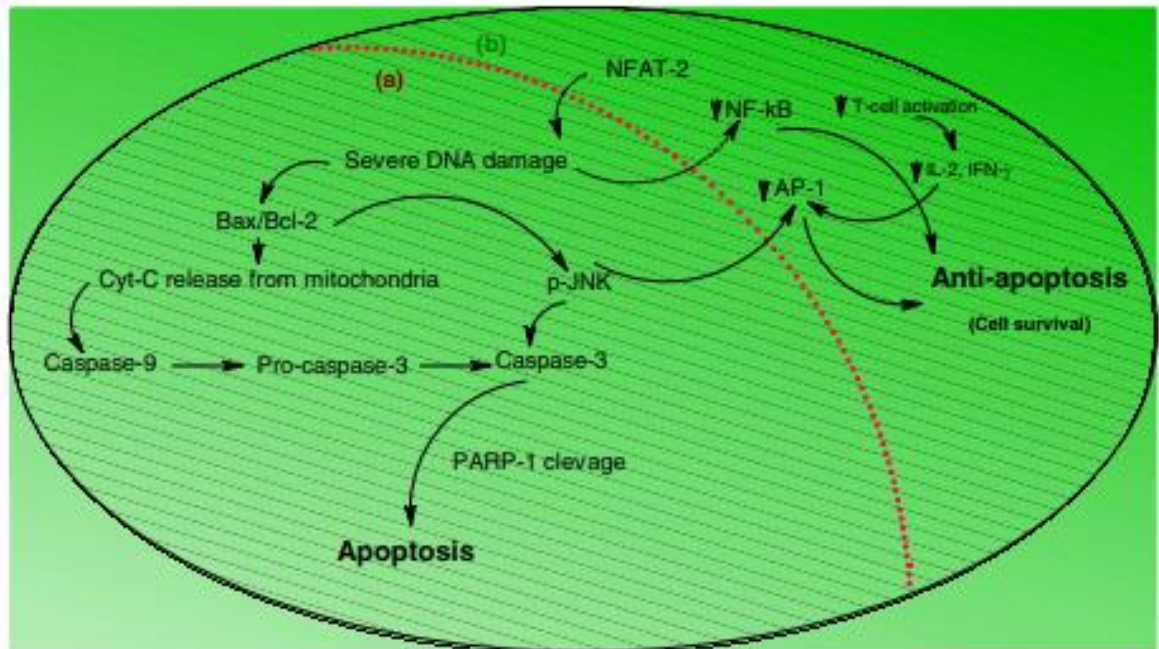


Figura 10. Possível mecanismo anticancerígeno do timol por vias de apoptose e anti-apoptose. a) Via anticancerígena numa célula cancerosa: o timol pode causar danos graves ao DNA pela indução de ROS, e consequente aumento do stress oxidativo/ disfunção mitocondrial ou ativação do fator nuclear das células T e ativando a via da apoptose. b) Via anticancerígena numa célula normal: o timol reduz a ativação das células T, resultando na regulação negativa da via apoptótica e sobrevivência da célula. (Adaptado de referência ⁵⁴)

1.4.4 Mitoxantrona

O desenvolvimento de medicamentos quimioterápicos citostáticos e citotóxicos é bastante fomentado, devido ao alto índice de morbidade e mortalidade por doenças neoplásicas. A mitoxantrona, (MTX, 1,4-dihidroxi-5,8-bis [2- (2-hidroxi-etilamino) etilamino] antraceno-9,10-diona) é um fármaco sintético quimioterápico, pertencente ao grupo das antracenedionas, desenvolvida no ano de 1980, como alternativa às terapias com antraciclinas, por apresentar uma melhor atividade tumoral e reduzida cardiotoxicidade.⁵⁵ Apesar de ser considerada menos cardiotóxica, alguns estudos revelaram que a sua toxicidade aumenta ao longo da terapia e que apresenta uma cardiotoxicidade semelhante à da doxorubicina.^{55,56} É o único medicamento da classe da antracenediona aprovado para uso clínico e apresenta um amplo espectro de atividade tumoral.⁵⁷ É clinicamente utilizada no tratamento de diversos tipos de cânceros, como o cancro de mama, leucemia aguda, cancro de próstata, linfoma e devido as suas propriedades

imunossupressoras começou a ser usada no tratamento das formas ativas de esclerose múltipla recorrente.^{55,58}

É uma molécula estruturalmente simétrica, compreendendo um cromóforo plano tricíclico, e duas cadeias laterais contendo azotos e um anel de antraquinona planar, que é o elemento chave na intercalação do MTX no DNA da célula alvo. Os grupos laterais básicos auxiliam a ligação eletrostática com os grupos fosfato carregados negativamente do DNA (Figura 11 e 12).^{55,59,60}

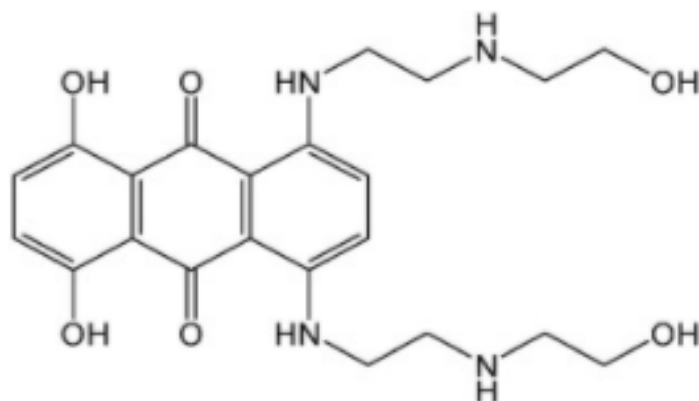


Figura 11. Estrutura química do MTX. (Referência 55)

1.4.4.1 Mecanismo de ação do MTX nas células cancerígenas

Os fármacos quimioterápicos exibem diferentes mecanismos de ação, em que a maioria atua principalmente no ciclo celular e no DNA. Embora o seu mecanismo de ação não seja muito claro, são aceitas várias teorias. Estudos anteriores revelaram que o MTX tem capacidade de penetrar as células e se concentrar no núcleo⁶¹, onde interage com os ácidos nucleicos, utilizando mecanismos biológicos para interromper o a reparação e síntese do DNA, de forma a prevenir a proliferação celular, e inibir a ação da topoisomerase II e a via mitocondrial.⁶² Entretanto a sua inespecificidade, pode causar danos tanto nas células saudáveis quanto nas cancerígenas, levando a apoptose induzida pelo MTX.⁶³

A atividade farmacológica do MTX baseia-se na capacidade deste se ligar ao DNA e inibir a sua replicação e a síntese de RNA. Este apresenta afinidade para sequências com pares de bases Guanina-Citosina (GC), sendo que esta especificidade resulta dos elementos específicos do anel da antraquinona.⁶⁴ Além disso, inibe também a ação da topoisomerase II, que é uma enzima importante na reparação do DNA danificado, resultando em quebras em cadeias simples e duplas do DNA.^{55,61}

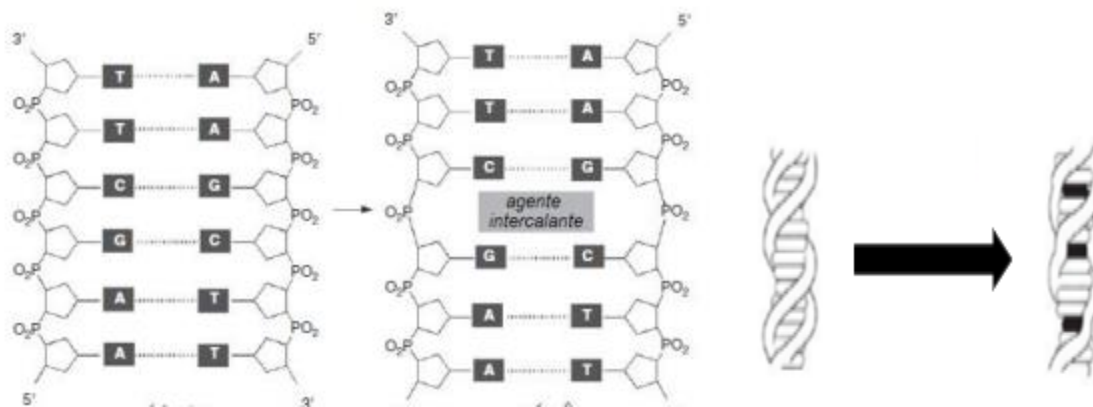


Figura 12. Representação esquemática da intercalação da molécula do MTX no DNA da célula. (Adaptado de referência ⁶¹)

Alguns estudos revelaram que além da intercalação com DNA, o MTX também pode levar a formação de aductos através de ligações covalentes DNA-fármaco, promovidas pela ativação do MTX pelo formaldeído (Figura 13).⁶¹

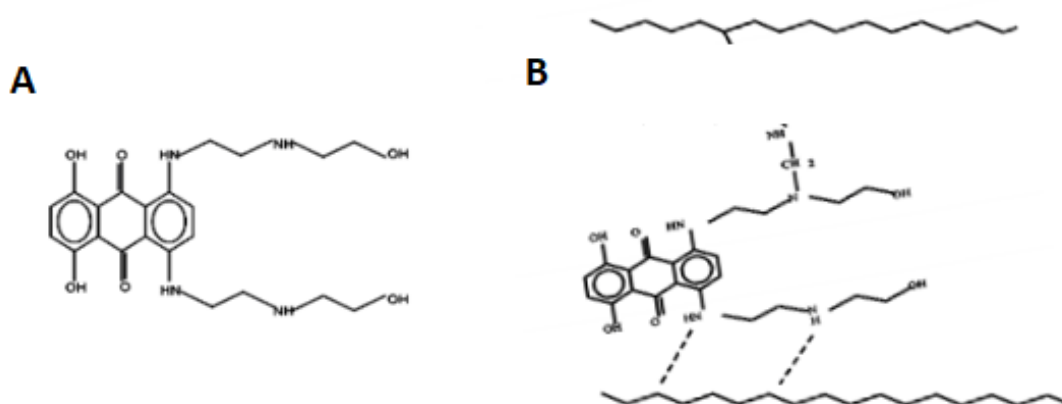


Figura 13. Representação do modelo proposto do monoaduto MTX-DNA ativado com formaldeído. (Adaptado de referência ⁶¹)

1.4.5 Derivados de laranja de acridina

A acridina e os seus derivados vêm sendo bastante estudados, devido às suas diversas propriedades, entre elas quimioterápicas. A acridina é um composto orgânico e heterocíclico de azoto, estruturalmente semelhante ao antraceno. A sua atividade quimioterápica é derivada da sua estabilidade química e biológica e a capacidade que possui em intercalar-se entre os pares de bases do DNA de cadeia dupla, causando alterações biológicas nas células neoplásicas. A sua estrutura plana e heterocíclica poliaromática (Figura 14) favorece a intercalação com as cadeias polinucleotídicas dos ácidos nucleicos, causando perturbações no ciclo celular, etapa primordial da sua atividade antitumoral.⁶⁵

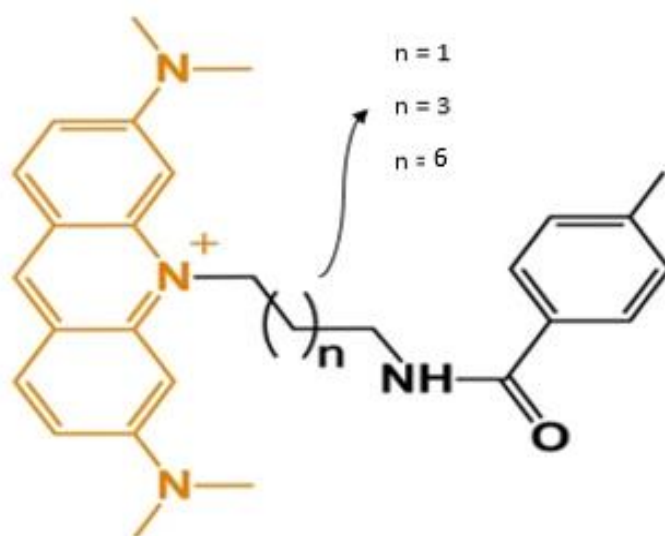


Figura 14. Esquemática da estrutura química de derivados de acridinas a título de exemplo. A laranja, a estrutura da laranja de acridina. (Adaptado de referência ⁶⁶)

Os derivados de acridina atuam nas células diminuindo a atividade de algumas enzimas consideradas cruciais durante o ciclo celular, como por exemplo a telomerase, a topoisomerase e as cinases dependentes de ciclina. Estudos anteriores mostraram que existe relação entre o tempo de ligação ao DNA e a atividade biológica dos derivados de acridina.⁶⁷

O C₈ (10- (8- (4-iodobenzamida) octil)) - 3,6-bis (dimetilamina) iodeto de acridínio (Figura 15) é um composto derivado de laranja de acridina de grande potencial na quimioterapia, em função devido ao seu potente efeito inibitório do crescimento de células cancerosas, sua fluorescência intrínseca e sua capacidade de penetração no núcleo das células cancerosas, nomeadamente na linha celular de células do cancro do colo do útero HeLa.^{68,69}

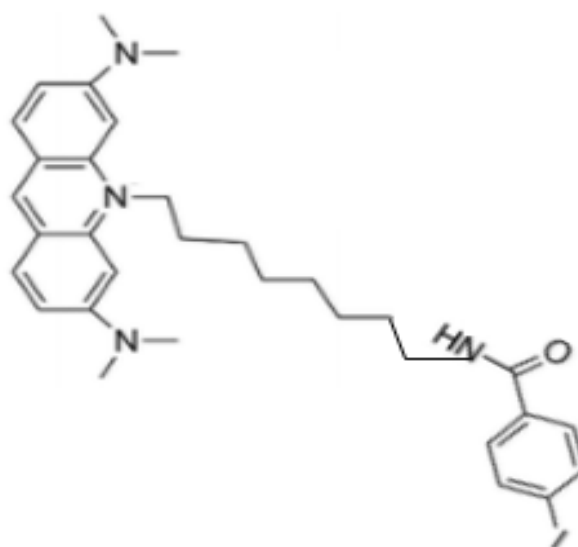


Figura 15- Estrutura química do ligando C₈. (Adaptado de referência 70).

O genoma do HPV exhibe muitas sequências ricas em G, com elevado potencial em formar G-Quadruplexes (G4's) altamente estáveis encontrados em regiões regulatórias cruciais de alguns tipos de HPV (nominalmente nos HPV's de alto risco 16, 18, 52 e 58), sendo encontrados também sequências G4 nos genótipos de baixo risco. Estas sequências são alvos de potenciais fármacos no controlo do ciclo de vida do vírus.⁷¹

Resultados anteriores sugerem que o C₈ desempenha um importante papel na encapsidação do genoma viral, embora o efeito sobre a amplificação do genoma viral seja moderado. Na maioria dos casos estudados, a atividade tumoral do C₈ mostrou-se dependente das sequências de G4.⁷¹ Carvalho e colaboradores avaliaram o C₈ como ligando da estrutura G4 do oncogene KRAS-22RT, uma vez que o gene KRAS aparece frequentemente mutado no CCU, concluindo que este ligando consegue internalizar nas células cancerosas HeLa a nível do núcleo e do nucléolo e causar citotoxicidade.⁶⁸

1.4.8 Produção e caracterização de formulações

Um dos fatores importantes a ter em consideração no desenvolvimento de um produto vaginal, para a sua eficácia é a aceitabilidade. É um fator que influencia diretamente o uso correto e constante do produto, principalmente quando há necessidade de uso prolongado. Deve-se ter em consideração o tipo de produto mais indicado, as preferências das mulheres e também o seu status socioeconómico e origens culturais.³⁹

Outra característica de grande interesse para a produção de produtos vaginais é a bioadesão. Esta é definida como a fixação de macromoléculas sintéticas e naturais a um determinado tecido biológico. Um caso específico de bioadesão é a mucoadesão, em que o tecido biológico é coberto por muco.³⁹ A análise da textura para obter a abordagem mecânica de bioadesão baseia-se na

avaliação da resistência à tração da camada interfacial formada entre a formulação e o epitélio vaginal, utilizando um texturómetro. As formulações semissólidas mucoadesivas conseguem prolongar a permanência de fármacos na cavidade vaginal através das ligações físico-químicas com a mucosa.⁴³ As propriedades bioadesivas concedem um melhor desempenho da formulação no tecido vaginal, como melhor tempo de contacto. Os mecanismos de biadesão envolvem várias etapas. As etapas de contato, hidratação, umedecimento e alastramento, são consideradas as etapas mais importantes, seguidas da etapa de consolidação, em que há a ocorrência das ligações polímero-mucina, através das forças de van der Waals, ligações de hidrogénio ou interações eletrostáticas.^{38,72} De forma a contornar as limitações apresentadas pelos produtos vaginais, vários estudos têm-se concentrado em polímeros bioadesivos e novas formas de dosagem, com o intuito de aumentar o tempo de residência, melhorar a eficácia e a segurança deste sistemas de entrega, aumentando a adesão e penetração dos fármacos na mucosa vaginal.^{43,39}

Os polímeros bioadesivos são considerados excipientes de grande utilização na produção de formas farmacêuticas principalmente em terapias locais e de libertação controlada, devido à sua versatilidade.⁷³ Geralmente são macromoléculas hidrofílicas com inúmeros grupos funcionais como carboxilas, hidroxilas, amidas ou aminas que interagem com os filamentos das glicoproteínas presentes na mucosa vaginal⁷³. Dos polímeros mucoadesivos mais comuns encontram-se os derivados do ácido poliácrico, derivados da celulose, quitosana e seus derivados, ácido hialurónico, entre outros.³⁸

Para além da bioadesão, outros parâmetros como a capacidade das formulações manterem o pH vaginal normal (capacidade de tamponamento), a osmolalidade e a viscosidade, devem ser ferramentas seletivas de modo a caracterizar as formulações com maior precisão, e projetar a sua aceitabilidade final e sua eficiência clínica:³⁹

- **pH e capacidade de tamponamento:** Um parâmetro bastante importante é o pH das formulações, que deve ser compatível com o pH do ambiente vaginal (3,5 - 4,5).³⁹ No entanto, variações do pH vaginal são bastante comuns, principalmente quando há perturbação da flora local (devido a infeções), estimulação hormonal (diminuição dos níveis de estrogénio), fase do ciclo menstrual ou durante relações sexuais (aumento do pH devido a presença do sémen), induzindo um aumento de pH, geralmente maior que 5,5.^{39,72} É relevante também avaliar a capacidade de tamponamento do pH, ou seja, a capacidade da formulação em modificar o pH vaginal. Quando as formulações são testadas num simulante de fluido vaginal (SFV), há um melhor entendimento do tamponamento do pH após a aplicação, em que são considerados dois pontos diferentes: a capacidade de tamponamento relevante (CTR) e a capacidade de tamponamento absoluta (CTA). A CTR representa a capacidade de uma formulação ultrapassar um pH de 5, superando o intervalo do pH fisiológico vaginal, e a CTA representa a capacidade de uma formulação alterar em 1 valor de pH o seu pH natural.⁷⁴

- **Osmolalidade:** Estudos anteriores demonstraram que existe uma relação entre a osmolalidade de um produto vaginal e a irritação causada na mucosa vaginal por este.⁷⁵ A osmolalidade de uma formulação deve atender aos valores recomendados pela OMS de forma a não interferir na eficácia do produto.³⁹ É definida como massa de soluto dissolvida em 1 quilograma de solvente, que tende a aumentar à medida que aumenta a concentração do soluto na solução. As formulações são consideradas iso-osmóticas para o ambiente vaginal, quando apresentem valores nas faixas de osmolalidades consideradas normais para as secreções femininas e sémen humano.³⁹
- **Viscosidade:** As propriedades reológicas de uma formulação vaginal são influenciadas pela presença de fluídos vaginais. Pouco se sabe ainda sobre os valores ideais de viscosidade de uma formulação vaginal, no entanto é desejável que o produto seja de simples aplicação e consiga espalhar-se facilmente sobre a mucosa vaginal e permanecer no canal vaginal.⁷⁶ O estudo da viscosidade é um parâmetro de muito interesse, devido ao efeito que poder ter nas características de libertação dos fármacos e no deslocamento passivo entre as superfícies epiteliais, e também devido à sua capacidade de poder determinar a dispersão, assim como o tempo de residência no trato geniturinário da mulher.³⁹ Pode variar mediante a constituição da formulação e do fluído em que for diluída.⁷⁶

As opções terapêuticas atualmente disponíveis para o HPV, objetivam o alívio da ansiedade e o controlo da doença e não a eliminação da infeção viral, não havendo ainda qualquer indicação para o tratamento de lesões assintomáticas. O tratamento farmacológico de entrega local das lesões cervicais causadas pelo HPV ainda é limitado, uma vez que a maioria dos tratamentos farmacológicos existentes não são indicados para aplicação intravaginal. Geralmente são indicados nos tratamentos de verrugas genitais, e apresentam uma taxa de recorrência considerável.

As formulações semissólidas vaginais são mencionadas frequentemente como apresentando baixa aceitabilidade pelas mulheres, muitas vezes devido a sua baixa retenção vaginal e consequente escorrimento. Apesar de já existirem diversas formulações semissólidas vaginais e com diferentes fins terapêuticos, a entrega de fármacos de administração vaginal ainda é considerado um grande desafio. O desenvolvimento de formulações vaginais demanda a necessidade de uma caracterização correta das diversas propriedades da formulação, especificamente das propriedades viscosimétricas, mucoadesivas e reológicas, tendo em consideração as condições fisiológicas. A aposta em polímeros pode ser uma tática para melhorar a eficácia dos produtos vaginais, superando os problemas de escorrimento e desconforto causados.

Assim sendo, nesta dissertação pretendeu-se desenvolver e caracterizar formulações intravaginais para a entrega de potenciais fármacos quimioterápicos com conhecida atividade

citotóxica sobre linhas celulares do cancro de colo do útero, de forma a prevenir o desenvolvimento da doença e caracterizá-las, avaliando o seu comportamento quando em contato com o trato vaginal.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho de investigação foi o desenvolvimento de formulações terapêuticas contendo óleo essencial de *T. Vulgaris* na sua composição, juntamente com os fármacos já reportados com ação anticancerígena sobre as células cancerosas do cancro de colo de útero HeLa (MTX e C₈) no tratamento de lesões causadas pelo HPV.

Para isto, também foi essencial a caracterização das formulações tendo em conta as condições fisiológicas do ambiente vaginal.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar a ação antiproliferativa do óleo essencial de *Thymus vulgaris* por meio de ensaios de MTT nas células HeLa e NHDF;
- Avaliar a ação antiproliferativa do TEO juntamente com os potenciais fármacos em estudo, sobre as células tumorais do cancro do colo do útero, com o intuito de que induzissem a apoptose destas com danos mínimos nas células saudáveis. E com isto avaliar a ação do TEO em potencializar ou não o efeito da MTX e do C₈;
- Avaliar a permeabilidade dos compostos MTX e C₈ no tecido epitelial da porca;
- Caracterizar as formulações quanto ao pH e capacidade de tamponamento, a osmolalidade, a viscosidade e a bioadesão ao tecido vaginal, mimetizando o ambiente vaginal (temperatura de 37 ° C e diluição no volume do simulante de fluido vaginal encontrado na vagina).

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Os reagentes e consumíveis necessários para o desenvolvimento deste trabalho foram: hidroxipropilmetilcelulose K100 (DOW, Chemical Company); propilenoglicol (Acofarma®); ácido sórbico/ sorbato de potássio (Acofarma®); Tween 80 (Fisher®); 10- (8- (4-iodobenzamida) octil) -3,6-bis (dimetilamina) iodeto de acridínio (C₈) sintetizado como previamente descrito⁶⁸; mitoxantrona (Chemical Industry, Tóquio); óleo essencial de *Thymus Vulgaris* (adquirido comercialmente); brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-1)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) (Acros Organics); mucina gástrica tipo 2 (Sigma, Alemanha); tecido vaginal da porca (adquiridos do matadouro); solução fisiológica (NaCl 0.9%) (Liofilchem®, Itália).

3.2 Preparação das formulações vaginais

Os excipientes utilizados na produção da formulação base são GRAS (Generally Recognized as Safe, FDA), de grau farmacopéico (cumprimento das especificações da farmacopeia Europeia 9.0 ou Farmacopeia Portuguesa 9.0) e têm evidencia de utilização em produtos vaginais comercializados no espaço europeu.

Excipientes da formulação base (% m/m): hidroxipropilmetilcelulose K100; propilenoglicol; ácido sórbico/ sorbato de potássio; água Milli Q; NaOH (10M) qbp ajustar o pH.

Tabela 4. Função dos excipientes e matérias-primas usados.

Excipientes	Função
Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) k100	Polímero
Propilienoglicol	Umectante / Promotor da permeação
Ácido sórbico / sorbato de potássio	Conservante
Água Milli Q	Meio de dispersão
NaOH 10 M	Ajustar pH

3.2.1 Preparação da formulação base

O método utilizado para a preparação das formulações baseou-se nos seguintes passos:

1. Dissolver o sorbato de potássio/ácido sórbico em 10g de água.
2. Dispersar o polímero na água restante, sob agitação mecânica (agitador em hélice Heidolph) adicionando a pouco e pouco o pó à água fria.

3. Adicionar o propilenoglicol sob agitação.
4. Centrifugação do gel, p.e. 3000 rpm for 5 min, a 4°C.

3.1.2 Preparação da formulação com óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)

A aplicação TEO em formulação é limitada devido sua baixa solubilidade⁴⁶. O polisorbato 80 (Tween ® 80) é um surfactante e emulsificante usado frequentemente na formulação de produtos com fins terapêuticos.

Inicialmente procedeu-se à obtenção da emulsão do TEO (1%) no Tween 80 (1%), evitando que houvesse precipitação do TEO, quando misturado com os outros excipientes da formulação. Posteriormente realizaram-se os seguintes passos:

1. Dissolver o sorbato de potássio/ácido sórbico em 10g de água.
2. Dispersar o polímero na água restante, sob agitação mecânica (agitador em hélice Heidolph) adicionando a pouco e pouco o pó à água fria.
3. Adicionar o propilenoglicol sob agitação.
4. Adicionar a mistura do TEO (de modo a ficar a uma concentração de 1%) lentamente e sob agitação forte, evitando que o TEO se precipite.
5. Centrifugação do gel, p.e. 3000 rpm for 5 min, a 4°C.

3.2.3 Preparação das formulações com o Mitoxantrona (MTX)

Para a preparação das formulações com MTX, preparou-se uma solução em água milli Q, a uma concentração inicial de 4950 µM.

Adicionou-se o MTX à formulação base, de modo a ficar à concentração de 50 µM e centrifugou-se a 3000 rpm, durante 5min.

Para preparação da formulação do TEO adicionou-se o MTX à formulação com tomilho, de modo a ficar à concentração de 50 µM e centrifugou-se a 3000 rpm, durante 5min.

3.2.4 Preparação das formulações com o C₈

Para preparação da formulação base com o C₈, adicionou-se o C₈ na concentração de 50 µM à formulação base e centrifugou-se a 3000 rpm, durante 5min.

Para preparação da formulação de TEO com o C₈, adicionou-se o C₈ na concentração de 50 µM à formulação base e centrifugou-se a 3000 rpm, durante 5min.

3.2.5 Preparação da formulação com Tween 80

Foi preparado uma formulação com o tween 80, de modo a verificar se o mesmo teria algum efeito citotóxico nas linhas celulares.

Para a preparação da formulação com o tween, fez-se o mesmo procedimento, adicionando o tween 80 à formulação base, de modo a ficar a 1% e posteriormente centrifugou-se a 3000 rpm por 5 min.

3.3 Preparação dos simulantes de fluido vaginal

O simulante de fluido vaginal (SFV) foi preparado conforme descrito por Owen e Katz em 1999⁷⁷, onde foram utilizados os seguintes reagentes: 3,51 g de cloreto de sódio, 1,40 g de hidróxido de potássio, 0,22 g de hidróxido de cálcio, 0,018 g de albumina sérica bovina, 0,40 g de ureia, 5,00 g de glucose, 2,00 g de ácido láctico, 1,00 g de ácido acético glacial, 0,16 g de glicerol, adicionados em 1L de água ultra-pura e agitou-se a solução vigorosamente até à dissolução total e completa homogeneização.

Para a preparação do fluido vaginal modificado (SFVm), adicionou-se ao SFV conforme descrito por Katz, a mucina gástrica suína tipo II numa concentração de 1,5% (m/m), perfazendo um volume final de 50mL (0,75 g de mucina + 49,25 g de SFV).

3.4 Avaliação das formulações no meio de cultura

As formulações foram diluídas para concentrações de 30%, 10%, 20%, 5%, 1%, 0,4%, 0,2%, 0,1% (m/v) em 1 mL de meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de antibiótico, contendo 0,5 % de DMSO para garantir a solubilidade adequada das formulações. As formulações foram deixadas em contacto com o meio durante 48 horas.

3.5 Caracterização tecnológica das formulações

Como descrito na literatura, a quantidade de fluido vaginal presente na vagina é de aproximadamente 6 g / dia, apresentando um volume variável de 0,5 à 1 mL na vagina.^{78,38} Os produtos vaginais atuais tendem a ser aplicados em volumes entre 1 a 5 g. Maiores volumes vem sendo cada vez mais relacionados com os problemas de vazamento e desconforto causados nas mulheres.^{78,39}

As formulações foram caracterizadas nos seguintes parâmetros: pH capacidade de tamponamento, viscosimetria, osmolalidade e bioadesão. Foram feitas as determinações diretamente das formulações e em diluições fisiológicas, em que diluiu-se 1,5 g de cada formulação em 0,75 mL de SFV, e a temperatura fisiológica vaginal (37°C) para a determinação da viscosidade e osmolalidade. Esse procedimento foi realizado a fim de avaliar a viscosidade e osmolalidade do produto quando em contato com o fluido vaginal.

3.5.1 pH e Capacidade de tamponamento

O pH das formulações foi medido à temperatura ambiente, imergindo diretamente um eletrodo de pH nas amostras. A sua capacidade de tampão de pH foi avaliada por titulação com ácido-base realizada à temperatura ambiente em dispersões em solução salina NaCl 0.9% e SFV. Diluiu-se 1 g de formulação em 10 mL de NaCl e sob agitação constante. A capacidade de tampão com NaCl simples foi utilizado como controlo. Por as formulações apresentarem um valor de pH > 5, após a dispersão em NaCl, foi analisado a capacidade de tampão reverso, onde adicionou-se em incrementos de 20 µL, ácido clorídrico (HCl 1M) à dispersão com NaCl, registrando cada adição após estabilização, até atingir um valor de pH < 3. De forma a clarificar a capacidade de tamponamento das formulações no ambiente vaginal, fez-se o mesmo procedimento usando o SFV como meio de dispersão, onde diluiu-se 1 g de formulação em 10 mL de SFV. Para esta dispersão, adicionou-se incrementos de 20 µL de hidróxido de sódio (NaOH 1M), até obter um pH > 9.

Utilizou-se os resultados das titulações, para determinar a capacidade de tampão relevante, que como já definida no capítulo 1 é a quantidade de NaOH preciso para atingir um valor de pH 5 da dispersão (NaCl ou SFV) e a capacidade de tamponamento absoluta definida como a quantidade de NaOH necessária para aumentar em uma unidade, o valor de pH.^{39,74}

3.5.2 Análise viscosimétrica

A determinação da viscosidade foi realizada utilizando um reómetro de placa cônica (Brookfield DV-3T, Brookfield, EUA). As medições foram realizadas nas formulações simples e após diluição em SFV, à temperatura fisiológica vaginal (37 ° C). Os cones usados foram o CPA-52Z e o CPA-40Z (Brookfield, EUA), onde se colocou 500 µL de amostra. Os testes foram realizados em triplicado, e deixados em repouso por 1 min entre as medições, com velocidades entre 5 e 250 RPM de forma a obter um torque aceitável (torque de 10-100%)³⁹. A diluição das formulações foi realizada conforme descrito na secção 5.6.

3.5.3 Determinação da osmolalidade

A osmolalidade foi determinada usando um osmómetro *freezing point* (Osmomat 3000, Gonotec, Alemanha) com alíquotas de 50 µL das formulações simples e diluídas no SFV (conforme descrito na secção 5.6) e as medições foram realizadas em triplicado. Inicialmente utilizaram-se três padrões de referência para calibração do equipamento que foram água destilada (ponto zero), NaCl 300 mOsm/ Kg e NaCl 850 mOsm/Kg disponíveis comercialmente pelo fabricante do equipamento.

3.5.4 Determinação da bioadesão

A adesão das formulações ao tecido vaginal da porca foi avaliada usando um texturómetro (TAXT Plus, Stable Micro Systems, Reino Unido), em que o método consistiu na avaliação da resistência à tração da camada interfacial formada entre a formulação e o epitélio vaginal³⁹. Para a determinação deste parâmetro utilizou-se uma sonda cilíndrica com diâmetro de 10 mm. As determinações foram realizadas à temperatura de 37 ± 1 ° C num forno para mimetizar a temperatura corporal. As amostras do tecido epitelial foram fixadas com o aparelho de mucoadesão, colocado na base do equipamento. O tecido foi hidratado com 50 µL de VFSm, supondo que a mucina é a proteína responsável pela bioadesão. Utilizou-se uma fita adesiva dupla-face para prender um pequeno pedaço de membrana de acetato de celulose à sonda, onde pesou-se diretamente 30 mg de formulação. A membrana de celulose presa na sonda sem formulação foi usada como controlo. O software foi usado no modo adesivo conforme as condições descritas por Machado et. al (Tabela 5)³⁹, ligado ao texturómetro. A força de desprendimento foi registrada, assim como a área gráfica negativa, representativa do trabalho de adesão (N.mm) necessária para desprender as duas superfícies.

Tabela 5. Condições do método utilizado para análise texturométrica.³⁹

Velocidade de pré-teste	0.5 mm/s
Velocidade de teste	0.1 mm/s
Velocidade de pós-teste	0.1 mm/s
Força de gatilho (<i>trigger force</i>)	0.02942N
Tempo de contato	180s
Força aplicada	2.5 N

3.6 Ensaios *in vitro* e *ex vivo*

3.6.1 Cultura de células

Para a realização deste trabalho utilizaram-se duas linhagens celulares, células de cancro cervical humano (HeLa) e fibroblastos dérmicos humanos normais (NHDF). As células HeLa foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina) e as células NHDF foram cultivadas em meio RPMI, suplementado com 10% de FBS, 1% antibiótico (penicilina e estreptomicina), 0,01 M de HEPES, 0,02 M de L-glutamina e 0,001 M de piruvato de sódio. As culturas foram mantidas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

3.6.2 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo o ensaio colorimétrico do reagente brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-1)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), onde através deste, é possível medir a quantidade de células viáveis após incubação com compostos eventualmente tóxicos.⁷⁹

As células metabolicamente ativas (células viáveis), convertem o MTT que apresenta coloração amarela em numa substância de cor roxa, o formazano. Quanto maior for a intensidade da coloração roxa, maior a viabilidade celular. Compreende-se que a quantidade de formazano produzida é dependente da atividade metabólica da célula, em que a produção de formazano é diretamente proporcional ao número de células viáveis existentes por poço ⁷⁹.

As formulações foram diluídas para concentrações de 10%, 5%, 1%, 0,4%, 0,2%, 0,1% (m/ v) em 1 mL de meio DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de antibiótico, contendo 0,5 % de DMSO para garantir a solubilidade adequada das formulações.

Tabela 6. Concentrações das formulações testadas nas HeLa e nos NHDF.

HeLa / NHDF						
Formulações	Concentrações					
Formulação base	10%	5%	1%	0,4%	0,2%	0,1%
Tomilho 1%	10%	5%	1%	0,4%	0,2%	0,1%
F. Base + MTX	10%	5%	1%	0,4%	0,2%	0,1%
T1% + MTX	10%	5%	1%	0,4%	0,2%	0,1%
F. Base + C ₈	10%	5%	1%	0,4%	0,2%	0,1%
T1% + C ₈	10%	5%	1%	0,4%	0,2%	0,1%
F. Base + Tween®80	10%	5%	1%	0,4%	0,2%	0,1%

F.Base= Formulação Base; T1%= Formulação base com tomilho à 1%.

Para o ensaio de viabilidade celular, as células após confluentes foram semeadas em placas de 96 poços, com uma densidade celular de 1×10^4 células/ mL com os respectivos meios completos de cultura, HeLa (DMEM) e NHDF (RPMI). Após 24 h de incubação, retirou-se o meio de cultura e as células foram incubadas novamente com 100 μ L de cada concentração das formulações, com um n=3, por mais 24h. Foram utilizados 2 controlos, poços contendo células não tratadas (apenas meio de cultura ao longo do ensaio) e outro utilizando DMSO como controlo de veículo. Posteriormente, retirou-se o meio de cada poço e adicionou-se uma solução do reagente MTT a 5 mg / mL à diluição de 1:5 (MTT dissolvido em 20% de PBS e 80% de meio DMEM e RPMI sem suplementação, para as HeLa e os NHDF, respectivamente). Incubaram-se as células HeLa durante 45 min e 1h15 min para as NHDF até se formarem os cristais de formazano. Posteriormente, a solução foi aspirada e os cristais formados dissolvidos em 100 μ L de DMSO. Por fim as absorvâncias foram registradas no leitor de micro-placas Bio-Rad xMark™ a 570 nm e os resultados tratados com recurso ao Microsoft Office Excel e GraphPad Prism 6 (Graph Pad, EUA).

Os valores de viabilidade celular foram determinados como média \pm erro padrão de pelo menos três experimentos diferentes, usando os poços sem formulação como controlo.

3.6.3 Permeação das formulações no tecido vaginal (*ex vivo*)

O ensaio de permeação foi realizado utilizando uma câmara de ussing. A câmara de ussing é um método que mimetiza as condições *in vivo* da taxa de absorção de fármacos, recomendado pela *Food and Drugs Administration* (FDA).

Foram realizados cortes no tecido epitelial vaginal de porca de forma a se encaixarem nas câmaras de ussing, com a mucosa virada para câmara dadora. Adicionou-se 1,8 mL (com ajuda de uma seringa) na câmara recetora. Nas câmaras dadoras adicionou-se 200 μ L de SFV em todas as células, de modo a equilibrar a membrana. Deixou-se estabilizar por 20 min e substituiu-se o SFV de todas as células, exceto do controlo, por 300 mg das seguintes formulações : T1% , T1% + C₈ (50 μ M), T1% + MTX (50 μ M) e a formulação base.

As amostras (100 μ L) da câmara receptora de cada formulação foram recolhidas nos seguintes tempos: 0 (momento zero), 5, 20 30, 25 30 e 56 h após serem colocadas as formulações. Ao fim das 56 hs também se recolheu as amostras das câmaras dadoras e o tecido epitelial e reservou-se para posterior análise pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Tabela 7. Recolha das amostras de cada célula durante o ensaio.

	Amostras	Célula 1	Célula 2	Célula 3	Célula 4	Célula 5
		Controlo (VFS)	Tomilho 1%	T1% + C8	T1%+ MTX	F.Base
C. R.	1	0 h	0 h	0 h	0 h	0 h
	2	5 h	5 h	5 h	5 h	5 h
	3	20h30	20h30	20h30	20h30	20h30
	4	25h30	25h30	25h30	25h30	25h30
	5	56h	56h	56h	56h	56h
C. D.	1	56 h	56 h	56 h	56 h	56 h
Tecido	1	56 h	56 h	56 h	56 h	56 h

3.6.3.1 Determinação da concentração dos compostos pela cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Para determinação da concentração dos compostos foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) de 1290 acoplada a um detector de fluorescência de 1260 (FLD) da Agilent Technologies (Soquimica, Lisboa, Portugal). A separação dos analitos foi obtida utilizando-se uma coluna anacrática YMC-Triart PFP (5 μ m, 4,6 i.d. \times 150 mm) acoplado a um titular guard-c (4 \times 10 mm) e uma Triart PFP (5 μ m, 3 \times 10 mm) pré-coluna, fornecida pela Solítica, Lisboa, Portugal. A fase móvel foi constituída por metanol e ácido trifluoroacético a 0,1% (9:1; v/v) a uma razão de 0,5mL/min no modo isocrático. O volume de injeção foi de 50 μ L. As temperaturas da coluna e do autosampler foram fixadas em 25 e 4 $^{\circ}$ C, respectivamente, e os analitos foram detectados em 498 e 530 nm como comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente. Os tempos de retenção foram 2,4 minutos para mitoxantrona (MTX) e 9,3 minutos para C₈. O método foi validado de acordo com os princípios norteadores da *Food and Drug Administration* para a análise de medicamentos e biológicos.⁸⁰ As curvas de calibração foram estabelecidas entre 0,20 e 100 μ g/mL para MTX e 1 e 500 μ g/mL para C₈. Os limites de detecção e quantificação foram considerados os mesmos que os limites de quantificação, 0,20 e 1 μ g/mL para MTX e C₈, respectivamente. A Figura 16 descreve um cromatograma de MTX a 0,20 μ g/mL (A) e descreve um cromatograma de C₈ a 1 μ g/mL (B).

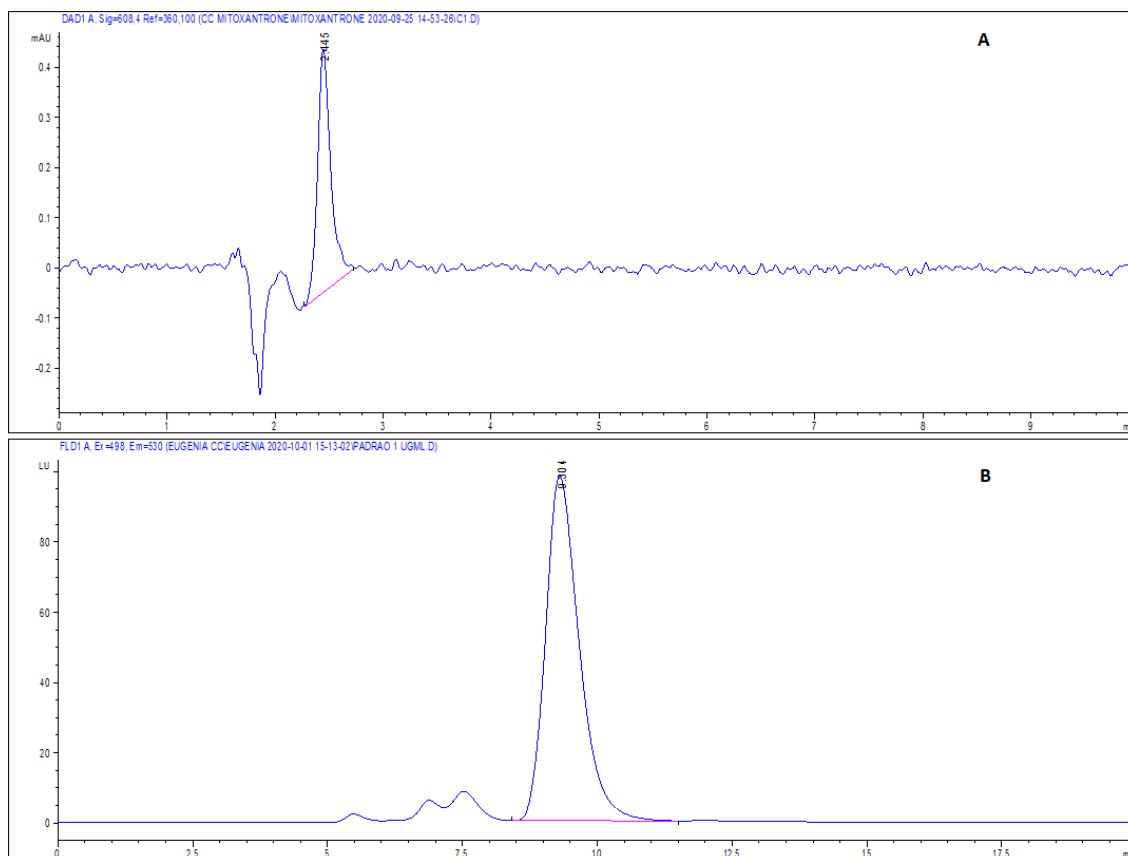


Figura 16. Exemplo do gráfico do cromatograma de MTX a 0,20 µg/mL (A) e do cromatograma de Cs a 1 µg/mL (B).

3.7 Análise estatística

A análise dos resultados foi feita através do MicrosoftOffice Excel, onde se calculou as médias aritméticas e os desvios-padrão dos resultados obtidos. As determinações dos parâmetros de viscosidade e osmolalidade foram realizadas em triplicado (n=3). Analisou-se os resultados obtidos através do software GraphPad Prism 6 (Graph Pad, EUA) e as diferenças significativas dos resultados.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1 Avaliação da estabilidade das formulações em meio de cultura

Primeiramente, as formulações (F.Base, T1%, FB + C₈, FB + MTX, T1% + C₈, T1% + MTX e Fbase + tween) usadas como teste, foram diluídas às concentrações de 30, 20, 10, 5, 1, 0,4, 0,2 e 0,1% em meio de cultura de forma a assegurar a solubilidade adequada das mesmas para os ensaios *in vitro* subsequentes. Adicionou-se 0,5% (m / v) de DMSO, a todas as concentrações das formulações de forma a melhorar a solubilidade das formulações.

Como observado na Figura 17 todas as sete formulações dissolveram-se por completo no meio, nas concentrações de 10, 5, 1, 0,4 e 0,1%; entretanto para as concentrações de 20 e 30%, não observou-se o mesmo resultado. A formulação base, F.base + C₈, F.Base + MTX e F.Base + Tween, às concentrações (20 e 30%) apresentaram-se bastante turvas e viscosas e as formulações contendo tomilho (T1%, T1% + C₈ e T1% + MTX), para além de apresentarem-se turvas, não dissolveram por completo no meio de cultura. Conforme descrito na literatura, o uso do TEO em formulações é limitado, isso devido sua baixa solubilidade.⁴⁶ As formulações contendo TEO foram desenvolvidas adicionando-se o polisorbato 80 (Tween 80) à 1% (m / v), um surfactante e emulsificante frequentemente empregue em formulações de fins terapêuticos, de forma a aumentar a solubilidade do mesmo, e evitar que houvesse precipitação do TEO quando misturado com os demais excipientes das formulações.⁸¹

No entanto, de acordo com os resultados obtidos, às concentrações de 20 e 30% mesmo com a incorporação do Tween 80, as formulações de tomilho não se dissolveram por completo.

Assim sendo, as concentrações (20 e 30%) foram consideradas inviáveis para realização dos ensaios subsequentes *in vitro* uma vez que, por apresentarem-se bastante turvas e insolúveis, poderiam dificultar a troca de nutrientes entre as células e apresentarem-se citotóxicas por si só, interferindo deste modo nos resultados posteriores.

A avaliação das formulações em meio de cultura às diferentes concentrações foi importante pois através desta foi possível avaliar e assegurar as concentrações adequadas para a solubilização completa das formulações em estudo de modo a evitar eventuais interferências nos resultados do ensaios à realizarem-se.

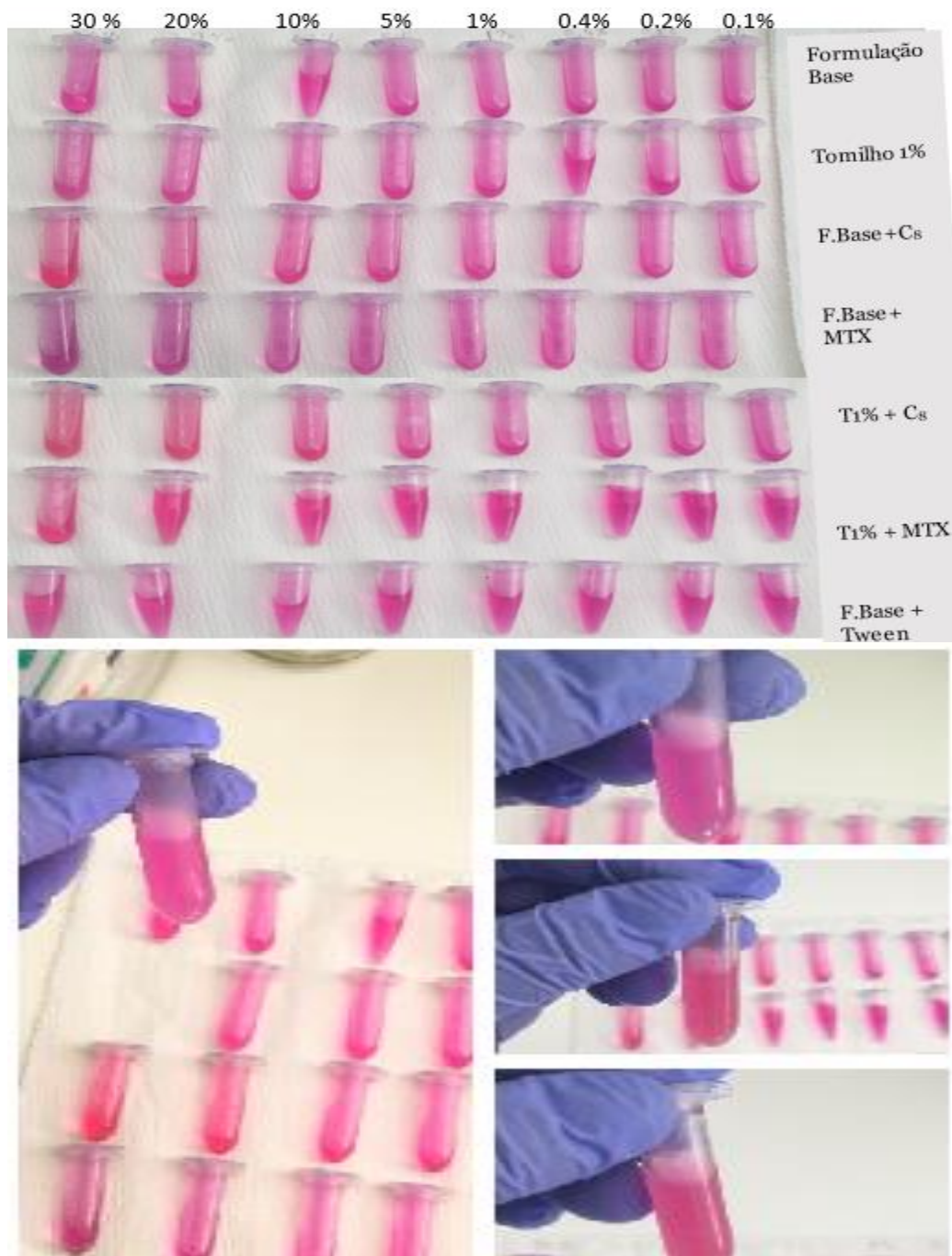


Figura 17. Resultado da análise da viscosidade e solubilidade das formulações em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de antibiótico, contendo 0,5 % de DMSO, após deixadas em contacto com o meio por 48 horas.

4.2 Caracterização das formulações

4.2.1 pH e capacidade de tamponamento

O pH vaginal é ácido, e geralmente apresenta um pH de 3,5 a 4,5, podendo variar com alterações hormonais, infecções e fases do ciclo menstrual.³⁹ O pH de uma formulação vaginal é um parâmetro importante e a sua capacidade de tamponamento de pH, ou seja a capacidade de manter o pH fisiológico vaginal após aplicação da formulação é importante avaliar. A manutenção do pH ácido promove a fisiologia e microbiota vaginais normais e contribui para uma resposta imunológica eficaz.⁷⁴ A determinação da capacidade de tamponamento de pH, quando realizada em dispersão num SFV, mimetiza as condições reais *in vivo* após a administração da formulação na vagina. Produtos vaginais devem apresentar compatibilidade com o pH vaginal e idealmente conseguir mantê-lo ou ajudar a restabelece-lo.

Como mostrado na Tabela 8 embora as formulações tenham sido desenvolvidas com um pH inicial maior que 5, quando em contato com o SFV o pH diminuiu para aproximadamente 4,5 ficando em conformidade com pH vaginal fisiológico, possivelmente diminuindo quaisquer efeitos indesejáveis.

Como já descrito anteriormente, o aumento do pH vaginal (pH > 5) está associado ao favorecimento de infecções vaginais^{39,74}, e pH mais baixos (pH < 3) ainda são pouco compreendidos. No entanto resultados experimentais em animais sugerem que produtos vaginais de valores de pH < 3 sejam menos aceitáveis para uso humano.⁸² Há poucos relatórios na literatura sobre as alterações de pH vaginal decorrentes de infecções causadas pelo HPV, e das NIC.¹¹

Tabela 8. Estudos de pH e titulação ácido-base, realizados em dispersão com solução salina normal (NaCl 0,9%) e no simulante de fluido vaginal. Estão representados as médias e os desvios padrão, n=2.

Formulações	pH inicial	pH após diluição em NaCl 0,9%	Volume de HCL 1M, pH < 3	pH após diluição em SFV	Volume de NaOH, pH > 5
Formulação base	5,5	7,54 ± 0,00	40 µL	4,52 ± 0,01	180 µL
Tomilho 1%	5,46	6,89 ± 0,01	60 µL	4,49 ± 0,02	180 µL
F.Base + Cs	5,5	7,62 ± 0,01	40 µL	4,51 ± 0,01	180 µL
F.Base+MTX	5,56	7,48 ± 0,02	40 µL	4,52 ± 0,01	180 µL
T1%+ Cs	5,49	6,31 ± 0,02	60 µL	4,41 ± 0,01	160 µL
T1%+MTX	5,4	6,64 ± 0,01	60 µL	4,48 ± 0,00	160 µL
Tween 80	5,5	7,03 ± 0,01	40 µL	4,52 ± 0,01	180 µL

Como demonstrado na Figura 18 todas as formulações apresentaram maior capacidade de tamponamento após diluídos no SFV do que na solução salina normal, em conformidade com

resultados já publicados anteriormente.^{39,74} Para a avaliação da capacidade de tamponamento de pH das formulações foram considerados dois parâmetros: a capacidade de tamponamento relativa representado a preto e a capacidade de tamponamento absoluta representado a cinza. Após dispersão em solução salina, as formulações apresentaram pH > 5, sendo por isso titulados com HCl 1M e na dispersão no SFV por apresentarem pH inferior a 5 foram titulados com NaOH 1M.

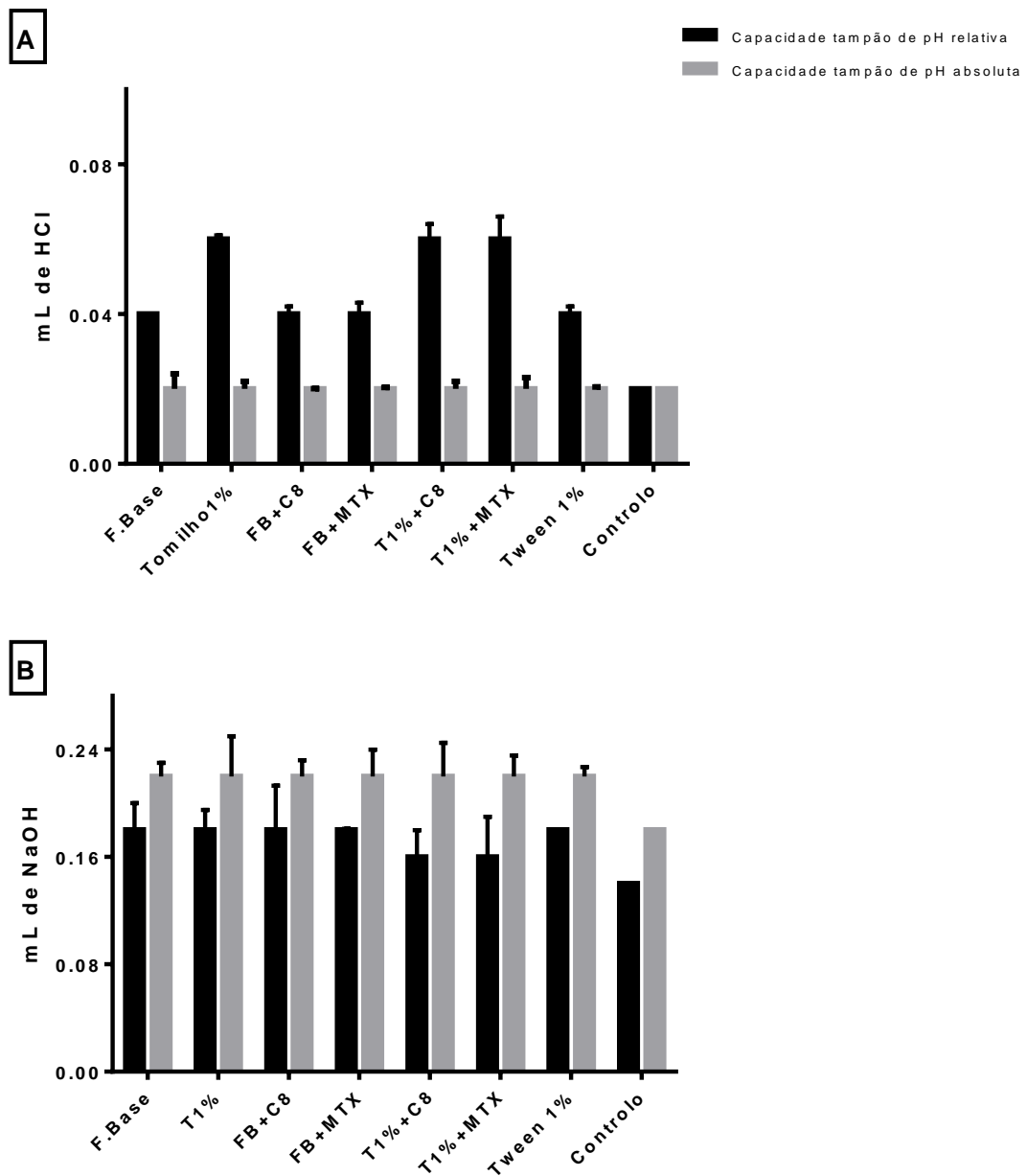


Figura 18. Capacidade de tamponamento das formulações com dispersão em NaCl 0,9% (A) e em SFV (B). Na dispersão com NaCl a titulação foi feita usando HCl dado que todas as formulações apresentaram pH >5 e com SFV utilizou-se NaOH uma vez que o pH foi menor que 5.

No ensaio com solução salina e SFV, a capacidade de tamponamento absoluta das formulações não foi diferente dos controlos (solução salina simples e SFV), apresentando um aumento significativo da capacidade de tamponamento relativa no ensaio com solução salina.

Apesar das formulações apresentarem pH acima do limite fisiológico, as formulações apresentaram baixa capacidade em manter o pH quando em contato com o SFV revelando que podem facilmente atingir o intervalo normal de pH fisiológico vaginal.

Nas figuras 19 e 20 estão representadas as curvas obtidas para o ensaio de pH e capacidade de tampão em NaCl a 0,9% de pH 7 e em SFV de pH 4,4, respectivamente.

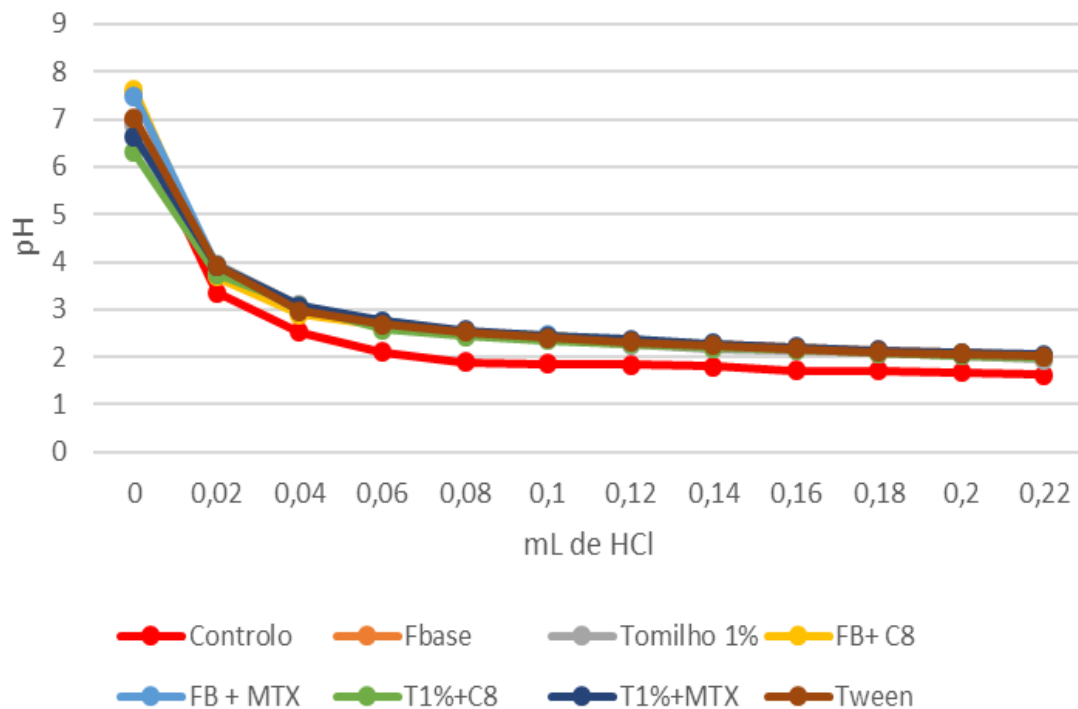


Figura 19. Variação do pH das formulações dispersas em NaCl 0,9 % com adição de NaOH.

Com base nos gráficos apresentados, conclui-se que todas as formulações com dispersão em solução salina apresentam melhor capacidade de tamponamento do que o controlo. No entanto foi necessário apenas 0,040 mL de HCl, em todas as formulações, para que o pH atingisse um pH menor que 3, revelando deste modo baixa capacidade de tamponamento.

Ainda de acordo com os resultados, todas as formulações aumentaram a capacidade de tamponamento do SFV (Figura 22), anteriormente descrito como tendo baixa capacidade de tamponamento^{77:74} o que pode indicar um efeito positivo na manutenção do pH vaginal.

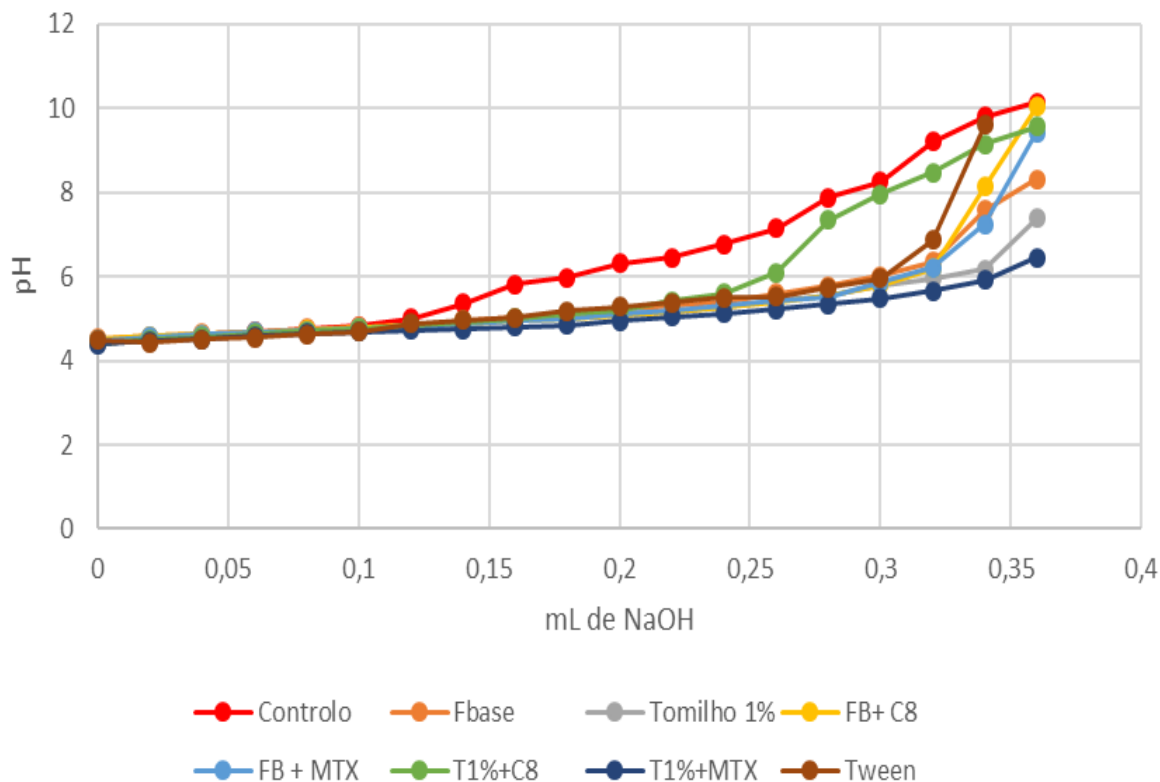


Figura 20. Variação do pH das formulações dispersas no SFV com adição de NaOH.

Na dispersão em SFV, é bastante visível o aumento da capacidade de tamponamento das formulações em comparação ao controlo (SFV). Foi necessária a adição do volume de 0,18 mL de NaOH para as formulações F.Base, T1%, F.base + C₈ e F.Base + MTX e 0,16 mL para T1% + C₈ e T1% + MTX atingirem um valor de pH maior que 5. Ainda de acordo com o gráfico das formulações em dispersão no SFV, a formulação de T1% + MTX demonstrou apresentar maior capacidade de tamponamento, o que sugere que esta formulação se adequa ao resultado final pretendido.

4.2.2 Análise Viscosimétrica

O estudo das propriedades reológicas de formulações vaginais como sistemas de entrega de fármacos é de elevada importância pois permite compreender a sua eficácia terapêutica e a qualidade do produto a desenvolver. O objetivo da avaliação destas propriedades é a previsão de como se irá comportar *in vivo* e avaliar a sua distribuição e tempo de retenção no trato geniturinário. A avaliação das propriedades reológicas de uma formulação vaginal ainda é considerado um grande desafio uma vez que são influenciadas pela presença de fluidos (vaginais, muco cervicais, sémen) e da ação auto-limpante da vagina, limitando a retenção dos produtos na vagina.³⁹

O estudo das propriedades viscosimétricas é necessário durante o desenvolvimento de uma formulação, devido ao efeito que esta pode ter na libertação do fármaco e no deslocamento passivo entre as superfícies epiteliais, assim como a capacidade de determinar dispersão e o tempo de residência no trato geniturinário da mulher.⁷⁸ Pouco se tem descrito na literatura sobre valores ideais de viscosidade de formulações vaginais, tendo em conta que os géis sempre apresentam comportamento não newtoniano, e uma única medição da viscosidade a uma taxa de cisalhamento definida, não sejam suficientes para caracterizar a formulação distintamente, sendo necessário uma medição em vários pontos.⁴² No entanto é desejável que qualquer formulação seja de fácil espalhamento sobre o tecido vaginal e consiga permanecer no canal vaginal.

Além do estudo das propriedades reológicas da formulação em si, é indispensável incluir estudos considerando as diluições em fluídos possíveis de serem encontrados na vagina, o que pode variar mediante a constituição da formulação, dado que constituintes diferentes podem levar a comportamentos reológicos diferentes e do fluído na solução diluída.⁴²

Neste trabalho avaliou-se a viscosidade das sete formulações na sua forma original, e após a diluição fisiológica no SFV tendo em conta a temperatura vaginal, 37 °C.

Os resultados da análise viscosimétrica (Figura 21) foi representado pelo *shear stress*, em Pascal (Pa) das duas determinações, direta e após diluição fisiológica em SFV.

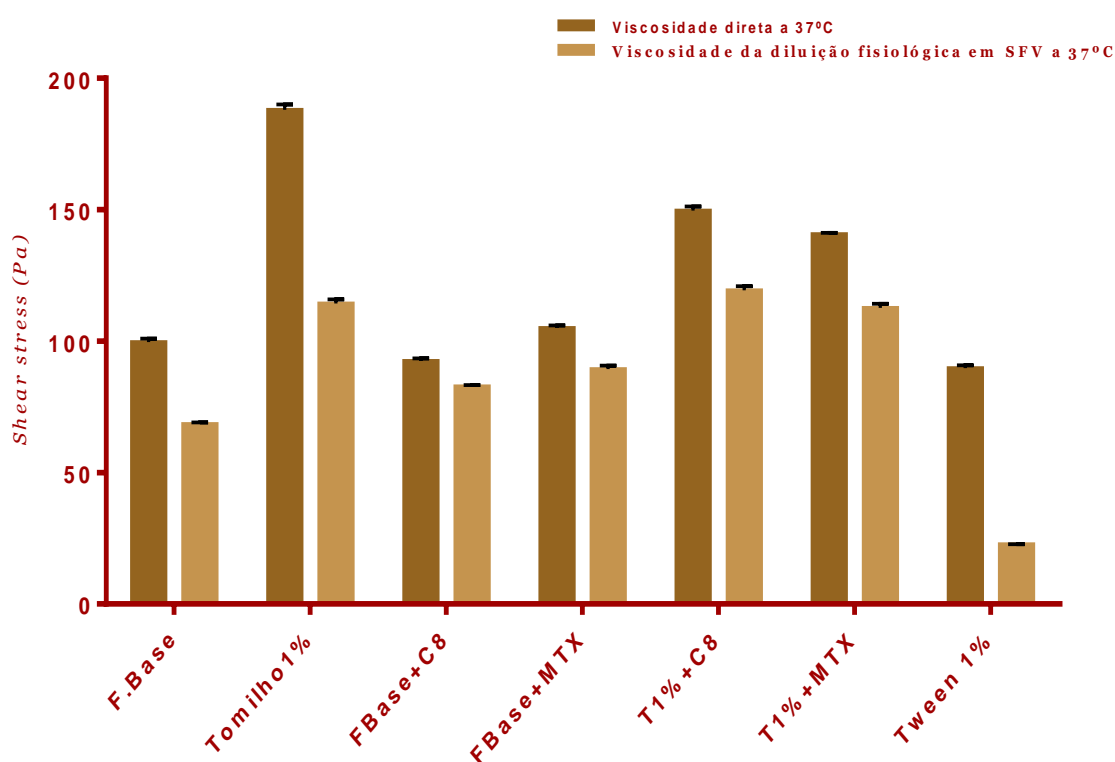


Figura 21. Resultados da análise viscosimétrica das medições direta e após diluição com o SFV, a 37 °C. Os resultados da viscosidade expressos como taxa de cisalhamento correspondem a média e ao desvio-padrão, de 3 determinações (n=3).

Todas as formulações apresentaram valores de viscosidade relativamente elevados, principalmente as formulações a base de tomilho, sendo esta adequada para aplicação vaginal, face ao problema de escorrência e desconforto apresentados pelos produtos vaginais comerciais. Um estudo realizado por Wang, Y *et* Lee, CH⁸³, demonstrou que o uso de HPMC a concentração de 1,5% aumenta eficazmente a viscosidade de formulações vaginais.

As formulações contendo tomilho são mais viscosas comparativamente às demais formulações, provavelmente pelo fato de conterem Tween 80 na sua composição, uma vez que formulações com emulsões Tween 80 tendem a aumentar a viscosidade das formulações.⁸⁴ No entanto a viscosidade das formulações T1%+C₈ e T1% + MTX, foi menor do que da formulação de T1% devido aos compostos serem dissolvidos no DMSO e água. De um modo geral, as formulações à base de tomilho apresentaram-se mais viscosas, e conseqüentemente foi preciso tensões maiores de cisalhamento para obtenção de um torque aceitável.³⁹

Estes resultados também indicaram que a viscosidade de todas as formulações foi ligeiramente menor após diluição fisiológica no SFV à temperatura corporal. O mesmo foi observado por Machado e colaboradores, ao avaliarem as propriedades viscosimétricas de formulações vaginais comerciais, como Gino-Canesten e Sertopic. De acordo com o mesmo estudo, após diluídos no SFV, as viscosidades foram notavelmente menores quando comparadas as formulações simples, não sendo proporcional e nem semelhante a variação entre as formulações, pois cada uma apresentava um comportamento singular devido à sua composição.³⁹ Esse comportamento já era esperado dado que as diluições foram feitas a uma proporção de 1:2 no SFV e este apresenta-se menos viscoso que as formulações em si, alterando deste modo a viscosidade das formulações.

Owen e colaboradores⁸⁵ estudaram o efeito da temperatura e do pH em formulações de gel contraceptivas a base de poliacrilatos e a base de celulose, onde usaram um SFV a pH 4,2 e um simulante de sémen a pH 7,7 às temperaturas de 25 °C e de 37 °C. Observaram que os géis à base de poliacrilato responderam de forma diferente às diluições, concluindo que as propriedades reológicas eram fortemente dependentes do tipo de diluente usado. Observaram nestes géis as diluições realizadas no simulante de sémen aumentavam as viscosidades dos géis enquanto que nas diluições no SFV o efeito era contrário, atribuindo esse efeito às variações de pH. Já os géis a base de celulose não se observou este efeito, ocorreu diminuição das viscosidades em ambas diluições no entanto as viscosidades à temperatura de 25°C foram menores do que as observadas à temperatura de 37°C, assim como observado por outros investigadores.^{39,38}

Como é possível observar a variação foi desproporcional e diferente entre as formulações, exceto as formulações de tomilho com C₈ e com MTX que apresentaram viscosidade similar direta e após diluição no SFV. As diferenças observadas entre as formulações com e sem tomilho podem dever-se à percentagem de cada uma, sugerindo que as medições feitas nas

formulações simples não representam a viscosidade adquirida após administração, uma vez que após diluição no volume médio de fluido encontrado na vagina, houve uma diminuição da viscosidade.

Conforme descrito anteriormente o perfil viscosimétrico ideal para formulações de aplicação vaginal é o tixotrópico, dado que possui propriedades que variam de acordo com a tensão aplicada.^{78,39} Os resultados obtidos demonstraram que todas as formulações apresentaram esta característica, uma vez que a relação entre a tensão e taxa de cisalhamento não foi linear.

A viscosidade de todas formulações diminuiu com o aumento da taxa de cisalhamento, e voltou a aumentar com a diminuição da mesma, revelando apresentar propriedades não-newtonianos. Estas propriedades possivelmente contornam os problemas relatados pelas mulheres quanto ao uso de produtos vaginais, aumentando a retenção e conseqüentemente diminuindo a escorrência e desconfortos causados.

A formulação de T1% embora apresentasse maior viscosidade, após diluição no SFV diminuiu consideravelmente a sua viscosidade, o que poderia aumentar a probabilidade de escorrência e desconforto dada a baixa viscosidade. Embora formulações vaginais com baixa viscosidade facilitem a dispersão aumentando o contato com o epitélio e ambiente vaginal, a incapacidade da formulação em resistir a diluição no SFV resultaria em um período de retenção vaginal muito curto, aumentando a escorrência e conseqüente diminuição da integridade de revestimento.^{38,39,78}

No entanto, formulações altamente viscosas podiam promover maior resistência às diluições e às tensões, limitando a aplicação e disseminação intravaginal do produto.³⁹

Posto isto a formulação mais promissora dada às propriedades viscosimétricas é a de tomilho com o composto ativo C₈ (T1% + C₈) uma vez que esta não apresentou uma viscosidade tão alta e mostrou-se capaz de resistir à diluição no SFV, diminuindo ligeiramente a sua viscosidade. A formulação T1% + MTX também apresentou idênticas propriedades viscosimétricas, mas inferiores à de T1% + C₈. Provavelmente estas formulações contornariam problemas os efeitos de escorrência e facilitaria a sua dispersão e alcance no epitélio vaginal.

4.2.3 Osmolalidade

A osmolalidade foi determinada diretamente das formulações e após diluição no volume correspondente de fluido vaginal encontrado na vagina (0,75 mL), utilizando o SFV (Tabela 9). Primeiramente determinou-se a osmolalidade do SFV em que apresentou-se ligeiramente iso-osmolal (185 mOsm/ Kg), um pouco abaixo dos resultados de osmolalidade de SFV já descritos na literatura (212 mOsm/ Kg).^{39,86}

São considerados iso-osmóticos ou iso-osmolais para o ambiente vaginal, produtos apresentando osmolalidade consistente com a osmolalidade normal de secreções femininas

(260 a 290 mOsm/ kg) e sémen (250 a 380 mOsm/ Kg).⁷⁵ Contudo, intervalos mais amplos de osmolalidade para administração vaginal são bem tolerados, podendo atingir valores de até 1200 mOsm/ Kg, limite superior recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS).^{39,74}

Tabela 9. Resultados da osmolalidade das formulações em estudo. Na diluição fisiológica todas as formulações foram afetadas, com diferenças estatísticas (ANOVA two-way, $p < 0,05$), $n=3$.

Formulações	Osmolalidade ± desvio-padrão (mOsmol/Kg)	
	Diretamente na formulação	Diluição fisiológica no SFV
F. base	1562 ± 47,571	838 ± 10,148
Tomilho 1%	1515 ± 19,035	876 ± 6,506
F.Base + C₈	1638 ± 7,084	894 ± 9,609
F.Base + MTX	1636 ± 12,096	856 ± 11,015
T1%+ C₈	1500 ± 21,361	847 ± 13,527
T1%+ MTX	1545 ± 7,637	877 ± 22,538
Tween 1%	1446 ± 24,062	786 ± 30,171

De acordo com os resultados obtidos, as 7 formulações apresentaram-se ligeiramente acima do limite superior recomendado pela OMS. Valores mais altos de osmolalidade podem estar relacionados com presença de altos níveis de glicerina ou propilenoglicol presentes na composição das formulações, em que quanto maior a concentração destes compostos, maior será o valor da osmolalidade. A recomendação da OMS sobre as concentrações de glicerina e propilenoglicol é que estas não excedam 9,9% (v / v) e 8,3% (v / v), respectivamente.^{39,75}

Cunha e colaboradores realizaram um estudo em que avaliaram 12 géis vaginais comerciais, e destes, 7 apresentavam osmolalidades de até 3 vezes maior que o limite máximo recomendado (Tabela 10 os quais foram relacionados com as concentrações de glicerina / propilenoglicol presentes nas formulações).

Tabela 10: Valores de pH e osmolalidade de produtos comerciais. (Adaptado de referência ⁷⁴)

Produtos	pH	Osmolalidade (mOsm/kg)
Fillergyn [®]	4.5 ± 0.1	991 ± 6
Geliofil [®] Classic	3.8 ± 0.1	3,582 ± 11
GelSea [®]	5.7 ± 0.1	3,797 ± 16
Ginix [®]	5.0 ± 0.1	989 ± 9
Ginix [®] Plus	5.0 ± 0.1	977 ± 8
Hyalogyn [®]	4.8 ± 0.1	1,336 ± 7
K-Y [®] Jelly	3.5 ± 0.2	3,631 ± 13
Phyto Soya [®]	4.6 ± 0.1	1,226 ± 6
RepHresh [®]	3.4 ± 0.1	1,439 ± 6
Replens [®]	3.0 ± 0.1	1,177 ± 5
Velastisa [®] Intim VG	3.7 ± 0.1	1,151 ± 7
Vidermina [®]	4.9 ± 0.1	3,707 ± 16

O estudo de Machado e colaboradores de 11 produtos vaginais com diferentes fins terapêuticos (Tabela 11), 9 apresentaram-se fora dos limites recomendados, desta 3 foram hipo-osmóticas e as restantes hiper-osmóticas. Das formulações hiper-osmóticas, mesmo após diluídas no SFV, apenas 3 foram estatisticamente afetadas pela diluição, e ficando em conformidade com os valores recomendados. Estes resultados também foram relacionados aos níveis de glicerina e propilenoglicol presentes nas formulações.^{39,74}

Tabela 11. Caracterização de formulações vaginais comerciais. (Adaptado de referência ³⁹)

Formulações vaginais comerciais	pH (SFV) ± D.P	pH Diluição (SFV) ± D.P	Osmolalidade ± D.P	Osmolalidade diluição ± D.P
Gino-Canesten	5,89 ± 0,07	4,22 ± 0,01	144 ± 3	165 ± 2
Sertopic	2,71 ± 0,01	4,21 ± 0,01	300 ± 2	272 ± 7
Dermofix	2,70 ± 0,02	4,19 ± 0,03	248 ± 4	228 ± 2
Gyno-Prevaryl	2,74 ± 0,03	4,07 ± 0,01	340 ± 8	264 ± 3
Lomexin	3,57 ± 0,01	4,02 ± 0,05	1446 ± 20	1210 ± 16
Gino Travogen	3,56 ± 0,04	4,16 ± 0,00	43 ± 2	75 ± 1
Dalacin V	3,54 ± 0,01	4,19 ± 0,01	1681 ± 10	1223 ± 8
Ovestin	3,92 ± 0,01	3,95 ± 0,03	3332 ± 60	938 ± 7
Blissel	4,79 ± 0,05	4,32 ± 0,02	1537 ± 6	920 ± 12
Colpotrophine	7,26 ± 0,04	6,76 ± 0,04	1723 ± 20	396 ± 4
Pçacebo Universal	4,51 ± 0,04	4,19 ± 0,02	339 ± 2	306 ± 2
Replens	2,81 ± 0,02	4,12 ± 0,00	2350 ± 81	1859 ± 22

Níveis mais altos de glicerina e propilenoglicol, e consequente aumento da osmolalidade, foram correlacionados com o potencial de irritação dos produtos vaginais.⁷⁵ Através das diluições

fisiológicas é possível conhecer o potencial de irritação que pode estar associado ao produto, o que não é possível quando as aferições são feitas diretamente nas formulações.

Dados pré-clínicos e clínicos reportados na literatura suportam que os produtos vaginais hiper-osmóticos podem comprometer a segurança do produto, assim como efeitos nocivos nos espermatozoides. Estudos realizados demonstraram que formulações altamente hiper-osmóticas (> 2000 mOsm/ Kg) podem levar a ruptura epitelial, barreira funcional da mucosa contra potenciais patógenos. Além de que também podem causar irritação da mucosa e desencadear uma resposta inflamatória. Conforme estudo realizado por Adriaens, Els *et* Remon, JP ⁷⁵, estas alterações não foram observadas em produtos com a osmolalidade abaixo desta ordem de valores.⁷⁵

A composição de uma formulação contribui para a sua osmolalidade final, devendo por isso ser considerado o impacto de cada excipiente individualmente na osmolalidade. No caso das formulações hipo-osmóticas (abaixo dos limites fisiológico e tolerado para fluídos do trato reprodutor feminino) resultam em diminuição da produção de muco vaginal, promovendo que a membrana superficial vaginal fique mais seca.^{75,87,88}

Após diluição no SFV, todas as formulações foram afetadas, diminuindo consideravelmente a sua osmolalidade e havendo diferenças estatísticas (ANOVA two-way, $p < 0,05$) entre as duas medições, apresentando valores de osmolalidade em conformidade com o limite máximo recomendado pela OMS. Essa atenuação na osmolalidade já era esperado, uma vez que o SFV é uma solução hipotônica e as formulações apresentam osmolalidades mais altas, ocasionando na diminuição progressiva do valor das osmolalidades comparativamente a medição sem adição do SFV.

Os resultados deste trabalho mostraram que a formulação F.Base + C₈ e a F.Base + MTX foram as mais hiper-osmóticas, mesmo após a diluição fisiológica no SFV. As formulações contendo tomilho na sua constituição (T1%, T1%+C₈ e T1% + MTX) apresentaram-se menos osmóticas, característica esta que pode ter sido conferida pelo próprio TEO.

A formulação T1% + C₈ demonstrou ter a melhor osmolalidade, mesmo que a osmolalidade direta superasse o limite máximo recomendado. Esta apresentou ter menor valor de osmolalidade dentre as restantes formulações após a diluição no SFV, embora após diluição todas estivessem dentro da gama recomendada. Por apresentar-se menos osmótica, a probabilidade de comprometimento da segurança da formulação é menor.

4.2.4 Bioadesão

Outro parâmetro importante que foi estudado foi a adesividade da formulação ao tecido vaginal. A análise da bioadesão de formulações vaginais permite conhecer a capacidade de uma formulação aderir a uma superfície biológica.³⁹

A bioadesão é caracterizada pela interação entre uma forma de dosagem farmacêutica e a membrana mucosa ou muco secretado pela vagina. Um dos principais componentes do muco vaginal são as mucinas solúveis, glicoproteínas altamente glicosiladas.³⁸ As mucinas consistem em cerca de 500 subunidades kDa unidas por pontes dissulfeto formando estruturas capazes de reter elevada quantidade de água conferindo uma camada protetora viscoelástica sobre a superfície da mucosa.^{38,39}

As propriedades bioadesivas possibilitam o contato da formulação com a superfície vaginal, e consequentemente maiores tempos de retenção no trato genitourinário. Vários estudos tem se concentrado em excipientes poliméricos, uma vez que na maioria dos casos a bioadesão das formulações é conferida pelos polímeros, visando aumentar o tempo de retenção e melhorar a eficácia e segurança das formulações. ^{39,38,89}

Os mecanismos da bioadesão abrangem diversas etapas. Entre elas, a etapa de contato (primordial), hidratação, humedecimento e alastramento, consideradas etapas importantes durante o processo e a etapa de consolidação que envolve o revigoramento da ligação-polímero mucina. As cadeias do polímero conseguem interpenetrar na camada de muco e ligarem-se à mucina, através de ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e interações eletrostáticas.^{38,39} Devido a estes mecanismos, os polímeros promissores com propriedades bioadesivas são os constituídos por grupos hidroxila ou carboxilato. ³⁸

A necessidade de mimetizar o ambiente vaginal fez com que diferentes protocolos experimentais específicos *in vitro* e *ex vivo* fossem desenvolvidos para avaliação da capacidade de bioadesão de diversas formas farmacêuticas vaginais. Estas técnicas geralmente envolvem as forças envolvidas no desprendimento de uma formulação e o tecido biológico utilizado. A força máxima de desprendimento (F_{max}), correspondente à força necessária para o desprendimento da formulação do epitélio vaginal, e o trabalho de adesão (T_{ad}) correspondente ao trabalho realizado na separação das duas superfícies, foram os parâmetros utilizados para avaliar o potencial bioadesivo das formulações.^{39,89} A fiabilidade deste método é estreitamente dependente da falha na região de interação do polímero com a mucina.³⁸

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 12) e a análise estatística do trabalho de adesão pela One-Way ANOVA e teste de comparação múltipla de Turkey ($n=5$, $p < 0,05$) apenas a formulação base com C₈ apresentou diferença estatística significativa.

Tabela 12. Parâmetros bioadesivos das formulações. Força máxima de desprendimento (N), distância de desprendimento (mm) e trabalho de bioadesão (N.mm), representados pelas médias e desvio-padrão, para um n=5. Análise estatística do trabalho de adesão pela *One-Way* ANOVA e teste de comparação múltipla de Turkey ($p < 0,05$). * representa diferença estatística com o resultado do controle.

Formulações	Força máxima (N) ± Desvio-Padrão	Desprendimento (m.m) ± Desvio-Padrão	Trabalho de adesão (N.mm) ± Desvio-Padrão
Controlo	0,030 ± 0,015	1,888 ± 0,178	0,012 ± 0,007
F. base	0,060 ± 0,017	2,332 ± 0,990	0,070 ± 0,045
Tomilho 1%	0,043 ± 0,023	2,204 ± 0,637	0,048 ± 0,030
F.Base + C₈	0,070 ± 0,026	3,536 ± 1,510	0,106 ± 0,055*
F.Base + MTX	0,066 ± 0,030	2,248 ± 0,394	0,055 ± 0,024
T1%+ C₈	0,050 ± 0,026	2,742 ± 0,746	0,065 ± 0,016
T1%+ MTX	0,063 ± 0,051	2,672 ± 1,096	0,071 ± 0,014
Tween 1%	0,023 ± 0,015	1,924 ± 0,493	0,025 ± 0,005

A formulação base com C₈ (F.Base+C₈) apresentou maior bioadesão ao tecido vaginal, seguido da formulação de tomilho a 1% com MTX (T1% + MTX) e da formulação base (F.Base), sendo por isso necessária uma força máxima de desprendimento maior. A formulação com tween 1% apresentou um menor trabalho de adesão, e consequentemente menor força máxima de desprendimento.

Contudo os trabalhos de adesão e força máxima de desprendimento devem ser analisados cuidadosamente devido o desvio-padrão apresentados.

Dado que a formulação base contendo C₈ apresentou uma maior bioadesão ao tecido vaginal, apresentando um trabalho de adesão maior, explicaria os resultados apresentados pelo HPLC nas camaras de ussing, em que o C₈ apresentou uma maior capacidade de retenção no tecido vaginal, provavelmente devido a maior bioadesão das formulações com C₈ no tecido. Formas de dosagens bioadesivas podem contribuir para uma residência *in situ* prolongada, resultando em características vantajosas, como diminuição da escorrência vaginal, menor número de aplicações diárias e aumento do contato dos compostos ativos com o tecido epitelial.³⁹

No entanto, o mesmo não se verificou para a formulação T1%+C₈ dado que para esta formulação o trabalho de adesão foi menor. O mesmo pode ser explicado pelas próprias características do tecido, visto que foram utilizados tecidos vaginais de porca diferentes. O potencial bioadesivo de formas farmacêuticas e de polímeros também depende das especificidades do ambiente do epitélio vaginal e a avaliação deste deve levar isso em consideração.⁹⁰

A maioria das formulações (FBase, Fbase + C₈, Fbase + MTX, T1% + C₈, T1% + MTX) apresentaram propriedades bioadesivas semelhantes, provavelmente por serem formulações a base de géis, um tipo de formulação monofásica com estrutura tridimensional mais coesa e também devido o excipiente polimérico hidroxipropilmetilcelulose, presente em todas as formulações, conferindo-lhes propriedades bioadesivas. A hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), um éter de celulose, comumente utilizado em formulações como veículos de entrega local de fármacos devido à sua capacidade em encapsular elevadas quantidades de fármacos e formar um gel em meio aquoso. Normalmente géis vaginais baseados em derivados de celulose exibem um potencial bioadesivo significativamente maior, dado que estes derivados de celulose apresentam a vantagem particular de serem relativamente independentes do pH, uma vez que estudos relatam que o valor de pH podem interferir no potencial de bioadesão de formulações.⁹⁰

Os mecanismos de autolimpeza da vagina, o stress mecânico (como exemplo, durante a penetração do pênis) e a leve inclinação do canal vaginal contribuem para a expulsão de produtos de aplicação vaginal. A variabilidade do fluido vaginal (ciclo menstrual, práticas de higiene, etc.) pode afetar o fenómeno de bioadesão das formulações ao tecido vaginal, sendo por isso importante o desenvolvimento de formulações vaginais com promissoras propriedades bioadesivas^{39,90}

4.3 Ensaio *in vitro* e *ex vivo*

4.3.1 Ensaio de viabilidade celular

O estudo da viabilidade celular *in vitro* é importante para testar formulações destinadas à aplicação vaginal e avaliar as consequências terapêuticas e a segurança farmacológica das mesmas em linhas celulares conhecidas, neste caso em células cancerosas do colo do útero (HeLa) e de células saudáveis (NHDF), fundamentando a sua utilização.

O ensaio colorimétrico do MTT foi realizado para avaliar a o efeito antiproliferativo das sete formulações em células HeLa e NHDF após as células estarem em contato com as formulações diluídas em meio de cultura por um período de 24h. Os resultados estão apresentados como a média de um n=3 de experiências diferentes e expressos como percentagem de viabilidade celular, tendo como controlo negativo as células tratadas apenas com o respectivo meio. Os poços de maior intensidade da cor roxa indicaram haver maior viabilidade celular e os poços com menor intensidade da cor roxa indicaram um número reduzido de células viáveis, portanto um menor efeito antiproliferativo (Figura 22).

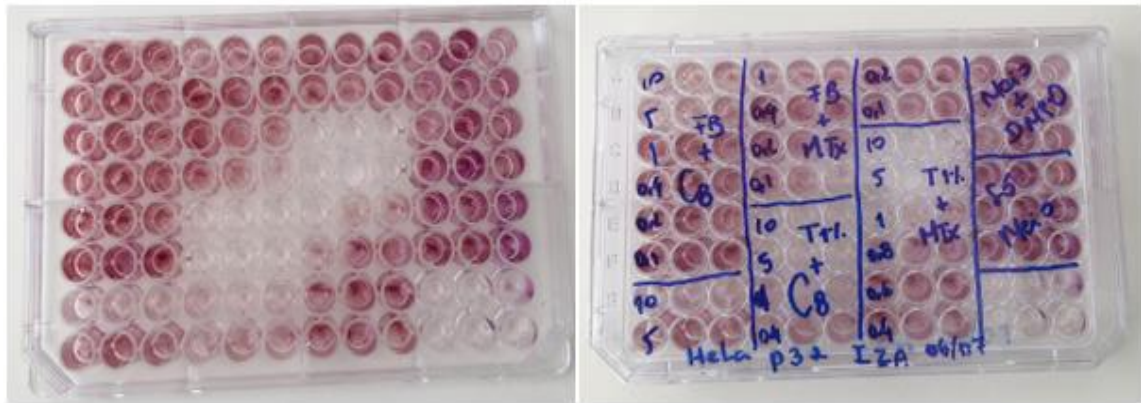


Figura 22. Resultado de um dos ensaios de viabilidade celular nas HeLa, das formulações após 1h incubadas com o reagente MTT.

Todas as formulações (T1%, FB + C₈, FB + MTX, T1% + C₈ e T1% + MTX), exceto as formulações base e com tween 1% (controles), demonstraram inibir o crescimento de ambas as linhas celulares nas diluições de 10% e 5%, conforme apresentado na Figura 23, além de que apresentaram um comportamento similar nas restantes concentrações em ambas as linhas celulares.

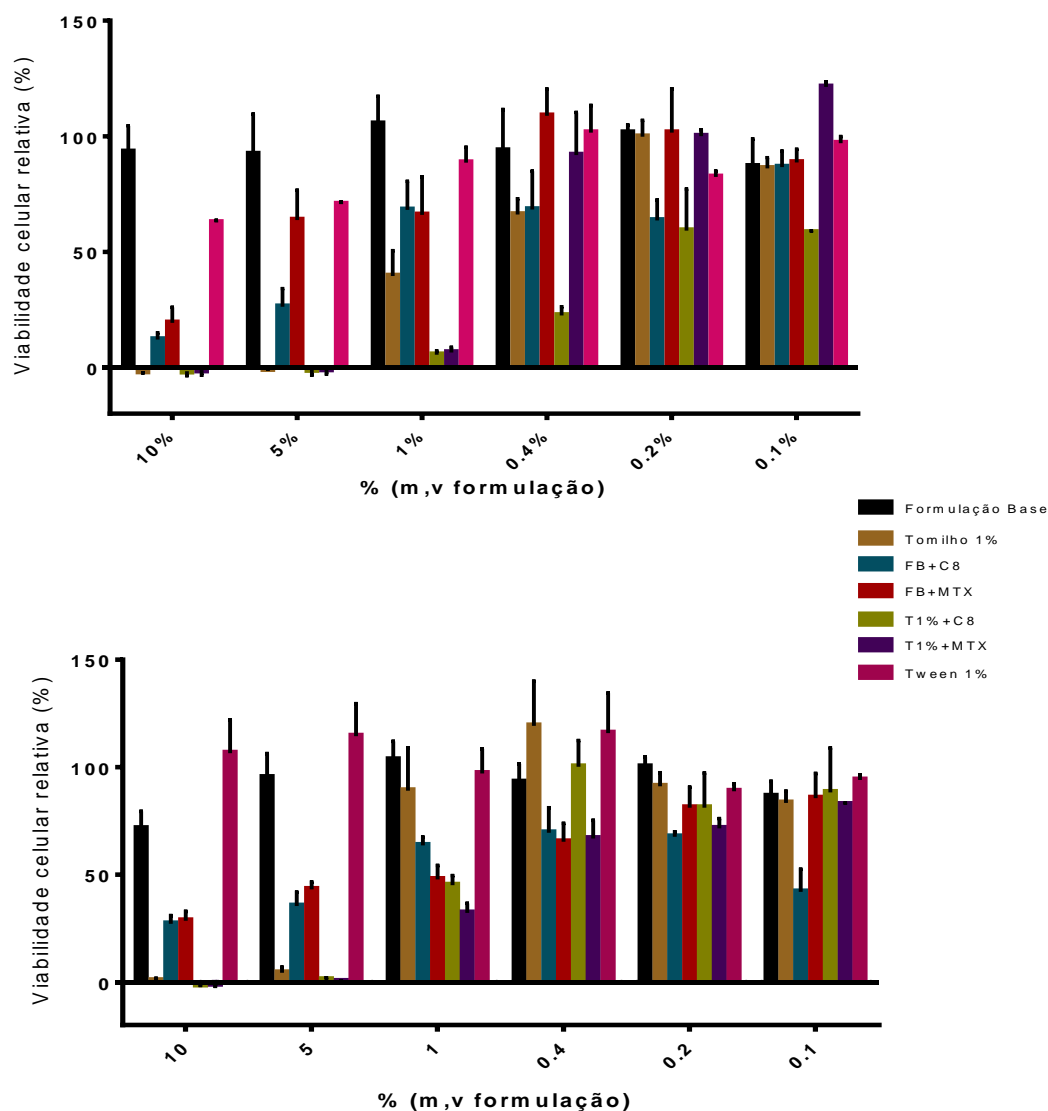


Figura 23. Viabilidade celular relativa das células HeLa e NHDF determinada pelo ensaio de MTT após 24h de incubação com as formulações em estudo.

De um modo geral as formulações apresentaram um efeito antiproliferativo ligeiramente mais acentuado nas células HeLa, sendo mais evidente nas concentrações de 1% e 0,4%, exceto para a formulação F.Base + MTX, que apresentou maior efeito na viabilidade das NHDF, em praticamente todas as concentrações (somente na concentração de 10% a citotoxicidade foi menor nas HeLa).

Na Figura 24 estão representados todos os perfis de citotoxicidade das formulações nas duas linhas celulares. A formulação base, neste trabalho usada como referência, assim como já era esperado em ambas as linhas, não apresentou efeito antiproliferativo considerável, na qual as viabilidades não parecem ter sido afetadas pelo fator de diluição.

A maioria das formulações apresentou um aumento linear das viabilidades celulares com a diminuição da concentração, numa típica relação dose-resposta. A formulação de T1% diminuiu consideravelmente a viabilidade das HeLa e NHDF nas concentrações de 10% e 5%. Já na concentração de 1%, a viabilidade celular nas HeLa foi menor que 50% (39,5%) e nas NHDF, à mesma concentração, a viabilidade foi de praticamente 90% (89,03 %). Para as demais concentrações a viabilidade celular foi maior que 50%.

O efeito antiproliferativo na presença F.Base + C₈ foi maior nas HeLa nas concentrações de 10 % e 5 % e moderado nas concentrações de 0,4 % e 0,2 %, entretanto à concentração de 0,1 % foi observada uma ligeira diminuição na viabilidade celular nas NHDF.

Carvalho e colaboradores estudaram o efeito do ligando C₈ conjugado com sistemas de entrega (nomeadamente aptameros de DNA) e na sua forma livre nas células HeLa e nas NHDF. Neste estudo observaram que o C₈ apresentava o mesmo efeito nas duas linhas, mas no entanto seu efeito citotóxico era diminuído nas NHDF quando conjugado, demonstrando que estes aumentavam a seletividade do C₈ para as células cancerosas.⁷⁰

Os resultados de T1% + C₈ foram bastantes promissores, uma vez que esta formulação revelou ter consideravelmente maior efeito antiproliferativo as células HeLa em praticamente todas as concentrações, exceto nas mais altas (10% e 5 %) em que viabilidade foi praticamente 0% nas duas linhas celulares. T1% + C₈ tem elevada viabilidade (> 50 %) nas HeLa apenas nas concentrações mais baixas (0,2 % e 0,1 %).

Por outro lado, a formulação de T 1 % + MTX, revelou apresentar maior efeito antiproliferativo nas HeLa apenas nas concentrações de 10 %, 5 % e 1 %. Contudo nas concentrações de 0,4 %, 0,2 % e 0,1 % houve um aumento considerável da viabilidade nas HeLa, notavelmente maior que nas NHDF, revelando-se pouco promissor a estas concentrações.

Perillo e colaboradores avaliaram a entrega da MTX às células cancerosas HeLa por meio de lipossomas de polietilenoglicol funcionalizados com o peptídeo de penetração celular gH625, e de acordo com os resultados concluíram que estes aumentaram a internalização do MTX nas HeLa, aumentando deste modo a citotoxicidade. Observaram que a administração do MTX colocaliza o núcleo das células cancerosas, enquanto que com os lipossomas o fármaco era direcionado para zonas perinucleares, onde a produção e coloração de metabólitos foi mais significativa.⁹¹

Parker e colaboradores estudaram a capacidade da MTX em formar adutos de DNA em algumas linhas de células cancerosas entre elas, as células HeLa. Avaliaram a capacidade do MTX em formar adutos com DNA, RNA e proteínas e observaram que o DNA foi o melhor substrato na formação dos adutos nas células. No entanto observaram também que com a mitoxantrona como agente único havia formação de adutos em baixos níveis, mas que quando na adição de um pré-fármaco, aumentava consideravelmente a formação de aduto em todas as linhas

testadas.⁶³

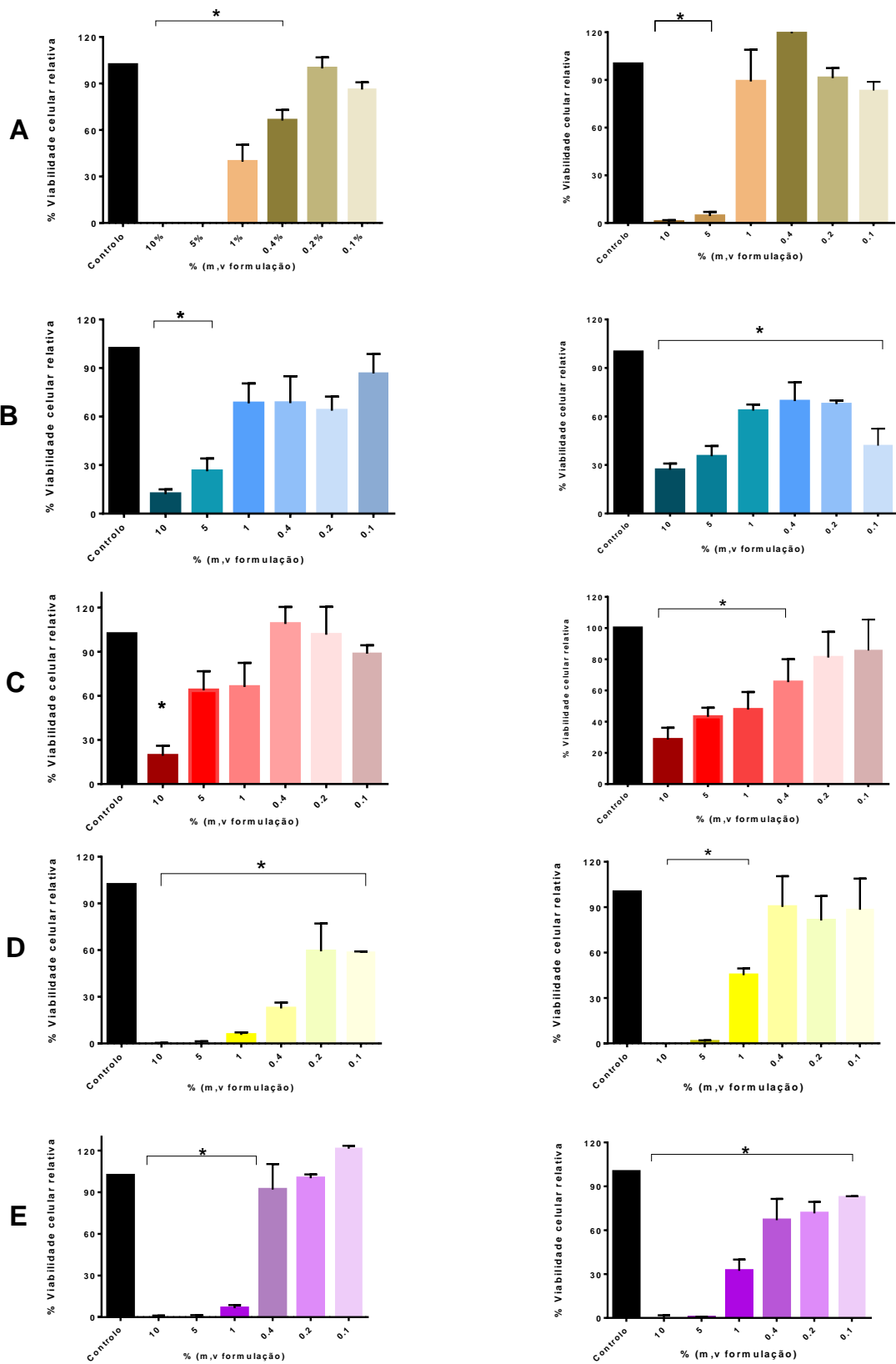


Figura 24. Perfis de viabilidade celular relativa comparativo entre as células HeLa e NHDF, de todas as formulações testadas neste estudo, em diluições variáveis de 0,1 % a 10 % (m / v). O resultados

apresentam-se divididos em duas colunas, em que do lado esquerdo está representado os perfis da viabilidade celular de cada formulação nas HeLa e do lado direito os perfis nos NHDF. As formulações estão representadas do seguinte modo : A) T 1%. a verde, B) F.Base + C₈ a azul, C) F.Base + MTX a vermelho, D) T 1% + C₈ a amarelo e E) T 1%+ MTX a lilás e os controlos representados a preto. Os resultados correspondem a média e os desvios padrão para um n=3 e análise estatística realizada pela *One-way* ANOVA e teste de comparação múltipla de *Dunnett's* (n=3, p < 005), em que * representa estatisticamente diferente.

Através dos resultados de viabilidade celular foi possível observar algumas inconsistências entre as formulações, mesmo estas tendo sido desenvolvidas usando a mesma formulação base. Isso pode ser explicado pela dificuldade em atribuir atividade antiproliferativa a uma única molécula (neste caso aos antineoplásicos) uma vez que as formulações foram desenvolvidas a partir da mistura de excipientes juntamente com os princípios ativos (MTX ou C₈) e algumas delas com o óleo essencial de tomilho.

O TEO, como já descrito na literatura apresenta forte ação antiproliferativa sobre células cancerosas, nomeadamente nas HeLa.^{54,92} De acordo com os resultados, houve uma redução da viabilidade celular dependente da concentração nas células HeLa, possivelmente induzida pelo timol, principal constituinte do tomilho, assim como descrito por De La Chapa et. al.⁹² Ainda segundo o estudo realizado por De La Chapa et al., o timol reduziu significativamente o crescimento de tumores in vivo, não demonstrando nenhum efeito adverso ao longo dos estudos.

Os efeitos antiproliferativos do tomilho podem ter ocorridos através da disfunção que este causa na mitocôndria e com isto induzindo a apoptose.⁵⁴

As formulações com C₈ e MTX, na presença de tomilho a 1% apresentaram efeito antiproliferativo consideravelmente superior às formulações apenas com o C₈ e com MTX. Para a F.Base + C₈ os resultados de viabilidades celulares nas HeLa às concentrações de 5% , 1% e 0,4% foram respectivamente 26,22% , 66,14% e 68,06%. Quando na presença de T1%, para as mesmas concentrações, as viabilidades foram 0% , 5,53% e 22,5% , respectivamente.

Já a viabilidade celular da F.Base + MTX nas HeLa, às mesmas concentrações foram de 63,77%, 65,98% e 100% e na presença do tomilho reduziram-se para 43,14% , 47,74% e 64,14% , respectivamente.

Mastelic e colaboradores estudaram o efeito de alguns dos componentes do óleo essencial de *thymus vulgaris* nomeadamente do timol, carvacrol e eugenol nas células HeLa e observaram que estes compostos apresentavam efeitos antiproliferativos dose-dependentes nestas células, o que os tornaria potencialmente interessantes como coadjuvantes em tratamentos experimentais de cancros. O efeito antiproliferativo derivou-se da diminuição da atividade mitocondrial causada por estes compostos.⁹³

O mesmo foi observado por Kubatka e colaboradores ao avaliarem o efeito do TEO em células de carcinoma de mama (MCF-7 e MDA-MB-231), em que o TEO demonstrou diminuir significativamente de forma dose-dependente a atividade metabólica das células e também a

viabilidade celular em ambas as linhas celulares, embora nas células MDA-MB-231 mostrasse ter menor efeito.⁴⁴

Li e colaboradores, para avaliar os efeitos do timol no cancro da bexiga, trataram células cancerosas da bexiga (T24, SW780 e J82) e células uroteliais não malignas (SV-HUC-1) com diferentes concentrações de timol por 24h. Posteriormente analisaram as alterações na viabilidade das células através do ensaio de MTT. Os resultados demonstraram que o timol reduziu significativamente a viabilidade das células cancerosas da bexiga, enquanto que nas células normais só foi possível observar esse efeito apenas nas concentrações mais altas, sugerindo deste modo que o timol exerceu atividade anticancerígena seletiva em células do cancro de bexiga.⁸⁴

A ação sinérgica da combinação do TEO com os potenciais fármacos (C₈ e MTX) resultou na inibição significativa do crescimento das células cancerosas, dado que tanto o C₈ como MTX estão descritos na literatura como inibidores das células HeLa. Posto isto, provavelmente o óleo essencial de tomilho potencializou o efeito antineoplásico dos potenciais fármacos, C₈ e MTX.

Em suma, o MTX assim como o C₈ apresentaram efeito antiproliferativo, considerável tanto nas células cancerosas HeLa como nas NHDF, assim como já descrito na literatura.^{70,93} No entanto assim como sumariado na Figura 19, a formulação T1% + C₈ demonstrou ser mais promissora neste ensaio, dado sua maior atividade antiproliferativa nas células HeLa na maioria das concentrações, assim como desejado.

4.2.2 Ensaio de permeação dos compostos no tecido vaginal da porca (ex vivo)

A avaliação da libertação e permeação de fármacos é um fator importante e obrigatório no desenvolvimento e controlo da qualidade dos medicamentos na indústria farmacêutica, quando o objetivo é limitar a atividade à superfície da parede vaginal sendo por isso fundamental a escolha correta de um método que mimetize o ambiente *in vivo*, de modo a testar o desempenho de uma formulação em promover ou evitar a permeação por meio do tecido vaginal.⁴²

A vagina é um órgão extremamente vascularizado, devido à sua ampla área de superfície rico em vasos sanguíneos, permitindo assim a absorção de fármacos para a circulação sistémica. Embora a maioria dos fármacos de administração vaginal seja utilizado para fins tópicos, os fármacos que conseguem atravessar o epitélio vaginal atingem a circulação sanguínea em concentrações capazes de exercer efeitos sistémicos.⁴¹

Para avaliar a permeação dos compostos ativos (C₈ e MTX) utilizou-se a câmara de ussing, onde foram mimetizadas as condições *in vivo* da taxa de absorção dos compostos ativos para posterior quantificação usando o HPLC.

Para além das formulações contendo os compostos ativos, fez-se o mesmo procedimento com a formulação base, um simulante de fluido vaginal e a formulação de tomilho a 1% (Tabela 10), sendo estes usados como controlo, dado que não continham fármacos na sua composição. Como esperado, em todos os tempos de recolha, a quantificação foi inferior ao limite mínimo detectável.

Tabela 13. Resultado da análise da HPLC dos controlos. FB – formulação base. SFV – Simulante de fluido vaginal. T1% - Formulação de tomilho a 1%. CD – câmara dadora. CR – Câmara receptora.

Amostra	A * FD	C ug/mL	Tempo de recolha
FB 1	0,84	< LLOQ	0h
FB 2	3,833	< LLOQ	5h
FB 3	5,03773	< LLOQ	20h30
FB 4	2,68101	< LLOQ	25h30
FB 5	3,16183	< LLOQ	56h
CD FB	2,24	< LLOQ	56h
Tecido FB	2,36	< LLOQ	56h
CR FB	2,75725	< LLOQ	56h
SFV 1	6,31677	< LLOQ	0h
SFV 2	17,8745	< LLOQ	5h
SFV 3	3,33206	< LLOQ	20h30
SFV 4	10,6615	< LLOQ	25h30
SFV 5	10,6968	< LLOQ	56h
CD SFV	24,048	< LLOQ	56h
Tecido SFV	59,445	< LLOQ	56h
CR SFV	5,5742	< LLOQ	56h
T 1% 1	1,97975	< LLOQ	0h
T 1% 2	6,8806	< LLOQ	5h
T 1% 3	4,95934	< LLOQ	20h30
T 1% 4	3,21744	< LLOQ	25h30
T 1% 5	0,26	< LLOQ	56h
CD T1%	65,91	< LLOQ	56h
Tecido T1%	10,3234	< LLOQ	56h
CR T1%	5,88956	< LLOQ	56h

Para quantificação dos fármacos C₈ e MTX, no tecido epitelial da porca foram testadas as formulações T1% + C₈ e T1% + MTX e os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 14. Resultados da quantificação do C₈ e do MTX através da cromatografia de alta eficiência, ao longo de 56 horas. T1%+C₈ – Formulação de tomilho a 1% com C₈. T1% + MTX – Formulação de tomilho a 1% com MTX.

	Amostra	Área 608 nm	C ug / mL	Período de recolha
T1 %+ C8	1	0	0	0h
	2	1,01247	0,000465	5h
	3	0	0	20h30 m
	4	33,943	0,017522	25h30m
	5	54,483	0,028161	56h
	CD C8	3501,16	1,813417	56h
	Tecido C8	241	0,12477	56h
	CR C8	40,9116	0,021132	56h
T1 %+ MTX	1	4,95899	< LLOQ	0h
	2	32,4944	0,555754	5h
	3	25,11	0,506839	20h30
	4	19,1652	0,46746	25h30
	5	22,904	0,492226	56h
	CD MTX	12,33286	0,503896	56h
	TecidoMTX	10,474	< LLOQ	56h
	CR MTX	18,4614	0,462798	56h

De acordo com os resultados, a formulação T1% + C₈ somente começou a libertar o composto ativo (C₈) a partir de 24h (25h30), e a concentrações muito baixas. No final do ensaio, a concentração de C₈ quantificada na câmara receptora (0,021132 µg) foi consideravelmente menor que a quantificada na câmara dadora (1,813417 µg), revelando que quantidades muito baixas do C₈ permearam o tecido ao longo do ensaio. O C₈ demonstrou apresentar baixa capacidade em atravessar o tecido epitelial vaginal e atingir a circulação sanguínea, impossibilitando deste modo possíveis efeitos sistêmicos.

De facto, a quantificação de C₈ no tecido demonstra que este ficou retido, o que pode ser interessante do ponto de vista de aplicação tópica da formulação com vista a aumentar a bioadesão dos fármacos ao tecido alvo, uma vez que vários estudos têm sido realizados com o intuito de aumentar a adesão de fármacos no epitélio vaginal.

No caso da formulação de T1% + MTX, observou-se um efeito contrário à formulação contendo o C₈. Nesta formulação o composto ativo (MTX) não foi detectado na primeira recolha, e na segunda recolha (5h) foi possível detectar o composto na câmara receptora. A concentração quantificada no período de 5h foi praticamente a mesma quantificada na câmara dadora, mantendo-se aproximadamente a mesma concentração ao longo das recolhas, sugerindo que o MTX foi libertado minutos após a formulação ser adicionada tendo atingido um equilíbrio entre camara dadora – camara receptora.

A quantificação no período de 56 h na câmara receptora revelou ser praticamente a mesma quantificada na câmara dadora. No tecido não se detectou MTX, sugerindo que o MTX permeia o tecido com maior facilidade do que o C₈. Este resultado é promissor para formulações em que

o objetivo seja potenciar os efeitos sistêmicos onde haja interesse o fármaco permear o tecido epitelial e chegar à circulação sistêmica

Dado que grande parte dos produtos vaginais comerciais (cremes, géis, comprimidos, etc.) demonstraram apresentar um curto período de retenção, devido a ação de autolimpeza da vagina e muitas vezes requererem várias administrações diárias, quanto maior a adesão e retenção de fármacos no tecido vaginal, melhor a eficácia e o efeito terapêutico desejado^{39,74}.

Uma vez que o presente trabalho objetiva o desenvolvimento de formulações vaginais de aplicação tópica, o C₈ reuniu as melhores condições neste ensaio, posto que apresentou maior capacidade de retenção no tecido, sendo libertadas concentrações bastante baixas para a câmara receptora.

Capítulo 5

Conclusão e perspectivas futuras

Cada vez mais tem-se observado o aumento do número de casos de mulheres que são diagnosticadas, anualmente, com lesões cancerosas de alto grau provocadas pelos HPVs de alto risco e que evoluem para estadios avançados de cancro. Estas lesões são no seu estadio inicial são assintomáticas, sendo o rastreio e a vacinação ferramentas muito importantes na prevenção. Deste modo é impreterível investigação nesta área da saúde e novas abordagens terapêuticas anticancerígenas de entrega de fármacos tem vindo a ser implementada. Visando a diminuição da morbilidade (diminuição drástica dos sintomas) e taxas de mortalidade associados ao cancro, as terapias direcionadas focam-se nos tecidos lesados, sem afetar os tecidos saudáveis e deste modo contornar um dos maiores desafios enfrentados pelas indústrias farmacêutica e biotecnológica. A identificação precoce das lesões intraepiteliais cervicais permite a implementação de medidas preventivas e um tratamento adequado de modo a impedir a progressão para o desenvolvimento de cancro do colo do útero que na maioria dos casos resulta das lesões de alto grau provocadas pelo HPV.

A aceitabilidade das mulheres em relação à administração vaginal de fármacos para o tratamento tem vindo a aumentar no decorrer dos tempos, e os géis, cremes tem sido utilizadas pelas mesmas.

A finalidade deste trabalho foi desenvolver formulações para entrega de compostos ativos para o tratamento de lesões cancerosas provocadas pelo HPV. A ação anticancerígena dos compostos incorporados nas formulações dado a sua capacidade de penetração no núcleo de células cancerosas e se ligarem ao DNA, torna-os promissores para o desenvolvimento de formulações com ação anticancerígena.

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular, a ação combinada do TEO com os compostos MTX e C₈ resultou na inibição da viabilidade celular das células HeLa comparando com as formulações base contendo apenas os compostos.

Embora se tenha observado um resultado idêntico de algumas formulações nas células NHDF, o efeito antiproliferativo da formulação T 1% + C₈ foi consideravelmente maior nas HeLa nas concentrações de 1%, 0,4 %, 0,2 % e 0,1 %, e só mostrou atingir viabilidades > 50% nas concentrações mais baixas (0,2 e 0,1 %). Já a formulação de T 1 % + MTX, revelou ser mais citotóxica nas HeLa apenas nas concentrações de 10 %, 5 % e 1 %. De um modo geral as formulações apresentaram-se ligeiramente mais citotóxicas nas HeLa, sendo mais evidentes nas concentrações de 1% e 0,4%, exceto para a formulação de F.Base+MTX, onde apresentou maior citotoxicidade nas NHDF que nas HeLa, em praticamente todas as concentrações.

De acordo com o ensaio de permeação dos compostos no tecido vaginal da porca e a caracterização dos compostos, a formulação de T1% + C₈ revelou-se bastante promissora. O composto C₈ apresentou uma menor capacidade de permear o tecido vaginal da porca, aumentando deste modo a bioadesividade do mesmo no tecido, revelando-se promissor uma vez que o objetivo do estudo é o desenvolvimento de uma formulação para aplicação tópica e com vista o aumento da bioadesão dos compostos ao tecido alvo onde a formulação base com C₈ apresentou maior bioadesão ao tecido. Esta formulação apresentou características viscosimétricas e de osmolalidade promissoras nas diluições fisiológicas em SFV. A viscosidade desta formulação diminuiu ligeiramente evitando escorrência e facilitaria a sua dispersão maior alcance no epitélio vaginal, uma vez que formulações altamente viscosas limitam a disseminação intravaginal do produto.

No entanto o MTX revelou maior facilidade em permear o tecido epitelial; este resultado para formulações poderá ser promissor nos casos em que o objetivo é potenciar efeitos sistémicos onde o fármaco permeie o tecido epitelial atinja a circulação sistémica.

As formulações desenvolvidas nem sempre apresentaram as propriedades ideais de pH, capacidade de tamponamento, osmolalidade, viscosidade e bioadesão. As diluições fisiológicas no simulante de fluido vaginal obteve-se os resultados esperados, reafirmando que a caracterização ideal de formulações vaginais e a mimetização fisiológica *in vitro* no desenvolvimento de produtos vaginais aumenta a sua eficácia e aceitabilidade pelos utentes.

De um modo geral, os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que as formulações contendo o tomilho na sua constituição, principalmente a de T1% + C₈ são as mais promissoras em termos de custo-benefício e de aplicação tópica do composto ativo para o tratamento das lesões provocadas pelo HPV e para o contorno dos problemas de escorrência e desconforto frequentemente relatados pelas mulheres.

Futuramente seria importante :

- Avaliar a ação antiviral da formulação com C₈ em culturas organotípicas infectadas com os HPVs 16 e 18;

- Aumentar a seletividade dos compostos nas células cancerosas versus células saudáveis, através da sda utilização de nanopartículas de entrega seletiva de compostos reduzindo deste modo o potencial citotóxico em células normais e aumentando a eficiência terapêutica. Outra sugestão seria a utilização de aptameros de –quadruplex-quadruplex, uma vez que vários estudos demonstraram a sua eficácia em inibir o crescimento de células cancerosas sem afetar as células saudáveis, devido a especificidade que estes possuem para células cancerosas;

- Avaliar novas estratégias visando o aperfeiçoamento das formulações para o tratamento de lesões decorrentes da infecção pelo HPV;
- Estudar o mecanismo de ação do MTX nas células HeLa de forma a promover o direcionamento do MTX às células alvo;
- Estudar a ação de outros compostos tais como, docetaxel, paclitaxel, ifosfamida, pazopanibe, etc., com ação anticancerígena e antiviral e inclui-los nas formulações encapsulados em nanopartículas.

Capítulo 6

Referências bibliográficas

1. Guijon, F. *et al.* Vaginal microbial flora as a cofactor in the pathogenesis of uterine cervical intraepithelial neoplasia. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **37**, 185–191 (1992).
2. Chabeda, A. *et al.* Therapeutic vaccines for high-risk HPV-associated diseases. *Papillomavirus Research* vol. 5 46–58 (2018).
3. Liang, Y., Chen, M., Qin, L., Wan, B. & Wang, H. A meta-analysis of the relationship between vaginal microecology, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia. *Infectious Agents and Cancer* vol. 14 (2019).
4. Xu, C. *et al.* Maspin expression in CIN 3, microinvasive squamous cell carcinoma, and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Mod. Pathol.* **18**, 1102–1106 (2005).
5. Silva, D. P. da & Moutinho, J. M. Consenso em Patologia Cervico-Vulvovaginal. *Spg* 16 (2004).
6. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review - PubMed.
7. Insinga, R. P., Dasbach, E. J. & Elbasha, E. H. Epidemiologic natural history and clinical management of Human Papillomavirus (HPV) Disease: A critical and systematic review of the literature in the development of an HPV dynamic transmission model. *BMC Infectious Diseases* vol. 9 119 (2009).
8. Moscicki, A. B. *et al.* Rate of and risks for regression of cervical intraepithelial neoplasia 2 in adolescents and young women. *Obstet. Gynecol.* **116**, 1373–1380 (2010).
9. Steenbergen, R. D. M., Snijders, P. J. F., Heideman, D. A. M. & Meijer, C. J. L. M. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 395–405 (2014).
10. Guia para la salud de la mujer - Instituto Nacional del Cáncer. Acedido dia 30/10/2020.
11. Moutinho, J. F. *Consenso sobre infecção por HPV e neoplasia intraepitelial do colo vulva e vagina 2014.* (2014).
12. Bruni, L. *et al.* *Human Papillomavirus and Related Diseases Report WORLD.* (2019).
13. zur Hausen, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology* vol. 384 260–265 (2009).
14. Araldi, R. P. *et al.* The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. *Biomedicine and Pharmacotherapy* vol. 106 1537–1556 (2018).
15. Estêvão, D., Costa, N. R., Gil da Costa, R. M. & Medeiros, R. Hallmarks of HPV

- carcinogenesis: The role of E6, E7 and E5 oncoproteins in cellular malignancy. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* vol. 1862 153–162 (2019).
16. Stanley, M. A. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clinical Microbiology Reviews* vol. 25 215–222 (2012).
 17. Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C. & Murakami, I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in Medical Virology* vol. 25 2–23 (2015).
 18. Egawa, N., Egawa, K., Griffin, H. & Doorbar, J. Human papillomaviruses; Epithelial tropisms, and the development of neoplasia. *Viruses* vol. 7 3863–3890 (2015).
 19. Best, S. R., Niparko, K. J. & Pai, S. I. Biology of Human Papillomavirus Infection and Immune Therapy for HPV-Related Head and Neck Cancers. *Otolaryngologic Clinics of North America* vol. 45 807–822 (2012).
 20. Groves, I. J. & Coleman, N. Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease. *J. Pathol.* **235**, 527–538 (2015).
 21. Dochez, C., Bogers, J. J., Verhelst, R. & Rees, H. HPV vaccines to prevent cervical cancer and genital warts: An update. *Vaccine* **32**, 1595–1601 (2014).
 22. Graham, S. Keratinocyte Differentiation-Dependent Human Papillomavirus Gene Regulation. *Viruses* **9**, 245 (2017).
 23. Human papillomavirus (inside) | Biology of Human/World of Viruses.
 24. Crosbie, E. J., Einstein, M. H., Franceschi, S. & Kitchener, H. C. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet* vol. 382 889–899 (2013).
 25. Bezerra, C. *et al.* Abordagem terapêutica para o Papilomavírus humano (HPV). *Rev. Bras. Farm* vol. 94 (2013).
 26. Brás, F., Sardinha, R. & Pacheco, A. Modalidades terapêuticas no tratamento dos condilomas acuminados. *Acta Obstétrica e Ginecológica Portuguesa* (2015).
 27. Fonseca, J. A. *et al.* Organização sociedade Portuguesa de Ginecologia secção Portuguesa de Colposcopia e Patologia Cervico-Vulvovaginal Coordenação e Redacção.
 28. Brucker, S. Y. & Ulrich, U. A. Surgical Treatment of Early-Stage Cervical Cancer. *Oncol. Res. Treat.* **39**, 508–514 (2016).
 29. *Consenso sobre infecção por HPV e neoplasia intraepitelial do colo vulva e vagina 2014. Acedido dia 16/10/2020.*
 30. Li, H., Wu, X. & Cheng, X. Advances in diagnosis and treatment of metastatic cervical cancer. *Journal of Gynecologic Oncology* vol. 27 (2016).
 31. Bhatla, N., Aoki, D., Sharma, D. N. & Sankaranarayanan, R. Cancer of the cervix uteri. FIGO cancer Report 2018. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **143**, 22–36 (2018).

32. Sousa, S., Ribeiro, R., Sousa, R. & Correia, P. of IPO Coimbra FG. *7*, 268–273 (2013).
33. Koh, W. J. *et al.* Cervical cancer, version 3.2019. *JNCCN J. Natl. Compr. Cancer Netw.* **17**, 64–84 (2019).
34. Tewari, K. S. *et al.* Improved survival with bevacizumab in advanced cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* **370**, 734–743 (2014).
35. Marquina, G., Manzano, A. & Casado, A. Targeted Agents in Cervical Cancer: Beyond Bevacizumab. *Curr. Oncol. Rep.* **20**, 1–10 (2018).
36. Cancro do Colo do Útero | CUF.
37. Garcia, J. *et al.* Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer Treatment Reviews* vol. 86 102017 (2020).
38. Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **92**, 39–52 (2015).
39. Machado, R. M., Palmeira-de-Oliveira, A., Martinez-de-Oliveira, J. & Palmeira-de-Oliveira, R. Vaginal semisolid products: Technological performance considering physiologic parameters. *Eur. J. Pharm. Sci.* **109**, 556–568 (2017).
40. Beacon Health System.
41. Acarturk, F. Mucoadhesive Vaginal Drug Delivery Systems. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* **3**, 193–205 (2009).
42. das Neves, J. & Bahia, M. F. Gels as vaginal drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics* vol. 318 1–14 (2006).
43. Frank, L. A. *et al.* The use of chitosan as cationic coating or gel vehicle for polymeric nanocapsules: Increasing penetration and adhesion of imiquimod in vaginal tissue. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **114**, 202–212 (2017).
44. Kubatka, P. *et al.* Anticancer activities of thymus vulgaris L. In experimental breast carcinoma in vivo and in vitro. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
45. Cytotoxicity of Thymus vulgaris Essential Oil Towards Human Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma.
46. Borugá, O. *et al.* Thymus vulgaris essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *J. Med. Life* **7** . **3**, 56–60 (2014).
47. Gucwa, K., Milewski, S., Dymerski, T. & Szweda, P. Investigation of the antifungal activity and mode of action of thymus vulgaris, citrus limonum, pelargonium graveolens, cinnamomum cassia, ocimum basilicum, and eugenia caryophyllus essential oils. *Molecules* **23**, (2018).
48. Heidari, Z., Salehzadeh, A., Sadat Shandiz, S. A. & Tajdoost, S. Anti-cancer and anti-oxidant properties of ethanolic leaf extract of Thymus vulgaris and its bio-functionalized

- silver nanoparticles. *3 Biotech* **8**, 177 (2018).
49. Sakkas, H. & Papadopoulou, C. Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. *J. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 429–438 (2017).
 50. Fani, M. & Kohanteb, J. In Vitro Antimicrobial Activity of Thymus vulgaris Essential Oil Against Major Oral Pathogens. *J. Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **22**, 660–666 (2017).
 51. Salehi, B. *et al.* Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phyther. Res.* **32**, 1688–1706 (2018).
 52. Horváthová, E. *Comparative study of DNA-damaging and DNA-protective effects of selected components of essential plant oils in human leukemic cells K562* . (2007).
 53. Satooka, H. & Kubo, I. Effects of Thymol on B16-F10 Melanoma Cells. (2012) doi:10.1021/jf204525b.
 54. Islam, M. T. *et al.* Anticancer activity of thymol: A literature-based review and docking study with Emphasis on its anticancer mechanisms. *IUBMB Life* **71**, 9–19 (2019).
 55. Enache, M., Toader, A. M. & Enache, M. I. Mitoxantrone-surfactant interactions: A physicochemical overview. *Molecules* vol. 21 (2016).
 56. Van Dalen, E. C., Van Der Pal, H. J. H., Bakker, P. J. M., Caron, H. N. & Kremer, L. C. M. Cumulative incidence and risk factors of mitoxantrone-induced cardiotoxicity in children: A systematic review. *Eur. J. Cancer* **40**, 643–652 (2004).
 57. Does-Sousa, J. L. *et al.* The age factor for mitoxantrone's cardiotoxicity: Multiple doses render the adult mouse heart more susceptible to injury. *Toxicology* **329**, 106–119 (2015).
 58. Grazziotin, L. *et al.* Therapeutic Concentrations of Mitoxantrone Elicit Energetic Imbalance in H9c2 Cells as an Earlier Event. *Cardiovasc Toxicol* **13**, 413–425 (2013).
 59. Grazziotin, L. *et al.* ORGAN TOXICITY AND MECHANISMS The metabolic profile of mitoxantrone and its relation with mitoxantrone-induced cardiotoxicity. *Arch Toxicol* **87**, 1809–1820 (2013).
 60. Kreft, D., Wang, Y., Rattay, M., Toensing, K. & Anselmetti, D. Binding mechanism of anti-cancer chemotherapeutic drug mitoxantrone to DNA characterized by magnetic tweezers. *J. Nanobiotechnology* **16**, 56 (2018).
 61. Varadwaj, P., Misra, K., Sharma, A. & Kumar, R. Mitoxantrone: an agent with promises for anticancer therapies. *Electron. J. Biol.* **6**, 36–42 (2010).
 62. Imanparast, A., Bakhshizadeh, M., Salek, R. & Sazgarnia, A. Pegylated hollow gold-mitoxantrone nanoparticles combining photodynamic therapy and chemotherapy of cancer cells. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **23**, 295–305 (2018).
 63. Wang, C. *et al.* Mitoxantrone-preloaded water-responsive phospholipid-amorphous calcium carbonate hybrid nanoparticles for targeted and effective cancer therapy. *Int. J.*

- Nanomedicine* **14**, 1503–1517 (2019).
64. Lown, J. W., Morgan, A. R., Yen, S. F., Wang, Y. H. & Wilson, W. D. Characteristics of the Binding of the Anticancer Agents Mitoxantrone and Ametantrone and Related Structures to Deoxyribonucleic Acids. *Biochemistry* **24**, 4028–4035 (1985).
 65. Cholewiński, G., Dzierzbicka, K. & Kołodziejczyk, A. M. Natural and synthetic acridines/acridones as antitumor agents: Their biological activities and methods of synthesis. *Pharmacological Reports* vol. 63 305–336 (2011).
 66. Pereira, E. *et al.* Evaluation of Acridine Orange Derivatives as DNA-Targeted Radiopharmaceuticals for Auger Therapy: Influence of the Radionuclide and Distance to DNA. *Sci. Rep.* **7**, 1–16 (2017).
 67. Belmont, P., Bosson, J., Godet, T. & Tiano, M. Acridine and Acridone Derivatives, Anticancer Properties and Synthetic Methods: Where Are We Now? *Anticancer. Agents Med. Chem.* **7**, 139–169 (2007).
 68. Carvalho, J. *et al.* Fluorescent light-up acridine orange derivatives bind and stabilize KRAS-22RT G-quadruplex. *Biochimie* **144**, 144–152 (2018).
 69. Figueiredo, J. *et al.* AS1411 derivatives as carriers of G-quadruplex ligands for cervical cancer cells. *Int. J. Pharm.* **568**, 118511 (2019).
 70. Carvalho, J. *et al.* Aptamer-guided acridine derivatives for cervical cancer. *Org. Biomol. Chem.* **17**, 2992–3002 (2019).
 71. Carvalho, J. *et al.* Human Papillomavirus G-Rich Regions as Potential Antiviral Drug Targets. *Nucleic Acid Ther.* nat.2020.0869 (2020) doi:10.1089/nat.2020.0869.
 72. Neves, J., Amaral, M. H. & Bahia, M. F. Performance of an in vitro mucoadhesion testing method for vaginal semisolids: Influence of different testing conditions and instrumental parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **69**, 622–632 (2008).
 73. Lages, C. A. S., Silva, J. N., Silva Filho, E. C., Nunes, L. C. C. & Silva, B. B. POLYMERS MUCOADHESIVES FOR VAGINAL USE: A TECHNOLOGICAL FORECASTING. *Rev. Gestão, Inovação e Tecnol.* **4**, 622–631 (2014).
 74. Cunha, A. *et al.* Characterization of Commercially Available Vaginal Lubricants: A Safety Perspective. *Pharmaceutics* **6**, 530–542 (2014).
 75. Adriaens, E. & Remon, J. P. Mucosal irritation potential of personal lubricants relates to product osmolality as detected by the slug mucosal irritation assay. *Sex. Transm. Dis.* **35**, 512–516 (2008).
 76. Psimadas, D., Georgoulas, P., Valotassiou, V. & Loudos, G. Molecular Nanomedicine Towards Cancer : *J. Pharm. Sci.* **101**, 2271–2280 (2012).
 77. Owen, D. H. & Katz, D. F. A vaginal fluid simulant. *Contraception* **59**, 91–95 (1999).
 78. Andrews, G. P. *et al.* Characterization of the rheological, mucoadhesive, and drug release

- properties of highly structured gel platforms for intravaginal drug delivery. *Biomacromolecules* **10**, 2427–2435 (2009).
79. Stockert, J. C., Horobin, R. W., Colombo, L. L. & Blázquez-Castro, A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica* vol. 120 159–167 (2018).
 80. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics | FDA. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/analytical-procedures-and-methods-validation-drugs-and-biologics>.
 81. Ma, Q., Davidson, P. M. & Zhong, Q. Antimicrobial properties of microemulsions formulated with essential oils, soybean oil, and Tween 80. *Int. J. Food Microbiol.* **226**, 20–25 (2016).
 82. Garg, S. *et al.* Properties of a new acid-buffering bioadhesive vaginal formulation (ACIDFORM). *Contraception* **64**, 67–75 (2001).
 83. Wang, Y. & Lee, C. H. Characterization of a female controlled drug delivery system for microbicides. *Contraception* **66**, 281–287 (2002).
 84. Li, Y. *et al.* Thymol inhibits bladder cancer cell proliferation via inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **491**, 530–536 (2017).
 85. Owen, D. H., Peters, J. J., Lavine, M. L. & Katz, D. F. Effect of temperature and pH on contraceptive gel viscosity. *Contraception* **67**, 57–64 (2003).
 86. Lai, B. E. *et al.* Dilution of Microbicide Gels With Vaginal Fluid and Semen Simulants : Effect on Rheological Properties and Coating Flow. **97**, 1030–1038 (2008).
 87. Malonza, I. M. *et al.* Expanded Phase I safety and acceptability study of 6% cellulose sulfate vaginal gel. *AIDS* **19**, 2157–2163 (2005).
 88. Lacey, C. J. *et al.* Unacceptable side-effects associated with a hyperosmolar vaginal microbicide in a phase 1 trial. *Int. J. STD AIDS* **21**, 714–717 (2010).
 89. Aka-Any-Grah, A. *et al.* Formulation of mucoadhesive vaginal hydrogels insensitive to dilution with vaginal fluids. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **76**, 296–303 (2010).
 90. das Neves, J., Amaral, M. H. & Bahia, M. F. Performance of an in vitro mucoadhesion testing method for vaginal semisolids: Influence of different testing conditions and instrumental parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **69**, 622–632 (2008).
 91. Perillo, E. *et al.* Quantitative and qualitative effect of gH625 on the nanoliposome-mediated delivery of mitoxantrone anticancer drug to HeLa cells. *Int. J. Pharm.* **488**, 59–66 (2015).
 92. De La Chapa, J. J., Singha, P. K., Lee, D. R. & Gonzales, C. B. Thymol inhibits oral squamous cell carcinoma growth via mitochondria-mediated apoptosis. *J. Oral Pathol. Med.* **47**, 674–682 (2018).

93. Varadwaj, P., Misra, K., Sharma, A. & Kumar, R. Mitoxantrone: an agent with promises for anticancer therapies. *Electron. J. Biol.* (2010).

Capítulo 7

Anexos

Development of drug-loaded gel formulations for intravaginal administration of anti-HPV drugs

Izamara Gomes-Maacha^{1(*)}, Josué Carvalho¹, Jéssica Lopes-Nunes¹, Mariana Tomás¹, Ana S. Agonia², Ana Palmeira-de-Oliveira^{1,2}, Rita Palmeira-de-Oliveira^{1,2,3}, José Martínez-de-Oliveira¹, Carla Cruz^{1(*)}

¹ CICS-UBI - Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal.

² Lab@r HPRD Health Products Research and Development, Lda, Edifício UBIMEDICAL Estrada Municipal 506, 4200-284 Covilhã, Portugal.

³ Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra, University of Coimbra, Rua Larga, 3004-504 Coimbra, Portugal.

^(*) Email: carlacruz@fcsaude.ubi.pt; izamara@fcsaude.ubi.pt

Introduction



Among more than 180 types of human papillomavirus (HPV), 30 infects the genital tract, being responsible for over 90% of all cervical cancer cases. The use of vaginal gels is often indicated for local vaginal drug delivery.

Previous studies have shown that besides antifungal and antibacterial properties, thyme exhibits anticancer properties. Its activity derives from a specific increase in free radicals and oxidative stress caused in cancer cells¹

This study aimed to develop and characterize drug-loaded formulations containing *T. vulgaris* essential oil (TEO) to enhance the activity of Mitoxantrone (MTX) and acridine orange derivative C₈, (reported to inhibit the growth of cervical cancer cell line HeLa)^{2,3}, for the treatment of HPV-induced lesions.

Methods

Gel formulations

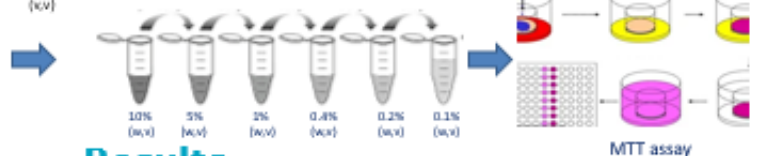


- Placebo + MTX 50µM (w/v)
- Placebo + TEO+MTX (w/v)
- Placebo + C₈ 50µM (w/v)
- Placebo + TEO+ C₈ (w/v)
- Placebo + TEO 1% (w/v)
- Universal placebo

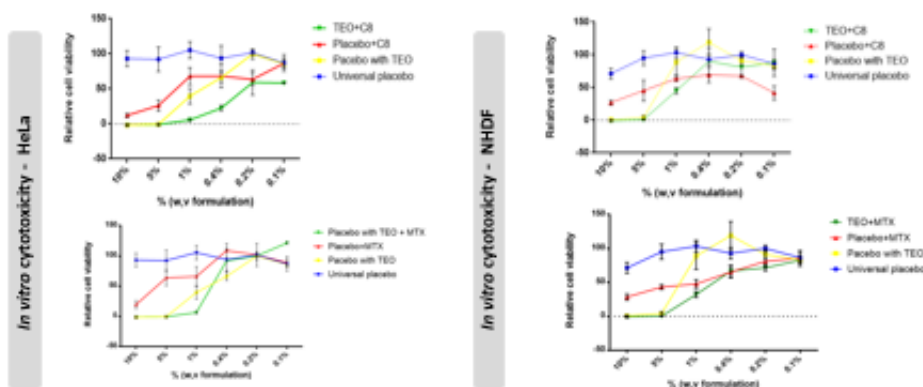
100mg Formulation + Culture media + 0.5% DMSO (v/v)

In vitro cytotoxicity

- HeLa – cervical cells
- NHDF – Dermal cells



Results



Concerning the *in vitro* models, NHDF cells compared to HeLa presented relatively higher cell viabilities over the tested concentrations, mainly at 1% and 0.4%, when tested with TEO and the active compounds MTX and C₈.

Conclusions

- TEO presented higher cytotoxic effect towards HeLa cells;
- TEO may be an enhancer of the cytotoxic effect of MTX and C₈ in the cervical cancer cell lines, and the gel formulations are suitable candidates for local intravaginal delivery of anti-HPV drugs.

References

¹ *Life*, 2018, 7(11), 9–18.
² *J. Cell Dev.*, 2018, 9, 158396.
³ *Sci Rep.*, 2019, 9, 7945.

J. Carvalho acknowledges a doctoral fellowship grant from FCT ref. SFRH/BD/122053/2016. J. Lopes-Nunes acknowledges the fellowship reference UTAP-EXPL/NTEC/0015/2017-01. R. Palmeira-de-Oliveira acknowledges a post-doc grant from FCT ref. SFRH/BPD/124437/2016. This work was supported by UTAustin FCT project DREAM ref. UTAP-EXPL/NTEC/0015/2017.

Acknowledgements