

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**ELIEZER DO CARMO COELHO JÚNIOR**

**ESTUDO DE PERDA DO PRINCÍPIO ATIVO CAPECITABINA E  
ATIVIDADE CITOTÓXICA DE PREPARO DESTINADO À  
ADMINISTRAÇÃO EM FORMA LÍQUIDA**

**VITÓRIA, ES  
2023**

**ELIEZER DO CARMO COELHO JÚNIOR**

**ESTUDO DE PERDA DO PRINCÍPIO ATIVO CAPECITABINA E  
ATIVIDADE CITOTÓXICA DE PREPARO DESTINADO À  
ADMINISTRAÇÃO EM FORMA LÍQUIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade de Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup> Dra. Renata Dalmaschio Daltoé

Co-orientador(a): Prof<sup>a</sup> Dra. Klesia Pirola Madeira

**VITÓRIA, ES**

**2023**

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de  
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

C672e COELHO JUNIOR, ELIEZER DO CARMO, 1989-  
Estudo de perda do princípio ativo capecitabina e atividade  
citotóxica de preparo destinado à administração em forma líquida /  
ELIEZER DO CARMO COELHO JUNIOR. - 2023.  
70 f. : il.

Orientadora: Renata Dalmaschio Daltoé.

Coorientadora: Klesia Pirola Madeira.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal  
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Mamas - Câncer. 2. Quimioterapia. 3. Medicamentos -  
Aprovação. 4. Enzimas. I. Daltoé, Renata Dalmaschio. II.  
Madeira, Klesia Pirola. III. Universidade Federal do Espírito  
Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

---

**ELIEZER DO CARMO COELHO JUNIOR**

**ESTUDO DE PERDA DO PRINCÍPIO ATIVO CAPECITABINA E ATIVIDADE  
CITOTÓXICA DE PREPARO DESTINADO À ADMINISTRAÇÃO EM FORMA  
LÍQUIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da  
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do  
título de Mestre em Bioquímica.

Aprovado(a) em 20 de outubro de 2023.

**BANCA EXAMINADORA:**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Klesia Pirola Madeira - Coorientadora - Presidente**  
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Dalmaschio Daltoé - Orientadora**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Barbosa Coitinho Gonçalves – Examinador Interno**

---

**Dr<sup>a</sup>. Jhuli Keli Angeli – Examinador Externo**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
KLESIA PIROLA MADEIRA - SIAPE 4433029  
Departamento de Farmácia e Nutrição - DFN/CCENS  
Em 24/10/2023 às 13:20

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/823797?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
JULIANA BARBOSA COITINHO GONCALVES - SIAPE 2077211  
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS  
Em 24/10/2023 às 15:31

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/823996?tipoArquivo=O>

À minha família, o bem mais precioso que  
alguém possa ter nesta Terra.

Em memória de Zulemi Pirola e do meu  
pai, Eliezer do Carmo Coelho.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me sustentar e abençoar em cada momento da minha vida. À Ele toda honra e toda glória! À Nossa Senhora, que zela por mim sempre.

Aos meus pais, Eliezer (*in memoriam*) e Angela, e à minha irmã Eliene. Hoje sou fruto da educação que vocês me deram e a busca por conhecimento que sempre me incentivaram a ter.

Ao meu companheiro Eliandro, que sonha todos os meus sonhos comigo, pela paciência e pelo empenho em tornar tudo mais fácil para que eu possa realizá-los.

À professora e orientadora Dra. Renata Dalmaschio Daltoé, que me acolheu como orientando e tanto me ensinou, me dando todo suporte necessário para que eu pudesse realizar mais este sonho.

À professora e co-orientadora Dra. Klesia Pirola Madeira, pela confiança em mim depositada para realizar este trabalho e por sua dedicação em ensinar.

Aos professores Dra. Juliana Aparecida Severi e Dr. Heberth de Paula, do *campus* UFES de Alegre-ES, o apoio, o conhecimento e a disposição em ensinar de vocês foram essenciais para realização deste trabalho.

À Dra Edelweiss Ribeiro Leite Soares, pelo seu trabalho em prol dos seus pacientes oncológicos e por fornecer os comprimidos de capecitabina utilizados nesta pesquisa.

Às farmacêuticas Ivy e Christiane da farmácia de manipulação de medicamentos quimioterápicos do HUCAM, sempre solícitas e dispostas em colaborar, que me ensinaram muito, principalmente como manipular quimioterápicos com segurança.

À UFES, ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica e a todos os professores do PPGBiq que contribuíram para minha formação.

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia do Câncer: Gabrielle, Mileni, Pricila, Pedro Henrique, Rielly e Pedro Fortes, e à Caroline do Laboratório de Cultivo Celular do CCENS do *campus* Alegre – ES. Obrigado por todo apoio durante essa etapa de formação.



Aos professores Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães e Dr. Breno Valentim Nogueira, por cederem o espaço no laboratório LUCCAR, imprescindível para que esse trabalho pudesse ser realizado. Agradeço também ao Flávio e Tadeu, pela disposição em colaborar durante o uso do LUCCAR.

Aos laboratórios multiusuários do Departamento de Farmácia e LABIOM do *campus* de Maruípe, e aos laboratórios de Cultivo Celular e de Análises Clínicas do curso de Farmácia do CCENS do *campus* Alegre – ES.

Ao meu chefe Dr. Marcio Martins e à minha equipe do Laboratório de Análises Clínicas do HUCAM, sem o apoio de vocês eu não teria chegado até aqui.

*Aprenda como se você fosse viver para sempre. Viva como se você fosse morrer amanhã.*

*(Santo Isidoro de Sevilha)*

## RESUMO

Considerado atualmente um grave problema mundial de saúde pública, o câncer é definido como um grupo de doenças com o crescimento descontrolado e disseminação de células anormais em qualquer parte do corpo. O câncer de mama metastático é a forma mais grave deste tipo de câncer, e é considerado incurável através dos tratamentos atualmente disponíveis que objetivam preservar a qualidade de vida das pacientes e oferecer o maior período possível sem os sintomas da doença. Como uma das opções de tratamento, apresenta-se a capecitabina, um pró-fármaco do antineoplásico 5-Fluorouracil (5-FU), que é absorvida no intestino após ser administrada na forma de comprimido. Após absorção ocorre a metabolização da capecitabina na forma ativa como 5-FU pela ação de enzimas a partir do fígado, para causar seu efeito citotóxico nas células cancerosas. Apesar das vantagens da capecitabina ser um fármaco de administração oral, alguns pacientes podem encontrar dificuldade no processo de deglutição do comprimido de capecitabina, o que culmina na sua administração *off-label*, sobre a qual não se tem estudos até o momento. Desta forma, esta pesquisa propõe verificar se ocorre perda do princípio ativo capecitabina e, conseqüentemente, diminuição do seu efeito citotóxico em uma administração *off label*. Os resultados demonstraram que não houve diminuição da concentração do princípio ativo capecitabina na solução preparada a partir dos comprimidos, em ensaio analítico por UFLC em até 360 minutos. Observou-se ainda efeito citotóxico significativo através do ensaio de MTT após o tratamento de linhagens celulares de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 com a solução preparada, sugerindo que o efeito citotóxico é mantido, utilizando-se a solução para tratamento em até 120 minutos, no mínimo, após o seu preparo. Determinou-se a atividade da enzima Timidina fosforilase nas linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231, comprovando a presença desta enzima nestas linhagens e onde foi observado que, em relação à linhagem MCF-7, a linhagem MDA-MB-231 apresenta maior atividade desta enzima (26,6%). Sugere-se que a via metabólica para conversão da capecitabina a 5-FU possa não ser dependente, de forma exclusiva, da ação das carboxilesterases hepáticas.

**Palavras-chave:** câncer de mama; capecitabina; *off-label*; timidina fosforilase.

## ABSTRACT

Currently considered a serious global public health problem, cancer is defined as a group of diseases characterized by uncontrolled growth and spread of abnormal cells anywhere in the body. Metastatic breast cancer is the most severe form of this type of cancer and is considered incurable with currently available treatments aimed at preserving the quality of life of patients and providing the longest possible period without disease symptoms. One treatment option is capecitabine, a prodrug of the antineoplastic agent 5-Fluorouracil (5-FU), which is absorbed in the intestine after being administered in tablet form. After absorption, capecitabine is metabolized into its active form, 5-FU, by liver enzymes, causing cytotoxic effects on cancer cells. Despite the advantages of capecitabine being an orally administered drug, some patients may encounter difficulty in swallowing the capecitabine tablet, leading to off-label administration, for which there are currently no studies. Thus, this research aims to investigate whether there is a loss of the active ingredient capecitabine and, consequently, a decrease in its cytotoxic effect in an off-label administration. The results showed no decrease in the concentration of the active ingredient capecitabine in the solution prepared from the tablets in an analytical assay by UFLC within 360 minutes. Furthermore, a significant cytotoxic effect was observed in the MTT assay after treating breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 with the prepared solution, suggesting that the cytotoxic effect is maintained when using the solution for treatment for at least 120 minutes after preparation. The activity of the thymidine phosphorylase was determined in the MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines, confirming the presence of this enzyme in these lines. It was observed that, in comparison to the MCF-7 line, the MDA-MB-231 line has higher activity of this enzyme (26.6%). It is suggested that the metabolic pathway for the conversion of capecitabine to 5-FU may not be exclusively dependent on the action of hepatic carboxylesterases.

**Keywords:** breast cancer; capecitabine; off-label; thymidine phosphorylase.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Distribuição de casos e óbitos por área mundial em 2020 .....                                                                                                                            | 21 |
| <b>Figura 2.</b> Tratamentos disponíveis para o câncer de mama metastático .....                                                                                                                          | 26 |
| <b>Figura 3.</b> Estrutura química da droga ativa 5-FU.....                                                                                                                                               | 29 |
| <b>Figura 4.</b> As vias anabólica e catabólica de 5-FU antes da eliminação ou efeito citotóxico .....                                                                                                    | 31 |
| <b>Figura 5.</b> Estrutura química do pró-fármaco Capecitabina. ....                                                                                                                                      | 33 |
| <b>Figura 6.</b> Conversão metabólica de capecitabina em três etapas em 5-FU .....                                                                                                                        | 34 |
| <b>Figura 7.</b> Perfil cromatográfico representativo do medicamento por UFLC. ....                                                                                                                       | 47 |
| <b>Figura 8.</b> Curva de calibração da solução estoque padrão de capecitabina .....                                                                                                                      | 48 |
| <b>Figura 9.</b> – Análise da concentração do princípio ativo Capecitabina em soluções a partir do comprimido macerado e dissolvido em água, analisadas por UFLC.....                                     | 50 |
| <b>Figura 10.</b> – Viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 determinada por ensaio de MTT, após tratamento com solução de capecitabina a 1000 µg/mL por 48 e 72 horas ..... | 53 |
| <b>Figura 11.</b> Curva de calibração da solução padrão de timidina.....                                                                                                                                  | 57 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Condições cromatográficas para UFLC-UV.....                                                                                                       | 40 |
| <b>Tabela 2.</b> Concentrações para curva de calibração para quantificação de capecitabina por UFLC.....                                                           | 48 |
| <b>Tabela 3.</b> Quantificação de capecitabina por UFLC em função do tempo após o preparo da solução a partir dos comprimidos macerados e dissolvidos em água..... | 49 |
| <b>Tabela 4.</b> Concentrações do substrato timidina e média das absorbâncias para elaboração da curva de calibração do ensaio de atividade enzimática.....        | 56 |
| <b>Tabela 5.</b> Determinação da atividade da enzima Timidina fosforilase nos lisados celulares MCF-7 E MDA-MB-231 .....                                           | 57 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                      |                                               |
|----------------------|-----------------------------------------------|
| %                    | Porcento                                      |
| ~                    | Aproximadamente                               |
| ≤                    | Menor ou igual                                |
| µg/mL                | Micrograma por mililitro                      |
| µL                   | Microlitro                                    |
| µm                   | Micrômetro                                    |
| µM                   | Micromol                                      |
| 2-DDR                | 2-desoxi-D-ribose                             |
| 5'-DFCR              | 5'-desoxi-5-fluorouacila                      |
| 5'-DFUR              | 5'-desoxi-5-fluorouridina                     |
| 5-FdUMP              | Fluorodesoxiuridina 5'-monofosfato            |
| 5-FU                 | 5-FluoroUracil                                |
| Å                    | Angström                                      |
| ANOVA <i>One-way</i> | Análise de variância de uma via               |
| ANVISA               | Agência Nacional de Vigilância Sanitária      |
| ASC                  | Área sob a curva                              |
| ATM                  | Atmosfera                                     |
| BRCA1                | <i>Breast Cancer type 1</i>                   |
| BRCA2                | <i>Breast Cancer type 2</i>                   |
| BSA                  | Albumina de soro bovino                       |
| CAM                  | Câncer de mama                                |
| CCENS                | Centro de Ciências Exatas Naturais e da Saúde |
| CD                   | Citidina desaminase                           |
| células/mL           | Células por mililitro                         |
| CMA                  | Câncer de mama avançado                       |
| CO <sub>2</sub>      | Dióxido de carbono                            |
| d.i.                 | Diâmetro                                      |
| DCIS                 | Carcinoma ductal <i>in situ</i>               |
| dFUTP                | Trifosfato de desoxifluorouridina             |
| DMEM                 | Meio <i>Eagle</i> Modificado de Dulbecco      |

|                                 |                                                                                                            |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DMSO                            | Dimetilsulfóxido                                                                                           |
| DNA                             | Ácido Desoxirribonucleico                                                                                  |
| DP                              | Desvio padrão                                                                                              |
| DPD                             | Di-hidropirimidina desidrogenase                                                                           |
| DPR                             | Desvio padrão relativo                                                                                     |
| dTMP                            | Desoxitimidina 5'-monofosfato                                                                              |
| dUMP                            | Desoxiuridina 5'-monofosfato                                                                               |
| EBSERH                          | Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares                                                                |
| EDTA                            | <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>                                                                    |
| ER                              | Receptores de estrogênio                                                                                   |
| ES                              | Espírito Santo                                                                                             |
| FBAL                            | Fluoro-β-alanina                                                                                           |
| FdUMP                           | Fluorodesoxiuridina 5'-monofosfato                                                                         |
| FUH <sub>2</sub>                | Di-hidrofluorouracil                                                                                       |
| FUTP                            | Trifosfato de fluorouridina                                                                                |
| g                               | Unidade de aceleração                                                                                      |
| GLOBOCAN                        | <i>Global Cancer Observatory</i>                                                                           |
| HCl                             | Ácido clorídrico                                                                                           |
| HER-2                           | Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano                                                  |
| HUCAM                           | Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes                                                             |
| IARC                            | <i>International Agency for Research on Cancer</i>                                                         |
| IC50                            | Concentração inibitória média                                                                              |
| ICH                             | <i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i> |
| INCA                            | Instituto Nacional do Câncer                                                                               |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | Fosfato de potássio monobásico                                                                             |
| LABIOM                          | Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares                                                        |
| LCIS                            | Carcinoma lobular <i>in situ</i>                                                                           |
| MCF-7                           | Linhagem celular de adenocarcinoma mamário                                                                 |
| MDA-MB-231                      | Linhagem celular de adenocarcinoma mamário                                                                 |
| mg                              | Miligrama                                                                                                  |
| mg/L                            | Miligrama por litro                                                                                        |
| mg/mL                           | Miligrama por mililitro                                                                                    |



|                |                                                           |
|----------------|-----------------------------------------------------------|
| min            | Minuto                                                    |
| mL             | Mililitro                                                 |
| mL/min         | Mililitro por minuto                                      |
| mm             | milímetro                                                 |
| mM             | milimol                                                   |
| MO             | Missouri                                                  |
| MTT            | [3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo] |
| MX-1           | Linhagem celular de adenocarcinoma mamário                |
| n              | Amostra                                                   |
| N              | Número de entidades                                       |
| NaCl           | Cloreto de sódio                                          |
| NaOH           | Hidróxido de sódio                                        |
| nm             | Nanômetro                                                 |
| nmol           | Nanomol                                                   |
| NT             | Controle não tratado                                      |
| NY             | <i>New York</i>                                           |
| OAAs           | Agentes Anticancerígenos Orais                            |
| °C             | Grau celsius                                              |
| OMS            | Organização Mundial da Saúde                              |
| P.A.           | Para análise                                              |
| p<             | Valor de p inferior a                                     |
| p>             | Valor de p superior a                                     |
| PBS            | <i>Phosphate buffered saline</i>                          |
| pH             | Potencial hidrogeniônico                                  |
| PMSF           | <i>Fenilmetilsulfonylfluoride</i>                         |
| PR             | Receptor de progesterona                                  |
| R <sup>2</sup> | Coeficiente de determinação                               |
| RDC            | Resolução de Diretoria Colegiada                          |
| RNA            | Ácido Ribonucleico                                        |
| RPMI           | <i>Roswell Park Memorial Institute</i>                    |
| SFB            | Soro fetal bovino                                         |
| St.            | <i>Saint</i>                                              |
| SUS            | Sistema Único de Saúde                                    |
| TFA            | Ácido trifluoracético                                     |

|            |                                                   |
|------------|---------------------------------------------------|
| <i>TH</i>  | <i>Thuringen</i>                                  |
| TNM        | Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos |
| TP         | Timidina fosforilase                              |
| Tris       | (hidroximetil)-aminometano                        |
| TS         | Timidilato sintase                                |
| u/mL       | Unidade por mililitro                             |
| UFES       | Universidade Federal do Espírito Santo            |
| UFLC       | Cromatografia Líquida Ultra Rápida                |
| <i>USA</i> | <i>United States of America</i>                   |
| v/v        | Porcentagem em volume                             |
| VCM        | Viabilidade Celular Metabólica                    |
| ZR-75-1    | Linhagem celular de adenocarcinoma mamário        |

## SUMÁRIO

|          |                                                                                                                                                                           |    |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA</b>                                                                                                                                 | 20 |
| 1.1      | CÂNCER                                                                                                                                                                    | 20 |
| 1.2      | CÂNCER DE MAMA                                                                                                                                                            | 22 |
| 1.3      | TRATAMENTO                                                                                                                                                                | 25 |
| 1.3.1    | 5-Fluorouracil (5-FU)                                                                                                                                                     | 28 |
| 1.3.2    | Capecitabina                                                                                                                                                              | 32 |
| 1.3.3    | Uso <i>off-label</i> de medicamentos                                                                                                                                      | 36 |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b>                                                                                                                                                          | 38 |
| 2.1      | GERAL                                                                                                                                                                     | 38 |
| 2.2      | ESPECÍFICOS                                                                                                                                                               | 38 |
| <b>3</b> | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>                                                                                                                                                | 39 |
| 3.1      | QUANTIFICAÇÃO DE CAPECITABINA EM COMPRIMIDOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ULTRA RÁPIDA (UFLC)                                                                                | 39 |
| 3.2      | TESTES DE EFICÁCIA SOLUÇÃO PREPARADA DE CAPECITABINA EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA                                                                             | 40 |
| 3.2.1    | Linhagens celulares                                                                                                                                                       | 41 |
| 3.2.2    | Cultivo e manutenção celular                                                                                                                                              | 42 |
| 3.2.3    | Avaliação de eficácia <i>in vitro</i> de solução de capecitabina: ensaios de viabilidade celular metabólica (VCM) por MTT                                                 | 43 |
| 3.2.4    | Determinação da atividade da timidina fosforilase (TP) nas linhagens de mama                                                                                              | 44 |
| 3.3      | ANÁLISES ESTATÍSTICAS                                                                                                                                                     | 45 |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                                                                                                             | 46 |
| 4.1      | PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (UFLC) PARA QUANTIFICAÇÃO DE CAPECITABINA NAS SOLUÇÕES OBTIDAS POR DISSOLUÇÃO DOS COMPRIMIDOS EM ÁGUA | 46 |

|     |                                                                                                                                                                             |    |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2 | AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA <i>IN VITRO</i> DE SOLUÇÃO DE CAPECITABINA: ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA (VCM) POR ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR COM REAGENTE MTT ..... | 51 |
| 4.3 | DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA TIMIDINA FOSFORILASE NAS LINHAGENS DE MAMA.....                                                                                                | 55 |
| 5   | CONCLUSÕES .....                                                                                                                                                            | 60 |
| 6   | PERSPECTIVAS.....                                                                                                                                                           | 62 |
|     | REFERÊNCIAS.....                                                                                                                                                            | 63 |

## 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 CÂNCER

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define o câncer como um grupo de doenças que possuem características em comum, entre as quais observa-se um crescimento descontrolado e disseminação de células anormais em qualquer parte do corpo, resultado da interação entre fatores genéticos do indivíduo e agentes externos físicos, como a radiação ultravioleta e ionizante; químicos, como amianto, álcool e arsênio; e biológicos, como vírus, bactérias e parasitos. Sabe-se que o tabagismo, má alimentação e sedentarismo são fatores de risco para desenvolvimento da doença e que o diagnóstico precoce aliado ao tratamento aumentam as possibilidades de um bom prognóstico da doença (WHO, 2022).

Nas últimas cinco décadas, as pesquisas têm demonstrado que o câncer surge devido a modificações no DNA. Essas mutações somáticas concedem à célula características que a permite contornar os mecanismos regulatórios que normalmente controlam o crescimento e a reprodução celular. Essas características, conhecidas como *“Hallmarks of Cancer”*, permitem a proliferação celular de maneira anormal e que as células adquiram a capacidade de crescer em locais distantes do tumor original. As principais características englobam: proliferação sustentada e imortalidade, resistência à apoptose e inibição do crescimento, instabilidade genômica, indução de angiogênese e inflamação, além de invasão e formação de metástases (HYNDMAN, 2016).

O câncer é um problema mundial de saúde pública, uma das principais causas de mortalidade e considerado uma barreira contra o aumento da expectativa de vida em todos os países do mundo (SUNG et al., 2021). No aspecto demográfico, observa-se uma redução nas taxas de fertilidade e mortalidade infantil, resultando em um aumento proporcional da população idosa. No contexto da transição epidemiológica, está ocorrendo uma substituição progressiva das mortes por doenças infecciosas por óbitos decorrentes de doenças crônicas. O envelhecimento populacional, juntamente com transformações nos padrões de comportamento e no ambiente, incluindo

mudanças estruturais, impactando a mobilidade, o lazer, a alimentação e a exposição a poluentes ambientais, contribui para o aumento da incidência e mortalidade por câncer (WILD, C. P.; WEIDERPASS, E.; STEWART, 2020).

A incidência e a mortalidade pelo câncer aumentam cada vez mais em todo mundo, refletindo tanto o crescimento quanto o envelhecimento da população. O *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN) estimou, com base em dados de 2020 da *International Agency for Research on Cancer* (IARC), que houve 19,3 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo (ou 18,1 milhões, excluídos os casos de câncer de pele não melanoma) e 10 milhões de mortes em todo o mundo no ano de 2020 (Figura1). Além disso, estima-se que um a cada cinco pessoas terão câncer em algum momento de sua vida (INCA, 2022c; SUNG et al., 2021).

O câncer de mama feminino é o tipo mais comum em todo o mundo, registrando 2,3 milhões de novos casos (11,7%), seguido pelo câncer de pulmão, com 2,2 milhões de novos casos (11,4%). Em terceiro lugar, temos o câncer de cólon e reto, com 1,9 milhão de novos casos (10,0%), seguido pelo câncer de próstata, com 1,4 milhão de casos (7,3%), e o câncer de pele não melanoma, com 1,2 milhão de novos casos (6,2%) (Figura 1) (SUNG et al., 2021).

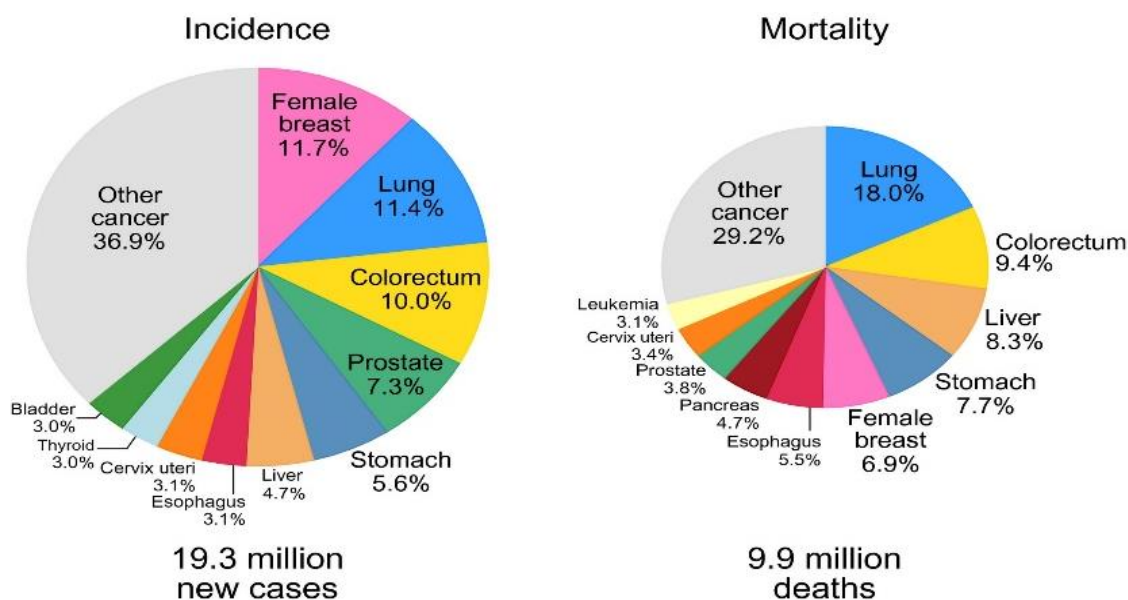


Figura 1. Distribuição de casos e óbitos por área mundial em 2020 para (A) ambos os sexos, (B) homens e (C) mulheres. Fonte: GLOBOCAN 2020.

No Brasil, o INCA (2022b) estimou para o ano 2023 a incidência de 484 mil novos casos de câncer para ambos os sexos, se excluídos os casos de câncer de pele não melanoma, estimado como o mais incidente, com 220 mil casos novos (31,3%). Os demais tipos mais incidentes serão de câncer de mama, com 74 mil (10,5%); próstata, com 72 mil (10,2%); cólon e reto, com 46 mil (6,5%); pulmão, com 32 mil (4,6%); e estômago, com 21 mil (3,1%) casos novos. Do total de casos estimados, destaca-se o câncer de mama feminina com 74 mil casos (20,3%) entre as mulheres e, entre os homens, o câncer de próstata com 72 mil novos casos (21,0%) (INCA, 2022c).

## 1.2 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama (CAM) é uma doença que exibe uma diversidade significativa em suas características morfológicas e moleculares, bem como em sua resposta clínica. Na maioria dos casos, quando tratado de forma apropriada e em tempo hábil, apresenta um prognóstico favorável (WILD, C. P.; WEIDERPASS, E.; STEWART, 2020). A causa definitiva da carcinogênese para o câncer de mama ainda não foi completamente esclarecida, mas vários fatores de risco associados ao desenvolvimento do câncer de mama são reconhecidos (SMOLARZ; ZADROŽNA NOWAK; ROMANOWICZ, 2022).

Destaca-se o câncer de mama feminino como o tipo de câncer mais comumente diagnosticado (11,7% do total de casos) e a 5ª causa mais comum de morte por câncer (6,9%) considerando ambos os sexos, e a 1ª causa de morte por câncer (15,9%) entre as mulheres. Em todo o mundo, o câncer de mama lidera as estatísticas de incidência, representando 11,7% do total de casos. Em 2020, foram registrados cerca de 2,3 milhões de novos casos, equivalendo a 24,5% de todos os cânceres diagnosticados em mulheres, excluindo o câncer de pele não melanoma. Isso se traduz em um risco estimado de aproximadamente 47,80 casos a cada 100 mil mulheres. As maiores taxas de incidência estimadas foram observadas na América do Norte, na Oceania e nos países da Europa Ocidental. (SUNG et al., 2021).

Considerado uma doença multifatorial, o envelhecimento é um dos fatores de risco mais importantes para o câncer de mama: a cada cinco casos, aproximadamente

quatro ocorrem após os 50 anos de idade (FABBRI; CARCANGIU; CARBONE, 2008; INCA, 2022a).

Os demais fatores de risco dividem-se em: fatores endócrinos / história reprodutiva: exposição prolongada aos estrogênios, bem como fatores reprodutivos, incluindo o número de filhos, idade na qual o primeiro filho é concebido e a prática da amamentação, período menstrual e menopausa; fatores comportamentais/ambientais: radioterapia anterior, atividade física, alta ingestão de gorduras, dieta pobre em fibras com alimentos processados, consumo de álcool, tabagismo, exposição excessiva à luz artificial, exposição a produtos químicos; e fatores genéticos/hereditários: história familiar (de câncer de mama ou ovário), mutações genéticas (genes BRCA1 e BRCA2) e raça/etnia, dentre outros. Estes, combinados com alta ingestão de gorduras, dieta pobre em fibras e consumo de álcool, podem aumentar o risco da doença (AKRAM et al., 2017; FABBRI; CARCANGIU; CARBONE, 2008; STANISŁAWEK, 2021).

Exposição à radiação ionizante, baixa paridade e histórico de hiperplasia mamária atípica são outros fatores de risco importantes para o desenvolvimento de câncer de mama (SENKUS et al., 2015). Smolarz et al (2022) cita ainda o gênero, a idade e até mesmo o nível de desenvolvimento econômico do país como fatores de risco para a doença.

O câncer de mama é amplamente reconhecido como uma doença altamente heterogênea. Os vários tipos desta neoplasia exibem características biológicas e padrões histopatológicos distintos, o que resulta em comportamentos clínicos variados e respostas diversas às opções terapêuticas disponíveis. Devido a essa significativa heterogeneidade, os patologistas especializados em histopatologia têm dedicado esforços ao longo dos anos para criar sistemas de classificação que compreendam a diversidade fenotípica e categorizem a doença em grupos clinicamente relevantes. (VIALE, 2012; WEIGELT; REIS-FILHO, 2009).

Os elementos comumente avaliados em exames patomorfológicos muitas vezes não são suficientes para prever o curso clínico do câncer de mama, o que torna desafiadora a tomada de decisões terapêuticas mais adequadas. O estudo da expressão gênica possibilitou a identificação de cinco subtipos moleculares de câncer de mama, a saber: luminal A, luminal B, HER-2 positivo não "luminal", tipo basal e



tipos histológicos especiais. Esses subtipos correspondem aos perfis imunofenotípicos das células cancerosas, determinados com base em critérios patológicos (SMOLARZ; ZADROŻNA NOWAK; ROMANOWICZ, 2022).

O subtipo luminal A é caracterizado pela alta expressão de genes associados à atividade dos receptores de estrogênio (ER), enquanto apresenta baixa expressão de genes relacionados à proliferação e genes associados ao receptor HER-2. O subtipo luminal B, por outro lado, é caracterizado por um status de receptor de estrogênio positivo, mas com uma menor expressão de genes associados a esse receptor e uma expressão mais elevada de genes relacionados à proliferação. O carcinoma de mama tipo basal é também conhecido como câncer triplo negativo devido à ausência de receptores de estrogênio (ER) e progesterona (PR), assim como à falta de expressão do receptor HER-2. Já o subtipo molecular HER-2 positivo do câncer de mama se caracteriza pela superexpressão de HER-2 combinada com a ausência de ER e PR (SMOLARZ; ZADROŻNA NOWAK; ROMANOWICZ, 2022).

Na classificação histológica, são levados em consideração os diversos aspectos morfológicos dos tumores de mama, e eles são categorizados em duas principais classes: carcinomas *in situ* (localizados) e invasivos (infiltrantes) (MALHOTRA et al., 2010; VIALE, 2012). O carcinoma *in situ*, também conhecido como não invasivo, ocorre devido à proliferação de células epiteliais malignas no sistema ducto-lobular da mama. No entanto, essas células não conseguem ultrapassar a membrana basal para invadir o tecido conjuntivo adjacente, permanecendo restritas à camada de onde se originaram (FABBRI; CARCANGIU; CARBONE, 2008; INCA, 2022d). Além disso, o carcinoma não invasivo pode ser subdividido em carcinoma ductal *in situ* (DCIS) ou carcinoma lobular *in situ* (LCIS). O DCIS é mais comum do que o LCIS e abrange um grupo heterogêneo de tumores (MALHOTRA et al., 2010).

Quando o tratamento é iniciado no estágio inicial, as perspectivas de cura são significativamente maiores, prevenindo assim a progressão para o estágio de câncer invasivo, no qual as células malignas invadem o tecido adjacente e ganham a capacidade de se espalhar para outras partes do corpo (INCA, 2022d). De forma semelhante aos carcinomas *in situ*, os carcinomas invasivos compreendem um grupo de tumores diversos que se distinguem por diferentes subtipos histológicos. Os principais tipos incluem ductal, lobular, ductal/lobular, medular, mucinoso (coloidal), tubular e papilar (AKRAM et al., 2017; MALHOTRA et al., 2010).

Neoplasias da mama que atingem outros tecidos do corpo são chamados de câncer de mama metastáticos e são a causa principal de morte entre as pacientes acometidas pela doença. Entre 6% a 60% das mulheres com CAM são diagnosticadas já no estágio de metástases (AL-MAHMOOD et al., 2018; BERTUCCI et al., 2019). Os diferentes tipos de tumores podem ter órgãos pelos quais as metástases são prevalentes, e os principais locais de disseminação desta neoplasia são pulmões, ossos, cérebro, tecidos moles, fígado e glândulas suprarrenais (AL-MAHMOOD et al., 2018).

No processo de estadiamento clínico anatômico do câncer de mama, conforme a sétima edição do Sistema TNM de Classificação de Tumores Malignos, consideram-se critérios como o tamanho do tumor, o envolvimento ou não dos linfonodos axilares do mesmo lado e a presença de metástases. Os estádios são categorizados de 0 a IV, sendo o estágio 0 relativo ao carcinoma *in situ*, o estágio I representando o início de invasão e o estágio IV indicando a fase mais avançada dos carcinomas invasivos, com metástases em órgãos distantes (DEBIASI et al., 2018; INCA, 2022b).

### 1.3 TRATAMENTO

O tratamento para o CAM depende de uma série de fatores individuais, incluindo o risco de toxicidade, as preferências do paciente, o tamanho do tumor, a caracterização do tumor (status HER2 e presença de receptores hormonais), a idade do paciente, o histórico de tratamentos prévios, a presença de outras comorbidades, a gravidade dos sintomas relacionados ao tumor e os locais de metástase. As categorias de tratamento a seguir apresentam-se como possibilidades ao CAM: cirurgia, radioterapia, terapia hormonal, quimioterapia, imunoterapia e terapia gênica, conforme a figura 2. A combinação de dois ou dos três tratamentos pode aumentar a qualidade de vida e reduzir os efeitos colaterais atrelados a um único tratamento (AL-MAHMOOD et al., 2018; O'SHAUGHNESSY et al., 2015).

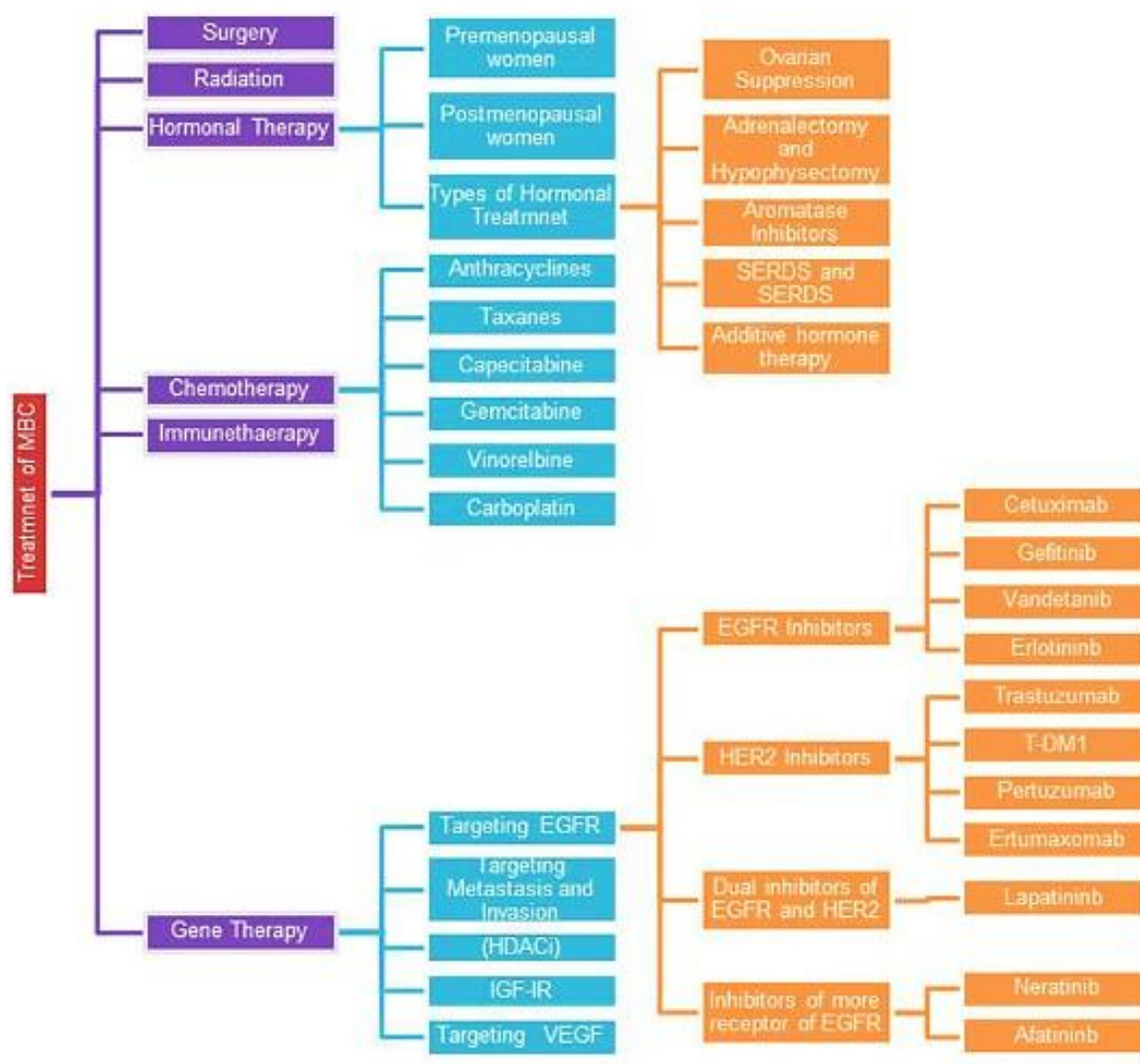


Figura 2. Tratamentos disponíveis para o câncer de mama metastático. Fonte: (AL-MAHMOOD et al., 2018).

A cirurgia no tratamento do câncer de mama metastático pode ser adaptada às necessidades clínicas e individuais, sendo uma opção tanto como tratamento isolado quanto em combinação com quimioterapia ou terapia hormonal para aumentar a eficácia do tratamento. A radioterapia é empregada no tratamento do câncer de mama após a mastectomia ou cirurgia. Já a terapia hormonal é o tratamento de referência para tumores de mama com receptores de estrogênio positivos, no entanto, a sensibilidade ou resistência à terapia hormonal pode se manifestar como efeitos colaterais desse tipo de tratamento (AL-MAHMOOD et al., 2018).

A estratégia de tratamento com quimioterapia é adaptada de acordo com os distintos cenários do CAM. Ela é a opção principal para mulheres que desenvolvem metástases viscerais progressivas em um curto período, apresentam sintomas ou possuem receptores hormonais negativos, ou ainda, têm câncer resistente à terapia hormonal. Os medicamentos citotóxicos podem ser administrados por via oral ou intravenosa (AL-MAHMOOD et al., 2018).

O microambiente imunológico em cânceres é um equilíbrio entre células que promovem e inibem a destruição do tecido, e essa característica é utilizada na abordagem pela imunoterapia. A imunidade do Tipo I, envolvendo células T CD4+ que secretam citocinas, apoia a destruição do tecido, com IL-2 induzindo regressão do câncer de mama metastático. O sistema do Tipo II, envolvendo células T CD4+ e citocinas diferentes, reduz a inflamação aguda. Uma abordagem complexa que combina terapias imunológicas, como a terapia com células NK e T citotóxicas, com tratamentos convencionais, pode ser eficaz em cânceres avançados. Além disso, o uso de medicamentos biológicos pode promover um microambiente imunológico do Tipo I, melhorando a terapia e reduzindo a recorrência do câncer de mama (AL-MAHMOOD et al., 2018).

Por fim, no tratamento pela terapia gênica dois grupos de genes que controlam a metástase do câncer são empregados: genes supressores da metástase (MSGs) e genes promotores da metástase (MPGs). A abordagem de direcionar os sinais desses genes pode ter o potencial de aprimorar a terapia do câncer de mama metastático, uma vez que esse tipo de câncer envolve uma complexa rede de sinais genéticos (AL-MAHMOOD et al., 2018).

Apesar de a cirurgia ser fundamental no tratamento da maioria dos casos de câncer de mama, suas vantagens são limitadas, especialmente em pacientes com estágios avançados da doença. Assim, acredita-se que os avanços mais significativos no combate ao câncer surgirão principalmente por meio da terapia medicamentosa (MORI et al., 2022).

Entretanto, atualmente sabe-se que o câncer de mama metastático é classificado como incurável com as terapias atualmente disponíveis. Além de estender a sobrevida, os principais objetivos do tratamento incluem preservar a qualidade de vida

e oferecer o maior período possível sem os sintomas da doença (HARBECK; GNANT, 2017).

De acordo com as diretrizes do segundo consenso internacional para Câncer de Mama Avançado (CMA), são objetivos do tratamento otimizar a duração e qualidade de vida, priorizando-se o uso sequencial de um mesmo agente quimioterápico, uma vez que as pacientes apresentam diferentes preferências, riscos de toxicidade, status do tumor quanto aos receptores hormonais e HER-2, idade, comorbidades, sítios metastáticos e efeitos residuais de terapias anteriores. São exceções à esta recomendação casos de crise visceral, doença rapidamente progressiva ou com muitos sintomas. Nestes casos o tratamento combinado de agentes pode ser utilizado (DEBIASI et al., 2018; HARBECK et al., 2019; JIANG, Z. et al., 2018; O'SHAUGHNESSY et al., 2015).

São agentes de primeira escolha para CAM as antraciclinas (por exemplo a Doxorubicina e a Daunorrubicina) e os taxanos (por exemplo o Paclitaxel e o Docetaxel). Porém, não é incomum que a doença progrida após tratamento de primeira linha, sendo, portanto, necessária a escolha de outro tratamento e, até o momento, não há padronização de esquema terapêuticos para esses casos, sendo a capecitabina, em monoterapia ou de forma combinada, uma alternativa terapêutica utilizada. (JIANG, Z. et al., 2018).

### **1.3.1 5-Fluorouracil (5-FU)**

O 5-FluoroUracil (5-FU) é um análogo fluorado do uracil, foi originalmente desenvolvido em 1957 (Figura 2). Sua ação citotóxica ocorre tanto pela incorporação do fármaco no RNA quanto pela depleção de timidina após a interação com a enzima timidilato sintase (TS) (WALKO; LINDLEY, 2005). É considerado um agente quimioterápico amplamente utilizado, com eficácia comprovada em diversos tipos de tumores sólidos de crescimento lento, por exemplo aqueles de cabeça e pescoço, mama, próstata, pâncreas, fígado, ovários e nos tratos geniturinário e gastrointestinal. Também é utilizado no tratamento de carcinoma basocelular superficial quando aplicado topicamente (AKBARI; JAVAR, 2013; WALKO; LINDLEY, 2005).

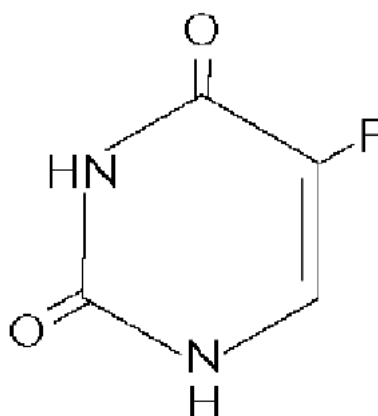


Figura 3. Estrutura química da droga ativa 5-FU.

Fonte: (WALKO; LINDLEY, 2005).

O 5-FU possui apresentação em forma de injeção intravenosa e em formulações tópicas. A forma intravenosa do 5-FU é fornecida em frascos de 500 mg (frascos de dose única de 50 mg/ml, 10 ml) (AKBARI; JAVAR, 2013). A administração do 5-FU é feita por via intravenosa devido à sua absorção variável no trato gastrointestinal e rápida degradação. É importante citar que o 5-FU exibe uma farmacocinética saturável, o que significa que as concentrações no plasma dependem da dosagem do medicamento e da velocidade de administração (WALKO; LINDLEY, 2005). Frequentemente, ocasiona eventos como mielossupressão, toxicidade gastrointestinal, necessidade de ajuste de dose, deterioração da qualidade de vida e aumento do risco de internação hospitalar (MIREȘTEAN; IANCU; IANCU, 2022).

Após a administração, o 5-FU penetra nas células por meio de um sistema de transporte mediado por transportadores. Dentro da célula, ele é convertido em Fluorodesoxiuridina 5'-monofosfato (FdUMP). O FdUMP compete com o Desoxiuridina 5'-monofosfato (dUMP) pela enzima timidilato sintase (TS). A TS é responsável por converter o dUMP em Desoxitimidina 5'-monofosfato (dTMP). Devido à interferência do 5-FU na função da TS, a formação de dTMP é interrompida, resultando na inibição da síntese de DNA (AKBARI; JAVAR, 2013).

Em sua farmacodinâmica, o 5-FU pode seguir diferentes vias em nosso organismo, dependendo das enzimas envolvidas. Uma dessas enzimas é a di-hidropirimidina

desidrogenase (DPD), que o direciona para o catabolismo, visando a sua desintoxicação e posterior eliminação. Enquanto isso, a timidina fosforilase (TP) o encaminha para o anabolismo, onde são formados compostos com atividade citotóxica (WALKO; LINDLEY, 2005).

No processo de degradação mediado pela DPD, o 5-FU é convertido em di-hidrofluorouracil (FUH<sub>2</sub>) que posteriormente é transformado em fluoro-β-alanina (FBAL) antes de ser eliminado através da urina. Vale destacar que nenhum desses metabólitos possui atividade citotóxica. A DPD desempenha um papel fundamental na desintoxicação do 5-FU. No entanto, cerca de 2% a 4% da população possui deficiência de DPD, o que influencia na biodisponibilidade do medicamento, expondo esse grupo de pacientes em risco aumentado de sofrer toxicidade pelo 5-FU (WALKO; LINDLEY, 2005).

O primeiro mecanismo de citotoxicidade pelo 5-FU é mediado pelo FdUMP, um produto resultante da conversão enzimática da FU pela timidina quinase. O FdUMP concorre com o dUMP para formar um complexo terciário estável com a timidilato sintase e o ácido fólico. Após a formação desse complexo, a timidilato sintase é inibida na etapa crítica da síntese da timidina. Esse mecanismo promove atrofia na síntese de DNA devido à falta de timidina, resultando em apoptose das células cancerosas. A outra via para o efeito citotóxico ocorre pela timidina fosforilase (TP) que também prepara o 5-FU para ser incorporado no RNA, convertendo-o no trifosfato de fluorouridina (FUTP), e no DNA, convertendo-o em trifosfato de desoxifluorouridina (dFUTP). Essas formas possuem um átomo de flúor que substitui um átomo de oxigênio em sua molécula, tornando-as preferidas para incorporação ao RNA e DNA. Esse erro causa inibição da síntese de DNA e, conseqüentemente, desencadeia a apoptose das células cancerosas (WALKO; LINDLEY, 2005).

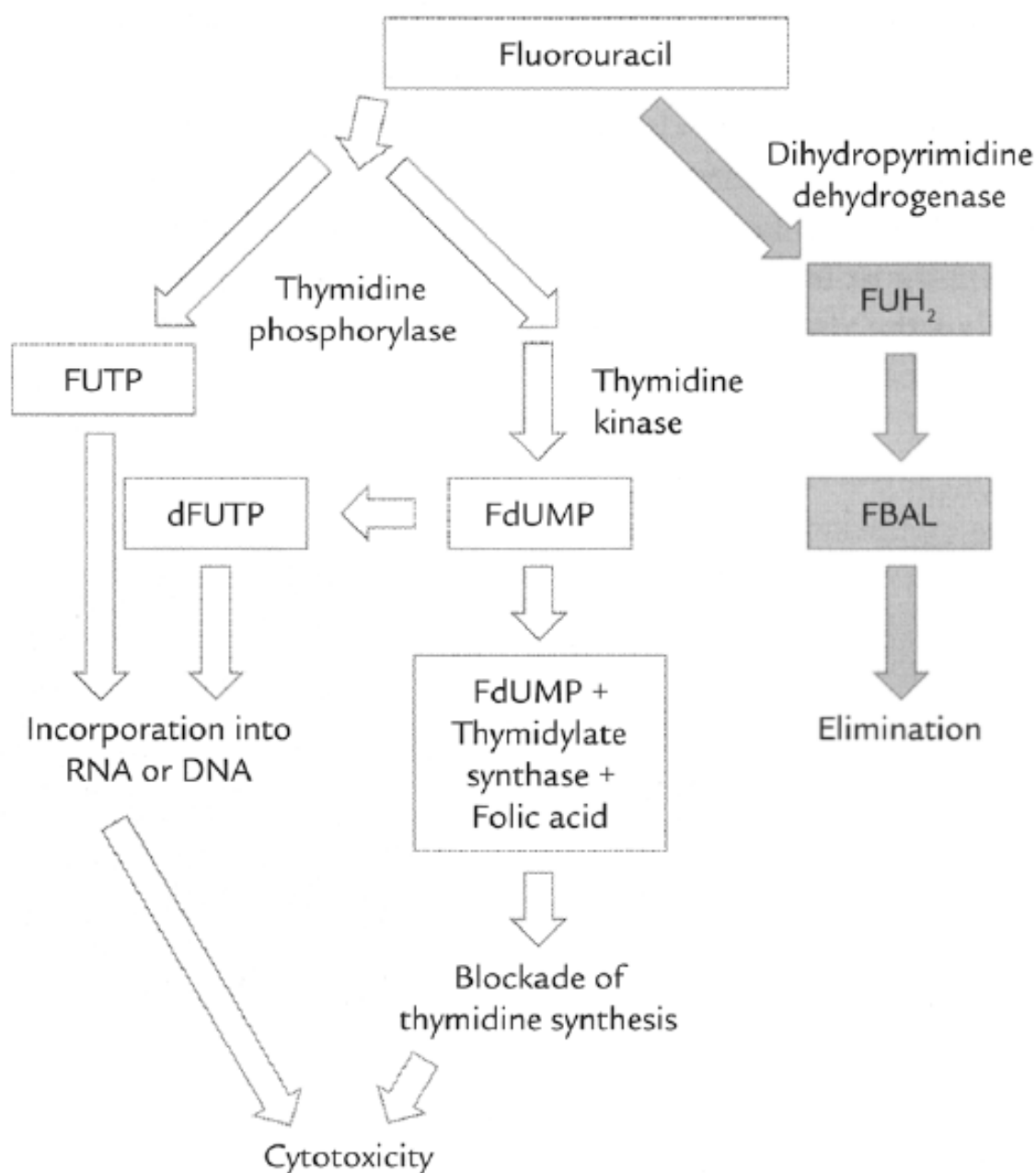


Figura 4. As vias anabólica e catabólica de 5-FU antes da eliminação ou efeito citotóxico. FUTP = trifosfato de fluorouridina; FUH<sub>2</sub> = di-hidrofluorouracil; dFUTP = trifosfato de desoxifluorouridina; FdUMP = Fluorodesoxiuridina 5'-monofosfato; FBAL = Fluoro-β-alanina. Fonte: Adaptado (WALKO; LINDLEY, 2005).

No entanto, o uso de infusão contínua do 5-FU tem enfrentado desafios relacionados aos custos hospitalares e/ou domiciliares, riscos de infecção associados a dispositivos intravenosos, e possíveis efeitos colaterais para os pacientes. Para superar essas limitações, sem abrir mão dos benefícios da administração contínua, foram desenvolvidos pró-fármacos orais do 5-FU. O objetivo no desenvolvimento dos pró-



farmacos era simplificar a administração por via intravenosa, fornecendo uma forma oral de dosagem, ao mesmo tempo em que melhorava a segurança e eficácia, direcionando o medicamento ativo de forma seletiva às células cancerosas, poupando assim os tecidos saudáveis (WALKO; LINDLEY, 2005).

Em um estudo sobre os efeitos do 5-FU e a capecitabina (um pró-farmaco de 5-FU) em células da linhagem de câncer de mama MCF-7, Akbari e Javar (2013) demonstraram que o 5-FU exerce um efeito inibitório mais pronunciado sobre linhagem estudada, cerca de 3.021 vezes mais potente em comparação à capecitabina, demonstrando seu maior potencial de citotoxicidade nesta linhagem celular. Apesar das vantagens associadas ao 5-FU, é importante mencionar que sua eficácia é limitada devido à rápida conversão em FUH<sub>2</sub>. Devido a essas limitações e desvantagens a capecitabina é frequentemente preferida como agente antineoplásico na prática clínica (AKBARI; JAVAR, 2013).

É cada vez mais comum o uso de Agentes Anticancerígenos Orais (OAAs), uma vez que eles têm demonstrado eficácia significativa no tratamento de alguns tipos de câncer, sendo preferidos pelos pacientes em relação a quimioterapia intravenosa, pela conveniência e flexibilidade na administração (JIANG, Yun et al., 2022). Diversos elementos desempenham um papel crucial na escolha de um tratamento terapêutico específico, abrangendo eficácia, segurança, disponibilidade de medicamentos, adesão e custos diretos associados. Até pouco tempo atrás, a terapia para o câncer era predominantemente realizada por meio de infusões intravenosas; no entanto, nos últimos anos, agentes orais oncolíticos foram incorporados como alternativas terapêuticas (TOMPKINSON, PHARMD et al., 2020).

### **1.3.2 Capecitabina**

A Capecitabina (N4-pentiloxicarbonil-5-deoxi-5-fluorocitidina) é uma substância cristalina com peso molecular de 359.3501 g/mol (figura 4), muito solúvel em água e estável na forma de comprimido por, pelo menos, nove meses. Após a ingestão do comprimido, a capecitabina é absorvida no intestino sob a forma de pró-fármaco. A

capecitabina passa por três etapas de ativação para se transformar em 5-FU. A enzima responsável por essa conversão final, a timidina fosforilase (TP), está presente em níveis mais elevados nas células cancerosas em comparação com os tecidos saudáveis. Isso teoricamente permite a ativação seletiva da droga e reduz a toxicidade sistêmica (WALKO; LINDLEY, 2005). Pertencente a classe de antineoplásicos, a capecitabina é um carbamato de fluoropirimidina utilizado comumente por via oral no tratamento de cânceres de mama, colorretais metastáticos e gástricos (LALITHA; RAVEENDRA REDDY; DEVANNA, 2020; WALKO; LINDLEY, 2005).

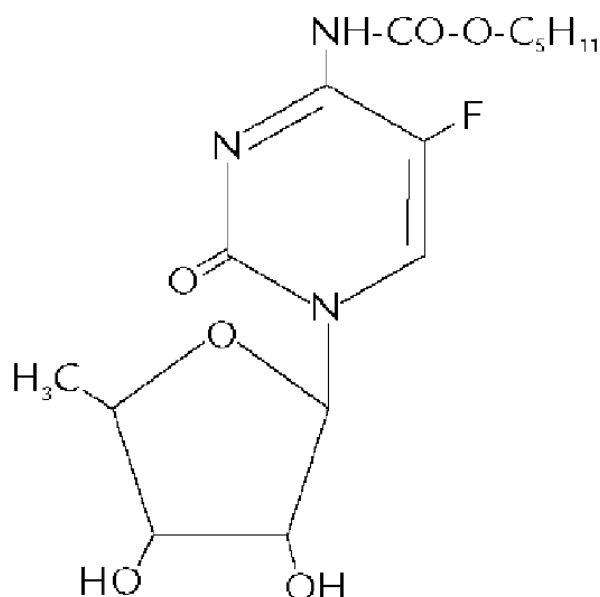


Figura 5. Estrutura química do pró-fármaco Capecitabina.

Fonte: (WALKO; LINDLEY, 2005).

Dentre as drogas quimioterápicas utilizadas no câncer de mama e colorretal metastáticos e no câncer gástrico encontra-se a Capecitabina. O pró-fármaco em questão é eficaz em pacientes com CAM metastático refratário ao uso de taxanos, como paclitaxel, e de antraciclinas, sendo utilizado em monoterapia ou terapia combinada com outra droga, em especial o docetaxel (KARACHALIOU et al., 2012; LIN; KUO; KO, 2021; SAMBI et al., 2019).

Ao ser administrada oralmente, a capecitabina, que é pró-fármaco do 5-FU, é rápida e quase completamente absorvida no trato gastrointestinal como droga não alterada. Após absorção, carboxilesterases do fígado fazem a conversão para o 5'-deoxi-5-fluorouacila (5'-DFCR), que é então metabolizado à 5'-deoxi-5-fluorouridina (5'-DFUR) pela citidina desaminase (CD), uma enzima presente em altas concentrações no fígado, plasma e tecido tumoral. Por fim, o 5'-DFUR é convertido à droga ativa 5-FU pela timidina fosforilase (TP), enzima encontrada em quantidades até 10 vezes maiores em vários tumores sólidos do que nos tecidos normais adjacentes (DEENEN et al., 2013; MARTINS et al., 2013; WALKO; LINDLEY, 2005), e este processo metabólico sequencial minimiza a toxicidade para o trato gastrointestinal e a medula óssea, resultando em uma notável seletividade em relação às células tumorais (HASHIMOTO et al., 2020).

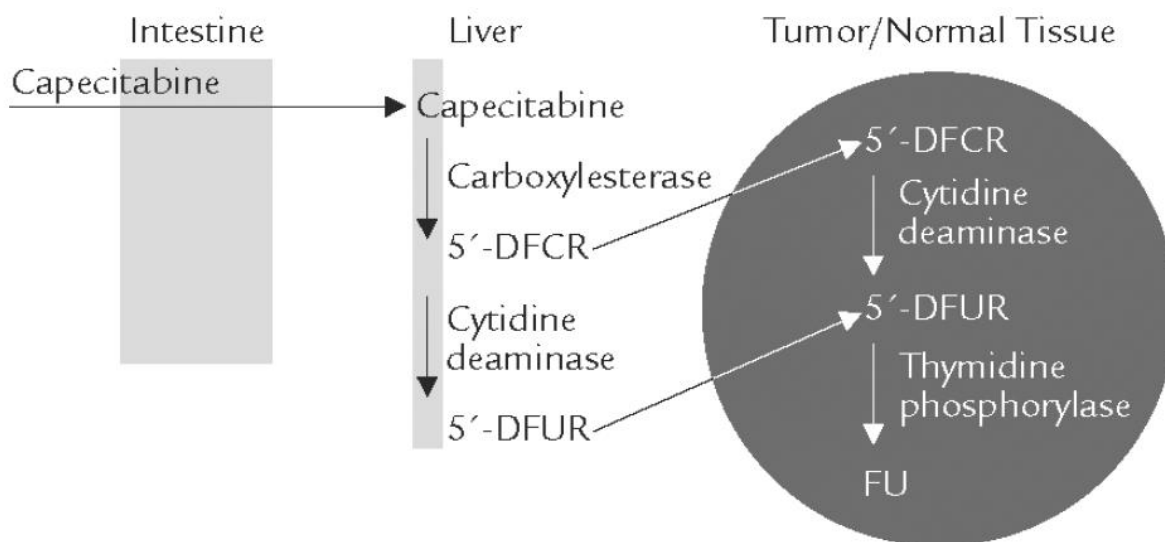


Figura 6. Conversão metabólica de capecitabina em três etapas em 5-FU. A capecitabina é absorvida através do intestino e convertida em 5'-desoxi-5-fluorocitidina (5'-DFCR) pela carboxilesterase e depois em 5'-desoxi-5-fluorouridina (5'-DFUR) pela citidina desaminase, ambas as etapas ocorrendo no fígado. Finalmente, a timidina fosforilase converte 5'-DFUR no fármaco ativo, FU. Isso ocorre tanto no tumor quanto nos tecidos normais; no entanto, a enzima é encontrada em concentrações mais elevadas na maioria dos tecidos tumorais em comparação com o tecido saudável normal. Fonte: (WALKO; LINDLEY, 2005).

A substituição do 5-FU pela capecitabina se baseia na transformação desta pró-droga oral, a partir da ação de enzimas presentes em tecidos tumorais, na droga biologicamente ativa – o 5-FU. (MIREȘTEAN; IANCU; IANCU, 2022). Comercialmente, a capecitabina se apresenta como comprimidos revestidos de 150 mg ou 500 mg, sendo a mesma uma substância branca altamente solúvel em água e estável na forma farmacêutica original em temperatura ambiente por no mínimo 9 meses (BUDMAN et al., 1998). A posologia de bula orienta que o paciente deve ingerir com água o comprimido dentro de 30 minutos após as refeições (café da manhã e jantar) (SUN FARMACÊUTICA DO BRASIL, 2015).

Apesar das vantagens apresentadas, a capecitabina pode causar reações adversas aos pacientes em tratamento em monoterapia ou em terapia combinada que exijam manejo adequado pelos profissionais de saúde. Destacam-se como mais graves diarreia, vômitos, estomatite e síndrome mão-pé (MARTINS et al., 2013; ROCHE, 2022).

Além disso, os pacientes podem ainda encontrar barreiras, como demonstrado no estudo de Macleod et al. (2007), no qual foram relatados pacientes com dificuldade no processo de deglutição do comprimido, principalmente devido ao seu tamanho. Ademais, por sua solubilidade em água, para pacientes com problemas ao deglutir ou aqueles que utilizam sonda nasogástrica ou nasoenteral, é possível triturar ou macerar os comprimidos. Nesse processo, os comprimidos são dissolvidos completamente em cerca de 200 mL de água, por até 15 minutos, sendo necessário administrar imediatamente a solução após seu preparo (CHAU; LEGGE; FUMOLEAU, 2004; LAM, 2011; MARTINEZ-TRUFERO et al., 2010).

No entanto, os fabricantes contraindicam que os comprimidos sejam macerados, partidos, mastigados, cortados ou esmagados (ROCHE, 2022; SUN FARMACÊUTICA DO BRASIL, 2015), pois ao serem administrados de forma diferente das orientações contidas na bula, a segurança e eficácia da droga não pode ser estabelecida, tornando-se um uso *off-label*.

### 1.3.3 Uso *off-label* de medicamentos

Sabe-se que a alteração da forma farmacêutica pode acarretar em mudanças na farmacocinética e efeitos farmacológicos da droga, como perda do princípio ativo e eficácia do medicamento (ZAID; ABDALLAH; ZYOUN, 2019). O uso *off-label* de um medicamento torna o prescritor e/ou quem administra a droga, responsável por qualquer dano que possa eventualmente ocorrer (DOWNEY; THAKERAR; KIRSA, 2015).

Ao ser aprovado por uma agência reguladora, um medicamento é autorizado para uso em, pelo menos, uma determinada indicação, no entanto isso não significa que seja(m) a(s) única(s) possível(is). Desta forma, o uso *off-label* é, por definição, não autorizado por uma agência reguladora, mas isso não implica que seja incorreto (ANVISA, 2005).

De acordo com Aniceto (2019), o uso *off-label* é atual e global e deve continuar a ser. O autor ainda o descreve como intencional, inevitável, não satisfatório, mas talvez necessário. Os obstáculos em se conduzir determinados estudos clínicos e o reposicionamento de fármacos, podem manter o uso *off-label* em vigência uma vez que a estratégia atua premeditando tal uso. No âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), o fator econômico parece desencadear o uso *off-label* corroborado por uma falsa sensação de legalidade e por uma lacuna regulatória criada inadvertidamente.

Estudos sobre a segurança e eficácia do uso dos comprimidos não íntegros de capecitabina são escassos e não há dados a respeito da estabilidade da droga em água, motivo este para que exista a recomendação de que a solução seja administrada logo após sua preparação (LAM, 2011). Portanto, para a realização de um tratamento adequado ao câncer de mama metastático, novos estudos são necessários para avaliar a estabilidade e eficácia de soluções orais preparadas a partir de comprimidos de capecitabina.

Neste contexto, o presente estudo pretende simular a preparação de solução a partir realizada atualmente em unidades hospitalares para a administração *off-label* a pacientes com impossibilidade de deglutição da forma farmacêutica disponível do medicamento, isto é, pela maceração dos comprimidos de capecitabina e sua

dissolução em água, levando em consideração que desde o preparo até a administração o tempo decorrido é variável e pode impactar negativamente.

Considerando que a capecitabina é um pró-fármaco amplamente utilizado na oncologia para muitos tipos de câncer, incluindo o câncer de mama metastático, pesquisas de terapias inovadoras que possam aprimorar o desenvolvimento de formulações deste antineoplásico podem contribuir de forma significativa para a terapêutica do câncer de pacientes atendidos no SUS ou na rede privada.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar a manutenção do princípio ativo e atividade citotóxica de preparação *off label* da capecitabina.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a quantidade de princípio ativo capecitabina na solução preparada a partir de comprimidos de capecitabina macerados, em diferentes tempos após a dissolução dos comprimidos em água;
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* de solução de capecitabina preparada a partir de comprimidos de capecitabina, em diferentes tempos após a dissolução dos comprimidos;
- Avaliar, nas linhagens de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231, a atividade da enzima timidina fosforilase, responsável pela conversão final de 5' DFUR, derivado do pró-fármaco capecitabina em sua forma farmacologicamente ativa 5-FU;
- Estabelecer se há um tempo máximo para a administração da solução de capecitabina após a dissolução dos comprimidos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 QUANTIFICAÇÃO DE CAPECITABINA EM COMPRIMIDOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ULTRA RÁPIDA (UFLC)

A quantificação de capecitabina foi realizada na Central Analítica da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – Campus Alegre, empregando-se a técnica de Cromatografia Líquida Ultra Rápida (UFLC) em equipamento da Shimadzu, constituído por módulo controlador CBM-20A, detector de ultravioleta SPD-20A no comprimento de onda de 239 nm, bomba quaternária, degaseificador DGU-20A5, injetor automático SIL-20AHT, com loop de 20 µL, forno para coluna CTO-10ASVP. As separações foram realizadas em coluna Phenomenex Gemini (octadecilsilano, 250 × 4,6 mm d.i., 5 µm, 110 Å), mantida a 24 °C e conectada à pré-coluna de mesma fase estacionária que a coluna principal. O software LC Solution foi utilizado para monitoramento e tratamento dos dados. Os solventes grau espectroscópico utilizados foram da Merck e água ultrapura foi obtida em sistema purificador Easypure II da Thermo Scientific. Para construção da curva de calibração, alíquotas do padrão de capecitabina (Sigma Aldrich) foram pesadas em balança analítica (Shimadzu, AUY220), transferidas para balões volumétricos e solubilizadas em água ultrapura visando a obtenção de soluções de 5, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL. Em seguida foram filtradas em microfiltro de seringa contendo membrana de teflon hidrofílico Unifil (0,22 µm de poro, 13 mm de d.i.) e transferidas para *vials* de vidro de 2 mL com tampa rosqueável e septo.

Para quantificação do fármaco nos comprimidos em diferentes tempos, amostras comerciais na concentração de 500 mg (Sun Pharma, Lote JKX0262A) foram inicialmente solubilizadas em água ultrapura (500 mL) e agitadas em banho ultrassônico (Sanders, Soniclean 6) por 5 minutos. Em seguida, alíquotas do sobrenadante foram convenientemente diluídas em água ultrapura e semelhantemente filtradas em membranas de teflon hidrofílico e transferidas para *vials*. A eluição das amostras ocorreu no modo isocrático, utilizando-se a mistura metanol e água, na proporção 60:40, v/v, ambos acidificados com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA), na vazão de 1 mL/min (Lalitha et al., 2020). O volume de injeção foi de 10 µL. Cada concentração foi analisada em triplicata para a construção da curva



de calibração, relacionando-se a média dos valores da área sob a curva (ASC) obtida com as concentrações de capecitabina utilizadas. Também foram determinados os coeficientes de variação para cada concentração testada. Para análise da perda do princípio ativo nas soluções preparadas das amostras comerciais, foram realizadas 5 replicatas em dias diferentes, sendo que em cada ensaio as injeções da amostra ocorreram nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 e 360 minutos após a preparação dos comprimidos para análise por UFLC. O tempo máximo avaliado pelo ensaio foi de 360 minutos (6 horas). As condições cromatográficas estão dispostas na tabela 1.

Tabela 1. Condições cromatográficas para UFLC-UV.

| Parâmetro                    | Resultado                                                            |
|------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| <b>Coluna</b>                | Phenomenex Gemini (octadecilsilano, 250 × 4,6 mm d. i., 5 µm, 110 Å) |
| <b>Fase móvel</b>            | Metanol:água, 6:4, v/v                                               |
| <b>Detector</b>              | Ultravioleta                                                         |
| <b>Comprimento de onda</b>   | 239 nm                                                               |
| <b>Quociente de vazão</b>    | 1 mL/min                                                             |
| <b>Temperatura da coluna</b> | 24 °C                                                                |
| <b>Volume de injeção</b>     | 10 µL                                                                |

### 3.2 TESTES DE EFICÁCIA SOLUÇÃO PREPARADA DE CAPECITABINA EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA

O preparo da solução de capecitabina a partir do comprimido foi realizado na farmácia de manipulação de quimioterápicos do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes – HUCAM-UFES/EBSERH, de acordo com o Manual Boas Práticas de Manipulação de Antineoplásicos da Rede EBSERH (EBSERH, 2021), da seguinte forma:

Um comprimido de capecitabina 500 mg (Sun Pharma) foi macerado utilizando-se gral e pistilo em uma Cabine de Segurança Biológica Classe II B2. Em seguida, de um frasco, previamente esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121 °C e 1 ATM, contendo 500 mL de água ultrapura (Mili-q®) obtida do sistema de ultrapurificação de água Simplicity® da marca Merck Millipore localizado no Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), verteu-se uma porção de 50 mL ao gral para dissolução do pó obtido pela maceração do comprimido. Logo em seguida, essa solução inicial do gral foi vertida a um tubo falcon de 50 mL. A solução foi agitada em um agitador tipo vortex AP59 da marca Phoenix-Luferco durante 2 minutos, homogeneizando a solução no tubo falcon, até a completa dissolução, confirmada por minuciosa inspeção visual.

### **3.2.1 Linhagens celulares**

Neste trabalho foram utilizadas duas linhagens celulares de câncer de mama, MDA-MB-231 e MCF-7. A linhagem de câncer de mama triplo negativo MDA-MB-231, adquirida comercialmente do Banco de Células do Rio de Janeiro, foi estabelecida a partir de uma efusão pleural de uma paciente caucasiana de 51 anos, com tumor mamário em metástase. Classificada como uma linhagem de câncer de mama triplo negativo, altamente agressivo e invasivo, não expressa RE (receptor de estrógeno), RP (receptor de progesterona), além de se caracterizar pela ausência de expressão e amplificação de HER-2 (CAILLEAU et al., 1974). Estes marcadores desempenham um papel crucial na prática clínica, uma vez que representam alvos terapêuticos significativos e fornecem informações valiosas sobre a agressividade do câncer de mama. Cânceres de mama triplo-negativos são notórios por sua alta agressividade (SILVA, 2020).

A linhagem MCF-7 utilizada no estudo foi cedida pelo Laboratório de Divisão de Pesquisa Clínica e Desenvolvimento Tecnológico do INCA, e isolada a partir de uma paciente caucasiana de 69 anos com adenocarcinoma de mama. Classificada como luminal A, é positiva para expressão dos receptores hormonais (RE e RP), negativa para HER-2, sendo considerada uma linhagem celular pouco agressiva e não invasiva (COMŞA; CÎMPEAN; RAICA, 2015).

### 3.2.2 Cultivo e manutenção celular

A linhagem MCF-7 foi mantida em meio de cultura DMEM *High Glucose* (4500.0 mg/L, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), enquanto a linhagem MDA-MB-231 foi mantida em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA). Ambos os meios de cultura foram suplementados com a adição de 10% v/v de soro fetal bovino (SFB) (CRIPION, Andradina, SP, Brasil), 1% (v/v) de solução Penicilina-Estreptomicina (10000 u/mL - 10 mg/mL) e 0.5% (v/v) de Anfotericina B (250 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

O cultivo das células ocorreu em garrafas de 75 cm<sup>2</sup>, sendo a ambientação do mesmo em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, com uma frequência de passagens e troca de meio de duas a três vezes por semana, após ser realizada análise morfológica das células realizada em microscópio óptico de luz invertida (Axio Observer Z1, Carl Zeiss, Jena, TH, Alemanha), para avaliação do crescimento celular e verificar a subconfluência das células.

Para as passagens, o meio de cultura foi removido e descartado. Em seguida, foi adicionada a solução-tampão de PBS para lavar a camada celular a fim de remover o soro fetal bovino (SFB) remanescente, o qual possui inibidor de tripsina. Utilizou-se do processo de dissociação enzimática com solução de tripsina (0.25% tripsina/0.53mM EDTA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), para o desprendimento das células da garrafa adicionou-se de 2,0 a 3,0 mL de solução de tripsina até que a camada celular fosse desprendida do fundo do frasco, o que normalmente ocorre em torno de 5 minutos em temperatura ambiente. Por fim, adicionou-se meio de cultura suplementado, conforme descrito anteriormente.

Foi retirada uma alíquota da suspensão celular resultante para contagem do número total de células viáveis em câmara de Neubauer. Foi utilizado o corante azul de tripan 0.4% (v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para a distinção entre células viáveis e não viáveis.

Por fim, após a contagem e realização dos cálculos da concentração celular necessária para os experimentos, o volume adequado da suspensão de células foi transferido para um novo tubo tipo falcon. Meio de cultura fresco foi então adicionado

para alcançar a concentração de células/ml ideal calculada para os ensaios. Deste modo a suspensão de células foi utilizada para os ensaios de Viabilidade Celular Metabólica (VCM).

### **3.2.3 Avaliação de eficácia *in vitro* de solução de capecitabina: ensaios de viabilidade celular metabólica (VCM) por MTT**

As células das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 foram plaqueadas na densidade de  $5 \times 10^4$  células/mL, em placas de 96 poços estéreis e incubadas por 24 horas a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> para permitir adesão das células à superfície da mesma. Feito isso, realizou-se o tratamento das células com a solução de capecitabina a 1000 µg/mL. Essa concentração foi selecionada a partir de estudos similares anteriormente descritos por Miwa e colaboradores (1998) e Akbari e Javar (2013). A solução foi preparada conforme mencionado no item 3.2 e diluída para a obtenção da concentração a ser usada para tratamento.

As células foram tratadas após diferentes tempos do preparo da solução: 45 minutos, 60 minutos, 90 minutos e 120 minutos, contados após a completa dissolução do comprimido. Em todas as placas, poços apenas com células e meio de cultura foram utilizados como controle não tratado (NT) para posteriores comparações. Adicionalmente, quatro poços não receberam células ou tratamento, apenas meio de cultura e a solução de MTT, sendo empregados como branco para calibração do leitor de placas.

A incubação das placas ocorreu durante 48 e 72 horas a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, adicionou-se o reagente MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]) a 5 mg/mL em cada poço e a placa foi incubada por adicionais 3 horas a 37°C também em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, retirou-se a solução dos poços e foi adicionado o reagente DMSO P.A. para solubilização dos cristais de formazan.

As placas foram levadas ao espectrofotômetro de microplacas BioTek Epoch 2 onde a absorbância das amostras foi medida em 540 nm. O ensaio de MTT foi realizado em triplicata para cada linhagem celular, utilizando-se a solução preparada de

capecitabina sempre na mesma concentração (1000 µg/mL). Os resultados foram expressos em porcentagem de células metabolicamente viáveis, quando comparadas ao controle não tratado, no mesmo período de incubação.

#### **3.2.4 Determinação da atividade da timidina fosforilase (TP) nas linhagens de mama**

Esta etapa do estudo foi realizada nos laboratórios de Cultivo Celular e de Análises Clínicas do curso de Farmácia do Centro de Ciências Exatas Naturais e da Saúde da UFES (CCENS-UFES) – Campus Alegre – ES. As células das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231, mantidas em cultura conforme o subitem 3.1.3, foram utilizadas em suspensão para preparo das amostras. As células foram homogeneizadas em *vials* com 100 µL de um tampão de lise contendo 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 100 µg/ml *fenilmetilsulfonylfluoride* (PMSF), 1 µg/mL de aprotinina e 1% Triton X-100, mantendo os *vials* em gelo. Os lisados foram centrifugados a 20.000 g por 30 minutos a 4°C em centrífuga refrigerada SOLAB SL-703. Obteve-se amostras em triplicata de cada linhagem celular (MCF-7 e MDA-MB-231).

A concentração total de proteínas, presentes no sobrenadante do lisado celular de ambas as linhagens foi determinada pelo método de Bradford (1976). A curva de calibração foi realizada utilizando albumina de soro bovino (BSA) nas seguintes concentrações: 0,005 mg/mL, 0,01 mg/mL, 0,015 mg/mL, 0,02 mg/mL, e 0,025 mg/mL. Todos os pontos da curva e de amostras das proteínas foram analisados em triplicata, procedendo as leituras em espectrofotômetro Multiskan Sky Touchscr da Termo Fisher Scientific, a 595 nm. Os pontos da curva de calibração foram plotadas em um gráfico gerando uma função linear utilizando o software Microsoft Excel®, com a equação da reta e o valor de  $R^2$ . A partir da equação da reta e da leitura das amostras, procedeu-se o cálculo das concentrações de proteínas das amostras.

A atividade enzimática foi avaliada como descrito por Yoshimura et al. (1990), com pequenas modificações. Utilizou-se 50 µL de sobrenadante obtido na lise celular e foram adicionados a 150 µL de uma solução composta por 10 mM de timidina, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 8.4), e depois incubada a 37°C por 4 horas. A reação foi interrompida

pela adição de 800  $\mu$ L de 0,2 N de NaOH. A absorbância a 300 nm foi determinada e a quantidade de timina na mistura de reação foi calculada utilizando-se uma curva de calibração. Todos os pontos da curva e amostras das proteínas foram analisados em triplicata, em espectrofotômetro Multiskan Sky Touchscr da Termo Fisher Scientific. A atividade TP foi expressa como nmol de timina formada por mg de proteína por hora.

### 3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas dos resultados dos ensaios de quantificação de capecitabina por UFLC e do VCM através do MTT foram realizadas pelo teste estatístico paramétrico ANOVA One-way, com pós teste multiparamétrico de Tukey, no software Graphpad Prism 8.0.1. Os resultados dos parâmetros analisados foram expressos de forma gráfica e apresentados como média e desvio padrão. Considerou-se estatisticamente significantes as diferenças em que  $p < 0,05$ . A concentração inibitória média (IC50) também foi calculada no software Graphpad Prism 8.0.1.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (UFLC) PARA QUANTIFICAÇÃO DE CAPECITABINA NAS SOLUÇÕES OBTIDAS POR DISSOLUÇÃO DOS COMPRIMIDOS EM ÁGUA

Nesta etapa do estudo, com o objetivo de avaliar a quantidade de princípio ativo capecitabina nas soluções preparadas a partir de amostras comerciais, optou-se pelo uso de metodologia validada e disponível na literatura que empregasse a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, por se tratar de um equipamento disponível no grupo de pesquisas. Um método analítico é considerado validado quando pode-se comprovar que o mesmo possui eficácia para a finalidade a qual foi desenvolvido, sendo muito aplicado à etapa de Boas Práticas de Fabricação de medicamentos, mais especificamente no controle de qualidade. A validação de um método analítico ocorre através de estudos experimentais, pelos quais são avaliados os critérios estabelecidos como especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez; a avaliação desses critérios irão assegurar a confiabilidade a um método analítico (NASCIMENTO et al., 2015).

O Método precisa ser específico, em outras palavras, através dele deve ser possível discriminar o analito pretendido dos outros componentes da amostra, como impurezas, degradantes ou excipientes (BHATIA et al., 2017; LALITHA; RAVEENDRA REDDY; DEVANNA, 2020).

A padronização da técnica de UFLC para quantificação de capecitabina nas soluções obtidas por dissolução do comprimido objetivou demonstrar se o procedimento analítico é adequado para o uso pretendido neste estudo. O Método precisa ser específico, em outras palavras, através dele deve ser possível discriminar o analito pretendido dos outros componentes da amostra, como impurezas, degradantes ou excipientes (BHATIA et al., 2017; LALITHA; RAVEENDRA REDDY; DEVANNA, 2020).

O método UFLC já foi utilizado em outros estudos para a determinação da concentração de capecitabina em amostras a partir de comprimidos dissolvidos (BHATIA et al., 2017; LALITHA; RAVEENDRA REDDY; DEVANNA, 2020;

MEULENAAR et al., 2013) e em amostras de plasma (BUDMAN et al., 1998; DEENEN et al., 2013; FARKOUH et al., 2010). Em todos eles, o UFLC mostrou-se um método adequado com eficiência comprovada para determinação de concentração do pró fármaco capecitabina em diversas amostras.

As análises cromatográficas preliminares deste estudo demonstraram resultados adequados frente aos recursos materiais disponíveis na central analítica do campus da UFES de Alegre - ES, empregando-se as condições descritas por Lalitha; Raveendra Reddy; Devanna (2020). Na figura 7, observa-se o cromatograma representativo do produto comercial, no qual o fármaco foi detectado com tempo de retenção de 6,2 minutos e livre de interferentes, o que permitiu a seleção do método UFLC apresentado. Este resultado corrobora com os estudos de Lalitha; Raveendra Reddy; Devanna (2020), Bhatia et al., (2017) e Farkouh et al., (2010) que identificaram tempo de retenção de 6,97 minutos, 6,4 minutos e 6,223 minutos, respectivamente.

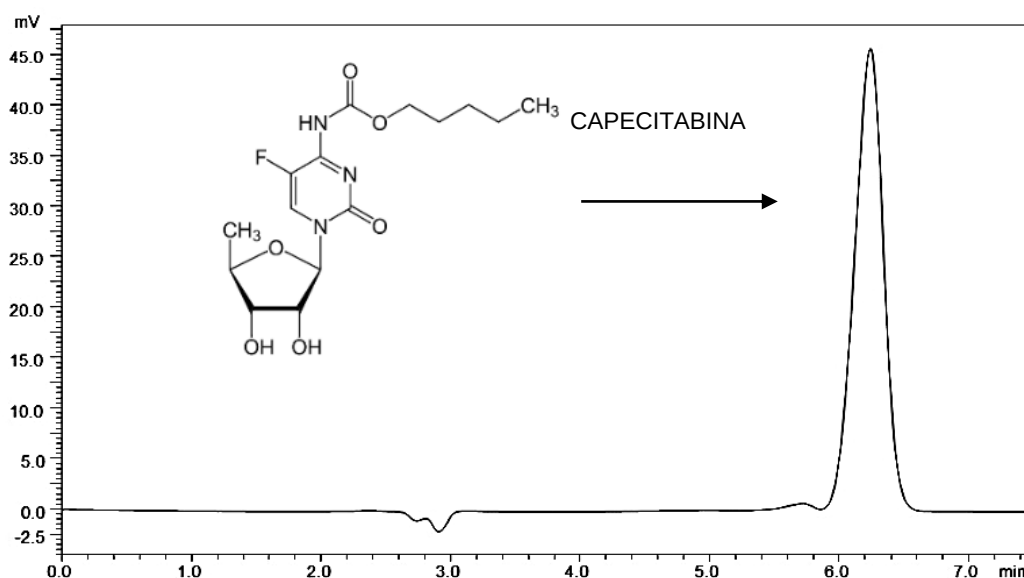


Figura 7. Perfil cromatográfico representativo do medicamento por UFLC.

A partir da solução estoque foram preparadas soluções padrão de concentração de 5, 10, 20, 30, 40, 50 µg/mL, conforme tabela 2. A análise dessas soluções foi realizada utilizando condições cromatográficas, especificadas na tabela 1 do item materiais e métodos deste estudo.



Tabela 2. Concentrações para curva de calibração para quantificação de capecitabina por UFLC.

| Concentração do padrão<br>Capecitabina (µg/mL) | Concentração Média <sup>a</sup><br>(µg/mL) | DP <sup>1</sup> | DPR <sup>2</sup> (%) |
|------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------|----------------------|
| 5                                              | 5,4                                        | 0,03            | 0,58                 |
| 10                                             | 10,2                                       | 0,02            | 0,22                 |
| 20                                             | 19,9                                       | 0,03            | 0,13                 |
| 30                                             | 29,5                                       | 0,04            | 0,14                 |
| 40                                             | 38,7                                       | 0,02            | 0,06                 |
| 50                                             | 51,3                                       | 0,08            | 0,16                 |

<sup>a</sup>n = 3/conc. n = 18 total; <sup>1</sup>DP= desvio padrão; <sup>2</sup>DPR= desvio padrão relativo, dado por: (DP/concentração média) x 100.

Os valores obtidos foram plotados em gráfico de dispersão linear (Figura 8), sendo calculada a equação da reta onde o eixo x corresponde à concentração (em µg/mL) e o eixo y corresponde área do sinal analítico a 239 nm a partir das diferentes concentrações, expressas como a área sobre a curva (ASC) dos picos.

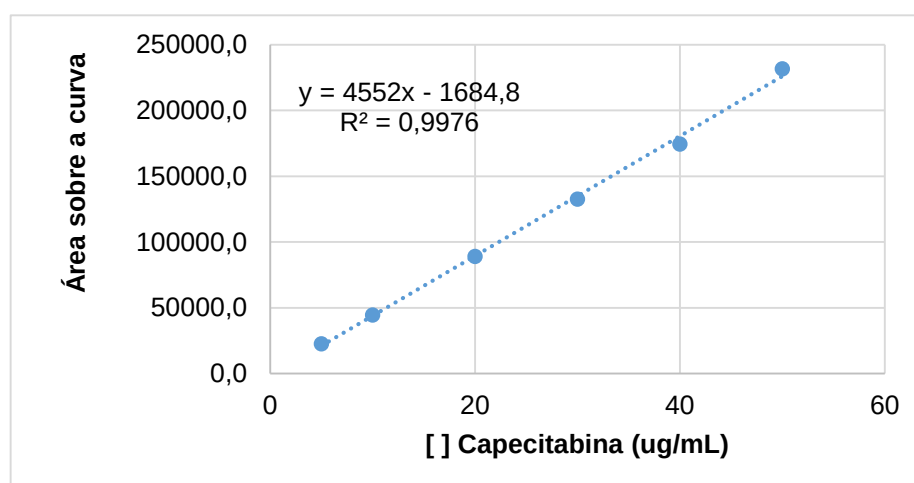


Figura 8. Curva de calibração da solução estoque padrão de capecitabina no comprimento de onda de 239 nm;  $R^2$  = coeficiente de correlação linear.

A curva de calibração apresentou valor do coeficiente de correlação  $R^2 = 0,9976$ , demonstrando a existência de correlação linear entre as concentrações e a área sob a curva, na faixa de 5,0 a 50,0 µg/mL. A equação da reta foi  $y = 4552x - 1684,8$ , onde

o valor associado à variável  $x$  corresponde à inclinação da reta (4552) e 1684,8 ao intercepto da reta com o eixo das ordenadas.

De acordo com a RDC 166/2017 (ANVISA, 2017), os resultados mostram que houve linearidade, pois o valor do desvio padrão relativo (DPR) está abaixo de 5%, conforme a tabela 2.

Ad et al. (2011) também conduziu um estudo similar desenvolvendo um método rápido para determinação da concentração de capecitabina pura e a partir de comprimidos pela metodologia de HPLC. Seus resultados demonstraram ser um método simples e preciso, tendo sido validado de acordo com as diretrizes do *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH).

Os resultados dos ensaios analíticos para análise da perda do princípio ativo nas soluções preparadas a partir da dissolução dos comprimidos de capecitabina estão descritos na tabela 3. Em todas as replicatas, as concentrações de capecitabina foram determinadas em cada tempo de injeção de amostra, a partir da ASC e dos dados da curva padrão. Na tabela 3 ainda estão dispostos, além da concentração média ( $\mu\text{g/mL}$ ) para cada tempo analisado, o desvio padrão e o desvio padrão relativo.

Tabela 3. Quantificação de capecitabina por UFLC em função do tempo após o preparo da solução a partir dos comprimidos macerados e dissolvidos em água

| Tempo (min) | Concentração média <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ ) | DP <sup>1</sup> | DPR <sup>2</sup> (%) |
|-------------|------------------------------------------------------|-----------------|----------------------|
| 0           | 42,1                                                 | 3,04            | 7,23                 |
| 15          | 42,1                                                 | 3,03            | 7,20                 |
| 30          | 42,0                                                 | 2,96            | 7,03                 |
| 45          | 42,2                                                 | 2,92            | 6,91                 |
| 60          | 42,2                                                 | 2,96            | 7,00                 |
| 90          | 42,2                                                 | 2,92            | 6,92                 |
| 120         | 42,2                                                 | 2,98            | 7,06                 |
| 150         | 42,3                                                 | 3,02            | 7,15                 |
| 180         | 42,3                                                 | 2,92            | 6,90                 |
| 210         | 42,3                                                 | 3,01            | 7,12                 |
| 240         | 42,3                                                 | 2,94            | 6,95                 |
| 270         | 42,3                                                 | 2,83            | 6,68                 |
| 300         | 42,3                                                 | 3,00            | 7,09                 |
| 330         | 42,2                                                 | 2,92            | 6,90                 |
| 360         | 42,4                                                 | 2,84            | 6,71                 |

<sup>a</sup>n = 5/conc. n= 75 total; <sup>1</sup>DP = desvio padrão; <sup>2</sup>DPR = desvio padrão relativo, dado por: (DP/concentração média) x 100.

A partir da análise realizada, após 360 minutos mantendo-se amostra a 24 °C, observou-se que não houve diminuição da concentração de princípio ativo de capecitabina nas soluções preparadas a partir da dissolução dos comprimidos, que poderia significar perda de princípio ativo do pró-fármaco. A figura 9 expressa a análise estatística dos resultados encontrados, onde não se observam diferenças significativas entre as concentrações médias de capecitabina em função do tempo ( $p>0,05$ ).

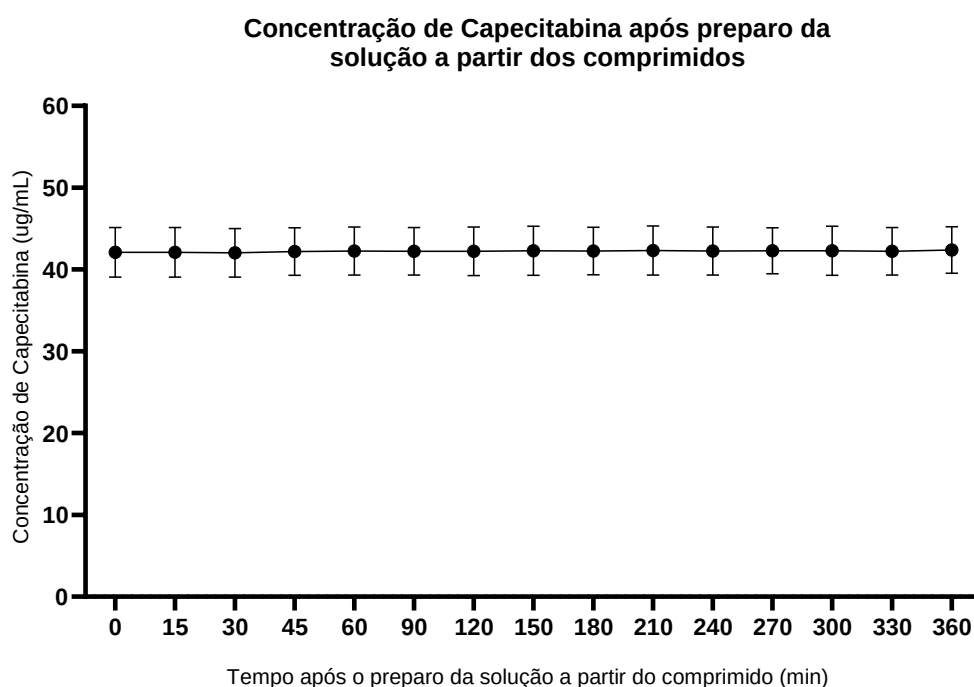


Figura 9 – Análise da concentração do princípio ativo Capecitabina em soluções a partir do comprimido macerado e dissolvido em água, analisadas por UFLC. Cada ensaio teve duração máxima de 360 minutos. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão de (5) experimentos independentes. Os dados foram analisados pelo teste estatístico paramétrico ANOVA One-Way, no software Graphpad Prism 8.0.1. Não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações médias de capecitabina em função do tempo.

Um estudo avaliou a estabilidade da capecitabina em metanol e observou que há estabilidade do composto em temperatura ambiente por até 24 horas, 17 dias em refrigerador  $\leq 12$  °C e por até 20 dias congelada a  $\leq -6$  °C. Neste estudo todos os intervalos de confiança para a estabilidade média nas condições de armazenamento estudadas ficaram dentro do critério de aceitação de 90 – 110% (PIÓRKOWSKA et al., 2014). Tirumalasetty; Ramchandran (2021), em seu estudo também observaram estabilidade da capecitabina e docetaxel por 24 horas, refrigerados de 2 a 8 °C. Ambos achados corroboram com os resultados de manutenção da concentração de princípio

ativo observados nas análises por UFLC deste estudo, pois seus resultados sugerem estabilidade do princípio ativo de capecitabina por tempo superior ao período aqui analisado de 360 minutos (6 horas), em temperatura ambiente.

A partir destes resultados, pode-se inferir que a administração *off label* da solução estudada não impacta na quantidade de princípio ativo ofertado pelo tratamento com o pró-fármaco dissolvido em água ultrapura até a administração, pelo tempo de 6 horas contadas a partir da dissolução do comprimido. Contudo, não foi possível determinar neste estudo se há diminuição no princípio ativo no período compreendido a partir da administração até a absorção intestinal da solução preparada, pois trata-se de uma etapa que não foi testada neste estudo e pode influenciar na quantidade do princípio ativo que chega até o intestino para ser absorvido durante o tratamento, a depender de possíveis interações entre a solução e caminho percorrido pela mesma no trato gastrointestinal até sua chegada ao intestino.

#### 4.2 AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA *IN VITRO* DE SOLUÇÃO DE CAPECITABINA: ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR METABÓLICA (VCM) POR ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR COM REAGENTE MTT

Ensaio de Viabilidade Celular Metabólica (VCM), mais especificamente o Ensaio de Proliferação Celular com Reagente MTT (MTT), são frequentemente utilizados em estudos para medir a taxa de proliferação celular e, de forma inversa, quando eventos metabólicos levam à apoptose ou necrose, a redução na viabilidade celular (AKBARI; JAVAR, 2013).

Neste estudo, utilizou-se o ensaio de MTT para analisar a VCM de linhagens de câncer de mama com o objetivo de avaliar a eficácia da solução de capecitabina preparada a partir de comprimidos de capecitabina, testada no ensaio após vários tempos após a dissolução dos comprimidos (45, 60, 90 e 120 minutos após a dissolução).

O nível de citotoxicidade da capecitabina foi analisado com o intuito de avaliar se houve perda da eficácia do pró fármaco em função do tempo decorrido após diluição do medicamento. Para tanto, tratou-se as células com solução de capecitabina por 48 e 72 horas, partindo-se de solução de capecitabina que estava preparada 45, 60, 90

e 120 minutos contados a partir da dissolução dos comprimidos. Os Ensaios de Viabilidade Celular Metabólica (VCM) foram realizados nas duas linhagens (MCF-7 e MDA-MB-231), em 48 e 72 horas de incubação após o tratamento. Para o controle da viabilidade celular utilizou-se o corante supravital Azul de Tripan, feito antes dos plaqueamentos, onde foi observado que mais de 95% das células eram viáveis em ambas linhagens.

Na linhagem MCF-7, os tratamentos com a solução de capecitabina preparada a partir dos comprimidos, a 1000 µg/mL por 48 e 72 horas, causaram significativa redução da VCM partindo-se de soluções em que transcorreram, respectivamente, 45, 60, 90 e 120 minutos após a dissolução do comprimido, representando diferenças significativas após a análise estatística ( $p < 0.0001$ ), conforme figura 9. A maior redução da VCM foi observada em 72 horas de tratamento, para  $0,58 \pm 0,21\%$ . Além disso, observou-se que, mesmo após passados 120 minutos da dissolução do comprimido de capecitabina, seu efeito citotóxico permanece, visto que foi observada a diminuição da VCM na linhagem tratada até pelo menos 120 minutos, que foi o máximo de tempo pós dissolução analisado. Do ponto de vista prático, seria possível sugerir, a partir dos resultados encontrados até aqui, que a capecitabina pode ser administrada, após sua dissolução em água por um período de até 120 minutos, por ter sido demonstrado em fase experimental que no período considerado não se observou perda de princípio ativo e manutenção do efeito citotóxico na linhagem MCF-7.

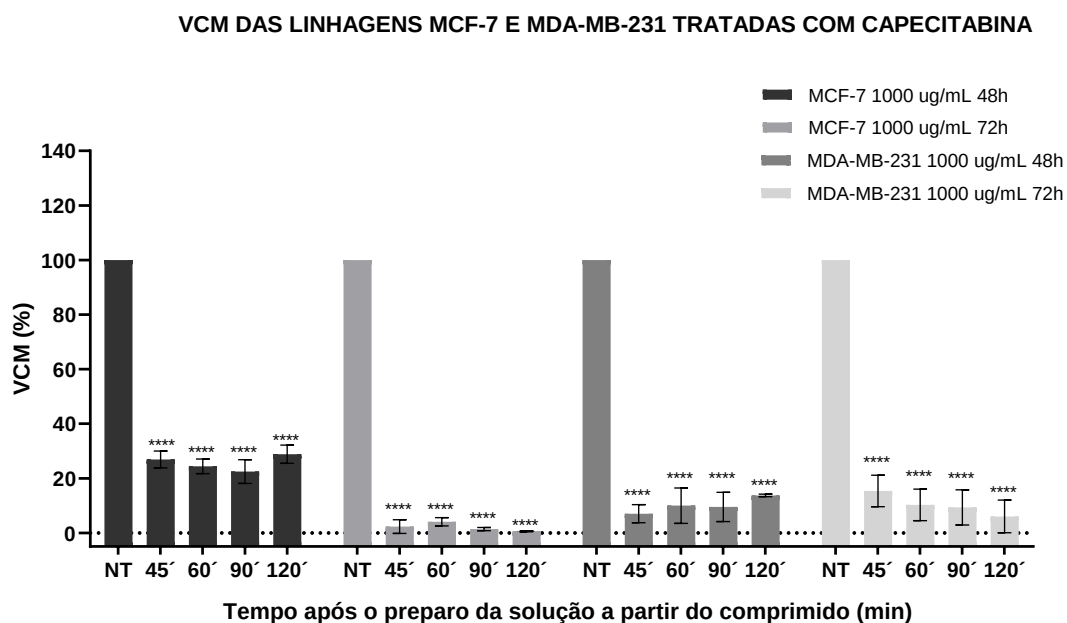


Figura 10 – Viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 determinada por ensaio de MTT, após tratamento com solução de capecitabina a 1000 µg/mL por 48 e 72 horas. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. Os dados foram analisados pelo teste estatístico paramétrico ANOVA de uma via, com pós teste de Tukey, no software Graphpad Prism 8.0.1. \*\*\*\* $p < 0.0001$  em todos os tempos vs não tratadas (NT).

Quanto à linhagem celular MDA-MB-231, os resultados obtidos também demonstram que os tratamentos com a solução de capecitabina preparada a partir dos comprimidos, a 1000 µg/mL após 48 e 72 horas de tratamento, causaram significativa redução na viabilidade celular em 45, 60, 90 e 120 minutos após a dissolução do comprimido, representando diferenças significativas após a análise estatística ( $p < 0.0001$ ), conforme figura 9. A maior redução da VCM foi observada em 72 horas de tratamento, para  $6 \pm 6\%$ . Da mesma forma que nos ensaios com a linhagem MCF-7, observou-se que, mesmo após passados 120 minutos da dissolução do comprimido de capecitabina, seu efeito citotóxico permanece, visto que foi observada a diminuição da VCM também na linhagem MDA-MB-231 até pelo menos 120 minutos, que foi o máximo de tempo pós dissolução analisado. Do ponto de vista prático, seria possível sugerir, a partir dos resultados encontrados até aqui, que a capecitabina pode ser administrada, após sua dissolução em água por um período de até 120 minutos, por ter sido demonstrado em fase experimental que no período considerado não se observou perda de princípio ativo e manutenção do efeito citotóxico na linhagem MDA-MB-231.

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, tanto na linhagem MCF-7 quanto na linhagem MDA-MB-231, observou-se que não houve perda da eficácia em preparo de capecitabina em solução na forma líquida na concentração de 1000 µg/mL, ao menos até o tratamento decorridos 120 minutos após dissolução do comprimido, pois observou-se diferença significativa entre a VCM (%) das células tratadas em relação às células não tratadas após análise estatística.

Foi possível calcular a concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>) de capecitabina em ambas linhagens analisadas neste estudo. A linhagem celular MCF-7 apresentou IC<sub>50</sub> de 343,3 µg/mL e 31,9 µg/mL em 48 e 72 horas, respectivamente. Já a linhagem MDA-MB-231 apresentou IC<sub>50</sub> de 113,8 µg/mL e 118 µg/mL após 48 e 72 horas, respectivamente.

Miwa e colaboradores (1998) também testaram a eficácia da capecitabina em linhagens de células de câncer, entre elas destacam-se as linhagens de câncer de mama ZR-75-1, MX-1 e MCF-7, sendo que a última também foi utilizada também neste estudo. Demonstraram que a capecitabina apresentou efeito citotóxico nas linhagens de câncer estudadas através de ensaios de MTT apenas em concentrações similares à concentração aqui testada, apresentando resultados de IC<sub>50</sub> superior a 1 mM (359,35 µg/mL).

Akbari e Javar (2013) testaram também a capecitabina em linhagem MCF-7 em tempos de tratamento de 24, 48 e 72 horas, nas concentrações 1600, 1400, 1200, 1000, 800, 600, 400 µg/mL. Os autores concluíram que, devido à baixa potência da capecitabina em relação aos seus metabólitos e ao 5-FluoroUracil, foi possível obter resultados de diminuição da viabilidade celular pelo ensaio de MTT, somente após 48 e 72 horas do tratamento. Eles observaram que em 48 horas de tratamento da linhagem celular MCF-7 com capecitabina na concentração de 1147,9 µg/mL, 50% das células foram inibidas; e após 72 horas de tratamento das células com capecitabina, na concentração de 921 µg/mL, 50% das células foram inibidas. Este estudo demonstrou ainda que o IC<sub>50</sub> do 5-FU foi comparativamente menor que o IC<sub>50</sub> da capecitabina.

Em outro estudo Çakir e Eroglu (2021) também testaram capecitabina em linhagem celular de câncer de mama 4T1 com tratamento por 48 horas nas concentrações 800 µM (287.480 µg/mL), 900 µM (323.415 µg/mL), 1000 µM (359.350 µg/mL), 1200 µM

(431.220 µg/mL), 1400 µM (503.090 µg/mL), 1600 µM (575.960 µg/mL), 1700 µM (610.895 µg/mL), 1800 µM (646.830 µg/mL), e 2000 µM (718.700 µg/mL). Os autores observaram resultados de diminuição da viabilidade celular pelo ensaio de MTT, sendo o valor de IC<sub>50</sub> igual à 1700 µM (610.895 µg/mL) para capecitabina. No mesmo estudo, os autores realizaram o teste viabilidade celular utilizando-se o corante supravital Azul de Tripán em células tratadas com capecitabina por 24, 48, 72 e 96 horas. Foi observada uma redução substancial na proliferação celular, apresentando queda nas taxas de viabilidade celular, com aumento do efeito citotóxico em 24%, 45,2%, 69,1% e 86,6% por 24, 48, 72 e 96 horas, respectivamente, em comparação ao grupo controle.

A partir da análise dos resultados preliminares deste estudo comparados aos estudos de Akbari e Javar (2013), Çakir e Eroglu (2021) e Miwa e colaboradores (1998), observa-se que a concentração de capecitabina (1000 µg/mL) utilizada para o tratamento das linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231, está adequada ao ensaio proposto, e corrobora com outros trabalhos similares descritos na literatura, permitindo a avaliação quanto à eficácia do tratamento, sem que haja perda do princípio ativo após o uso *off-label* dos comprimidos de capecitabina, compreendendo sua maceração e dissolução em água, mimetizando um procedimento feito para alguns pacientes e sobre o qual a literatura carece de informações que respaldem tal procedimento.

Contudo, similarmente à etapa anterior da determinação da concentração do princípio ativo de capecitabina por UFLC, não foi possível determinar neste estudo se há diminuição do efeito citotóxico no período compreendido a partir da administração até a absorção intestinal da solução preparada, pois trata-se de uma etapa que não foi testada neste estudo e pode influenciar na quantidade do princípio ativo que chega até o intestino para ser absorvido durante o tratamento, a depender de possíveis interações entre a solução e caminho percorrido pela mesma no trato gastrointestinal até sua chegada ao intestino.

#### 4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA TIMIDINA FOSFORILASE NAS LINHAGENS DE MAMA



Os testes de atividade enzimática são realizados com o objetivo de detectar a presença ou quantificar a quantidade de uma enzima específica em um organismo, tecido ou amostra. Ainda que a literatura contemple inúmeros ensaios enzimáticos já descritos, é essencial adaptar esses procedimentos às características específicas da enzima sob investigação. A atividade específica de uma enzima é influenciada por fatores como pH, temperatura, força iônica e concentração de todos os componentes no ensaio (MERCK, 2023).

A TP é um importante alvo molecular com utilidade em potencial no tratamento de câncer. Principalmente devido ao fato de ser encontrada em níveis elevados em tumores sólidos, além de desempenhar um papel importante na promoção da angiogênese (DEVES, 2013), além de já ter sido relatado que sua atividade aumenta em diversos tipos de tumor malignos em humanos (YOSHIMURA et al., 1990).

Para o cálculo da atividade enzimática da TP, elaborou-se a curva de calibração utilizando cinco amostras com concentrações conhecidas do substrato timidina: 0.3 mM, 0.171 mM, 0.097 mM, 0.055 mM e 0.03 mM. Para cada concentração de timidina, obteve-se a leitura das absorbâncias a 595 nm. As concentrações de timidina utilizadas e as médias das absorbâncias obtidas no ensaio analítico para elaboração da curva de calibração estão dispostos na tabela 4.

Tabela 4. Concentrações do substrato timidina e média das absorbâncias para elaboração da curva de calibração do ensaio de atividade enzimática

| <b>Concentração de Timidina (mM)</b> | <b>Média das absorbâncias a 595 nm</b> |
|--------------------------------------|----------------------------------------|
| 0,03                                 | 0,55                                   |
| 0,05                                 | 0,63                                   |
| 0,10                                 | 0,78                                   |
| 0,17                                 | 1,05                                   |
| 0,30                                 | 1,44                                   |

Os valores obtidos foram plotados em gráfico de dispersão linear (Figura 14), obtendo-se a equação da reta onde o eixo y corresponde às concentrações da TP e o eixo x corresponde às médias das absorbâncias a 595nm.

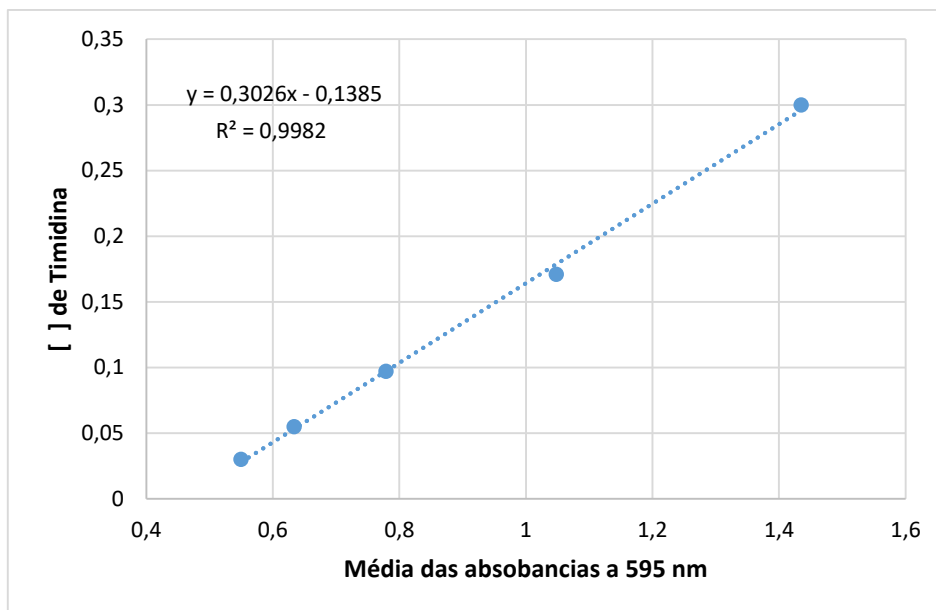


Figura 11. Curva de calibração da solução padrão de timidina no comprimento de onda de 595 nm;  $R^2$  = coeficiente de correlação linear.

A curva de calibração apresentou valor do coeficiente de correlação  $R^2 = 0,9982$ , demonstrando a existência de correlação linear entre as concentrações. A equação da reta foi  $y = 0,3026x + 0,1385$ .

A partir da curva padrão, procedeu-se a análise para determinação da atividade da enzima TP nas amostras dos lisados celulares. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados para ambas linhagens analisadas estão dispostos na tabela 5.

Tabela 5. Determinação da atividade da enzima Timidina fosforilase nos lisados celulares MCF-7 E MDA-MB-231

| Linhagem celular | ( $\mu\text{mol/L}$ de substrato por $\text{ng/L}$ de proteína / hora) |
|------------------|------------------------------------------------------------------------|
| MCF-7            | 1,43                                                                   |
| MDA-MB-231       | 1,81                                                                   |

Os resultados apresentados demonstram que, em relação à linhagem MCF-7, a linhagem MDA-MB-231 apresenta maior atividade enzimática de TP. Resultados similares já foram descritos anteriormente, indicando maior atividade de TP em células MDA-MB-231 que em MCF-7 (ISHIKAWA et al., 1998). Toi et al. (2004) relata em seu estudo que a TP demonstra ser uma enzima que contribui para a

sobrevivência celular, pois sabe-se que o *2-deoxy-D-ribose* (2-DDR), um metabólito da timidina pela ação da TP, induz neovascularização e contribui para a antiapoptose. Longley; et al (2003) considera que a alta expressão de TP pode indicar a presença de um fenótipo tumoral mais invasivo, agressivo e que pode ser menos sensível à quimioterapia. Sabendo disso, pode-se dizer que os resultados de concentração e atividade da TP nas linhagens analisadas neste trabalho parecem corroborar com essa hipótese, considerando que a linhagem MDA-MB-231 é tida como um fenótipo tumoral mais agressivo, invasivo e de pior prognóstico comparada a linhagem MCF-7.

Além disso, em muitos estudos anteriormente descritos, sabe-se que o pró-fármaco capecitabina é convertido em 5-FU através de, pelo menos, três etapas metabólicas após a absorção intestinal, a saber: iniciando pela ação das carboxilesterases hepáticas que convertem a capecitabina em 5'-DFCR, que por sua vez é convertido a 5'-DFUR pela citidina deaminase que está presente em altas concentrações no fígado, plasma e no tecido tumoral; e por fim 5'-DFUR é convertido no fármaco ativo 5-FU pela ação da timidina fosforilase, que é encontrada em quantidades maiores em tumores sólidos em comparação com tecidos adjacentes normais, e assim exercerá seu efeito citotóxico nas células cancerosas (BUDMAN et al., 1998; WALKO; LINDLEY, 2005).

No entanto, a partir dos resultados obtidos neste estudo, observa-se que a via metabólica para conversão da capecitabina a 5-FU possa não ser dependente, de forma exclusiva, da ação das carboxilesterases hepáticas, sugerindo que essas enzimas podem estar presentes também nas células tumorais, ou ainda que exista(m) outra(s) via(s) nas células tumorais capaz(es) de promover(em) a conversão da capecitabina em 5-FU, ou ainda, em outro(s) metabólito(s) da capecitabina que possua(m) efeito citotóxicos significativos nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. Dada a relevância do achado, o grupo pretende investigar mais esses mecanismos, que pode trazer novas informações ao que é classicamente apresentado na literatura.

Todos os resultados deste estudo possuem extrema relevância, norteados o uso seguro quanto a utilização da capecitabina em solução líquida preparada a partir de comprimidos macerados para o tratamento de câncer de mama, sugerindo que a manutenção do princípio ativo e do efeito citotóxico observado, sendo este último dependente da atividade enzimática da TP encontrada nas linhagens celulares

estudadas. Desta forma, os resultados representam uma nova perspectiva para o tratamento de pacientes com dificuldade de deglutição do pró-fármaco capecitabina bem como servirão como base para novos estudos para permitir um melhor entendimento do mecanismo de conversão da capecitabina a 5-FU através da cascata enzimática envolvida.

## 5 CONCLUSÕES

Está cada vez mais difundido o uso de Agentes Anticancerígenos Orais (OAAs) no tratamento de muitos tipos de câncer, devido a sua eficácia significativa no tratamento de alguns tipos de câncer, sendo preferidos pelos pacientes em relação a quimioterapia intravenosa, pela conveniência e flexibilidade na administração. Para maximizar os benefícios e minimizar os riscos potenciais associados a esses medicamentos, se faz necessário que os serviços de saúde adotem práticas seguras e baseadas nas evidências científicas mais atualizadas.

Os resultados demonstraram que na solução de capecitabina preparada a partir da dissolução dos comprimidos em água ultrapura, não há perda do princípio ativo, por até 6 horas após o preparo da solução, através de ensaio analítico por UFLC. Além disso, observou-se ainda efeito citotóxico significativo através do ensaio de MTT após o tratamento de linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-27) com a solução preparada, sugerindo que o efeito citotóxico é mantido, utilizando-se a solução preparada para tratamento em até 120 minutos (2 horas), no mínimo, após o seu preparo.

A atividade da enzima TP nas linhagens estudadas pôde ser determinada, comprovando a presença desta enzima em células de câncer de mama, com conversão do último metabólito formado a partir da capecitabina no fármaco ativo 5-FU. Além disso, os resultados sugerem novos fatos ao mecanismo de conversão da capecitabina a 5-FU: observa-se que a via metabólica para conversão da capecitabina a 5-FU possa não ser dependente, de forma exclusiva, da ação das carboxilesterases hepáticas, sugerindo que essas enzimas podem estar presentes também nas células tumorais, ou ainda que exista(m) outra(s) via(s) nas células tumorais capaz(es) de promover(em) a conversão da capecitabina em 5-FU, ou ainda, em outro(s) metabólito(s) da capecitabina que possua(m) efeito citotóxicos significativos nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231.

A presente pesquisa traz à luz informações importantes às equipes de saúde em relação ao tempo e a forma de administração da capecitabina em uso *off label* na forma líquida, não fornecidas antes e diferentes das recomendações dos fabricantes, a fim de se ter um manuseio seguro do antineoplásico, sem que haja impacto(s)

negativo(s) na terapêutica aos pacientes. Este estudo também pode servir como base para pesquisas complementares quanto a fabricação de OAAs em forma líquida, de forma a contornar obstáculos na administração segura em pacientes que tenham dificuldade de deglutir comprimidos ou estejam em uso de sonda nasogástrica ou nasoenteral.

## 6 PERSPECTIVAS

- Realização de experimentos com a solução de capecitabina preparada a partir da dissolução dos comprimidos em água ultrapura, mantidas em temperatura ambiente (~24 °C), refrigeração (2 a 8° C) e congelada (-20 °C), para avaliar nestas condições por quanto tempo concentração de princípio ativo de capecitabina diminui na solução.
- Realização de novos ensaios analíticos que mimetizem possível interação da solução de capecitabina preparada a partir da dissolução dos comprimidos em água ultrapura no período compreendido a partir da administração, até a absorção intestinal, avaliando se há influencia na quantidade do princípio ativo que chega até o intestino para ser absorvido após o tratamento.
- Determinação de atividade enzimática da enzima carboxilesterase nas linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231), de forma a confirmar a presença ou não dessas enzimas e avaliar se existe conversão da capecitabina a 5-FU sem a ação carboxilesterases hepáticas; se existe(m) outra(s) via(s) nas células tumorais capaz(es) de promover(em) a conversão da capecitabina em 5-FU, ou ainda, a existência de outro(s) metabólito(s) da capecitabina que possua(m) efeito citotóxicos significativos nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231.

## REFERÊNCIAS

AD, Pani Kumar et al. Development of Validated Stability Indicating RP-HPLC Method for the estimation of Capecitabine in Pure and Pharmaceutical Formulations. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 175–181, 2011.

AKBARI, Reyhaneh; JAVAR, Hamid Akbari. Efficacy of Capecitabine and 5-Fluorouracil (5-FU) on the human breast cancer cell line (MCF7) – effect of concentration. **American Journal of Research Communication**, v. 1, n. 6, p. 75–91, 2013. Disponível em: <[www.usa-journals.com](http://www.usa-journals.com)>.

AKRAM, Muhammad et al. Awareness and current knowledge of breast cancer. **Biological Research**, v. 50, n. 1, p. 1–23, 2017.

AL-MAHMOOD, Sumayah et al. Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 8, n. 5, p. 1483–1507, 5 out. 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13346-018-0551-3>>.

ANICETO, Dalmo Luiz Faria Pires. Anvisa E O Uso Off-Label De Medicamentos: As Relações Entre Evidências E Regulação. **Universidade Federal Do Ceará.**, p. 70, 2019. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/49579>>.

ANVISA. **RESOLUÇÃO RDC Nº - 166, DE 24 DE JULHO DE 2017.** . Brasil: [s.n.]. Disponível em: <[https://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412)>. , 2017

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Como a Anvisa vê o uso off label de medicamentos.** Disponível em: <[http://antigo.anvisa.gov.br/en\\_US/resultado-de-busca?p\\_p\\_id=101&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=maximized&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-1&p\\_p\\_col\\_count=1&\\_101\\_struts\\_action=%2Fasset\\_publisher%2Fview\\_content&\\_101\\_assetEntryId=352702&\\_101\\_type=content&\\_101\\_grou](http://antigo.anvisa.gov.br/en_US/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=352702&_101_type=content&_101_grou)>.



BHATIA, M S et al. HPLC Assay Method Development and Validation for Quantification of Capecitabine in Tablets and Forced Degradation Samples. **Marmara Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 3, p. 660–660, 2017.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, 72(1-2), 248–254. doi:, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BUDMAN, Daniel R. et al. Preliminary studies of a novel oral fluoropyrimidine carbamate: Capecitabine. **Journal of Clinical Oncology**, v. 16, n. 5, p. 1795–1802, 1998.

CAILLEAU, R. et al. Breast tumor cell lines from pleural effusions. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 53, n. 3, p. 661–674, 1974.

ÇAKIR, Hacer Kaya; EROGLU, Onur. In vitro anti-proliferative effect of capecitabine (Xeloda) combined with mocetinostat (MGCD0103) in 4T1 breast cancer cell line by immunoblotting. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 24, n. 11, p. 1515–1522, 2021.

CHAU, Ian; LEGGE, Sally; FUMOLEAU, Pierre. The vital role of education and information in patients receiving capecitabine (Xeloda®). **European Journal of Oncology Nursing**, v. 8, n. SUPPL. 1, 2004.

COMȘA, Șerban; CÎMPEAN, Anca Maria; RAICA, Marius. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 Years of experience in research. **Anticancer Research**, v. 35, n. 6, p. 3147–3154, 2015.

DEBIASI, Marcio et al. Inferred Survival Analysis of Metastatic Breast Cancer in a Brazilian External Library. **Brazilian Journal of Oncology**, n. 51, p. 1–10, 2018.

DEENEN, Maarten J. et al. Quantitative determination of capecitabine and its six metabolites in human plasma using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 913–914, p. 30–40, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.11.033>>.

DEVES, Candida. **Caracterização bioquímica da enzima timidina fosforilase humana como alvo para o desenvolvimento racional de novos candidatos a**

**fármacos para a quimioterapia do câncer.** 2013. 168 f. PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL, 2013. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10923/5591>>.

DOWNEY, Catherine E.; THAKERAR, Arti; KIRSA, Sue. Don't rush to crush: Audit of modification to oral medicines for patients with swallowing difficulties. **Journal of Pharmacy Practice and Research**, v. 45, n. 2, p. 146–151, 2015.

EBSERH. **Manual de Boas Práticas de Manipulação de Antineoplásicos da Rede EBSERH.** 1. ed. São Paulo: [s.n.], 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/ebserh/pt-br/acesso-a-informacao/boletim-de-servico/sede/2021/anexos/manualebserh.pdf>>.

FABBRI, Alessandra; CARCANGIU, Maria Luisa; CARBONE, Antonino. Histological classification of breast cancer. **Breast Cancer Nucl. Med. Diagnosis Ther. Options.** [S.l: s.n.], 2008. p. 3–14.

FARKOUH, Andre et al. A rapid and simple HPLC assay for quantification of capecitabine for drug monitoring purposes. **Anticancer Research**, v. 30, n. 12, p. 5207–5212, 2010.

\_\_\_\_\_. Clinical pharmacokinetics of capecitabine and its metabolites in combination with the monoclonal antibody bevacizumab. **Anticancer Research**, v. 34, n. 7, p. 3669–3673, 2014.

HARBECK, Nadia et al. **Breast cancer.** [S.l: s.n.], 2019. v. 5.

HARBECK, Nadia; GNANT, Michael. Breast cancer. **The Lancet**, v. 389, n. 10074, p. 1134–1150, 2017. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31891-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31891-8)>.

HASHIMOTO, Yasuhiro et al. Current status of therapeutic drug monitoring of 5-fluorouracil prodrugs. **Anticancer Research**, v. 40, n. 8, p. 4655–4661, 2020.

HYNDMAN, Iain Joseph. Review: the Contribution of both Nature and Nurture to Carcinogenesis and Progression in Solid Tumours. **Cancer Microenvironment**, v. 9, n. 1, p. 63–69, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12307-016-0183-4>>.

INCA. **Câncer de mama.** Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/mama>>. Acesso em: 2 jul. 2023a.

\_\_\_\_\_. **Câncer de mama.** Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/mama>>.

\_\_\_\_\_. **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil.** [S.l: s.n.], 2022c. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>>.

\_\_\_\_\_. **Perguntas frequentes (FAQ).** Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/acesso-a-informacao/perguntas-frequentes/cancer#:~:text=O carcinoma in situ ou,camadas do órgão de origem.>>>.

ISHIKAWA, Tohru et al. Positive correlation between the efficacy of capecitabine and doxifluridine and the ratio of thymidine phosphorylase to dihydropyrimidine dehydrogenase activities in tumors in human cancer xenografts. **Cancer Research**, v. 58, n. 4, p. 685–690, 1998.

JIANG, Yun et al. Tolerance to oral anticancer agent treatment in older adults with cancer: a secondary analysis of data from electronic health records and a pilot study of patient-reported outcomes. **BMC Cancer**, v. 22, n. 1, p. 1–14, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12885-022-10026-3>>.

JIANG, Z. et al. Capecitabine monotherapy in advanced breast cancer resistant to anthracycline and taxane: A meta-analysis. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 14, n. 12, p. S957–S963, 2018.

KARACHALIOU, N. et al. A multicenter phase II trial of docetaxel and capecitabine as salvage treatment in anthracycline- and taxane-pretreated patients with metastatic breast cancer. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 70, n. 1, p. 169–176, 2012.

LALITHA, K.V.; RAVEENDRA REDDY, J.; DEVANNA, N. VALIDATED STABILITY INDICATING HPLC METHOD FOR ESTIMATION OF CAPECITABINE. **INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES AND RESEARCH**, v. 11, n. 11, p. 5651–5658, 2020. Disponível em: <<https://ijpsr.com/bft-article/validated-stability-indicating-hplc-method-for-estimation-of-capecitabine/>>.

LAM, Masha S.H. Extemporaneous compounding of oral liquid dosage formulations and alternative drug delivery methods for anticancer drugs. **Pharmacotherapy**, v. 31,

n. 2, p. 164–192, 2011.

LIN, Yu Ju; KUO, Chun Nan; KO, Yu. Effectiveness and healthcare costs of eribulin versus capecitabine among metastatic breast cancer patients in Taiwan. **Breast**, v. 57, p. 18–24, 2021.

LONGLEY, Daniel B.; HARKIN, D. Paul; JOHNSTON, Patrick G. **5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies**. **Nature Reviews Cancer**. [S.l: s.n.], maio 2003

MACLEOD, A. et al. A nurse-/pharmacy-led capecitabine clinic for colorectal cancer: Results of a prospective audit and retrospective survey of patient experiences. **European Journal of Oncology Nursing**, v. 11, n. 3, p. 247–254, 2007.

MALHOTRA, Gautam K. et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer Biology and Therapy**, v. 10, n. 10, p. 955–960, 2010.

MARTINEZ-TRUFERO, J. et al. Phase II study of capecitabine as palliative treatment for patients with recurrent and metastatic squamous head and neck cancer after previous platinum-based treatment. **British Journal of Cancer**, v. 102, n. 12, p. 1687–1691, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6605697>>.

MARTINS, Tiago Leite et al. Adverse reaction induced by capecitabine: the importance of pharmacovigilance. **Rev. Bras. Farm. Hosp. Serv. Saúde São Paulo**, v. 3, p. 24–26, 2013.

MERCK. **Enzyme Activity Assays**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/BR/en/applications/protein-biology/enzyme-activity-assays>>.

MEULENAAR, Jelte et al. Slow dissolution behaviour of amorphous capecitabine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, n. 1–2, p. 213–217, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.11.041>>.

MIREȘTEAN, Camil Ciprian; IANCU, Roxana Irina; IANCU, Dragoș Petru Teodor. Capecitabine—A “Permanent Mission” in Head and Neck Cancers “War Council”? **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 19, 2022.

MIWA, M. et al. Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5 fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver

and cancer tissue. **European Journal of Cancer**, v. 34, n. 8, p. 1274–1281, 1998.

MORI, Ryutaro et al. The mechanism underlying resistance to 5-fluorouracil and its reversal by the inhibition of thymidine phosphorylase in breast cancer cells. **Oncology Letters**, v. 24, n. 3, 2022.

NASCIMENTO, Sara Carolina da Silva et al. A importância da validação de métodos analíticos em análises de medicamentos. **ANAIS DO IV PESQUISAR**, v. 4, n. ISSN, p. 4, 2015. Disponível em: <<https://www.unifan.edu.br/unifan/aparecida/wp-content/uploads/sites/2/2019/09/A-IMPORTÂNCIA-DA-VALIDAÇÃO-DE-MÉTODOS-ANALÍTICOS-EM-ANÁLISES-DE-MEDICAMENTOS.pdf>>.

O'SHAUGHNESSY, Joyce et al. Impact of prior anthracycline or taxane use on eribulin effectiveness as first-line treatment for metastatic breast cancer: results from two phase 2, multicenter, single-arm studies. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, 2015.

PIÓRKOWSKA, E. et al. Rapid and simplified HPLC-UV method with on-line wavelengths switching for determination of capecitabine in human plasma. **Pharmazie**, v. 69, n. 7, p. 500–505, 2014.

ROCHE. **Xeloda**. [S.l: s.n.], 2022. Disponível em: <[https://dialogoroche.com.br/content/dam/roche-dialogo/dialogo-brazil-assets/downloadable-assets/produtos/bulas/xeloda/Xeloda\\_Bula\\_Profissional.pdf](https://dialogoroche.com.br/content/dam/roche-dialogo/dialogo-brazil-assets/downloadable-assets/produtos/bulas/xeloda/Xeloda_Bula_Profissional.pdf)>.

SAMBI, Manpreet et al. Therapeutic Options for Metastatic Breast Cancer. **Springer**. [S.l: s.n.], 2019. p. 131–172. Disponível em: <[http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-20301-6\\_8](http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-20301-6_8)>.

SENKUS, E. et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 26, n. Supplement 5, p. v8–v30, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdv298>>.

SILVA, Guilherme Guimarães da. **Caracterização clonal de linhagens celulares de câncer de mama e sua implicação em modelos experimentais para estudos in vitro**. 2020. 56 f. Universidade de Brasília, 2020. Disponível em: <<https://repositorio.unb.br/handle/10482/38995>>.

SMOLARZ, Beata; ZADROŻNA NOWAK, Anna; ROMANOWICZ, Hanna. Breast Cancer—Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of

Literature). **Cancers**, v. 14, n. 10, p. 1–27, 2022.

STANISŁAWEK, Andrzej. Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies— An Updated Review. p. 1–30, 2021.

SUN FARMACÊUTICA DO BRASIL, LTDA. **CAPECITABINA**. . [S.l: s.n.], 2015.

SUNG, Hyuna et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

TIRUMALASETTY, Neeharika; RAMCHANDRAN, D. New stability indicating method development and validation of capecitabine and docetaxel in bulk and pharmaceutical dosage form by using rp-hplc. **International Journal of Applied Pharmaceutics**, v. 13, n. 5, p. 177–182, 2021.

TOI, M. et al. Modulation of thymidine phosphorylase by neoadjuvant chemotherapy in primary breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 90, n. 12, p. 2338–2343, 2004.

TOMPKINSON, PHARMD, Madeline et al. Perceptions of Health-Care Workers of the Cost and Safety of Oral Oncolytic Agents for Patients: A Survey. **Journal of the Advanced Practitioner in Oncology**, v. 11, n. 4, 2020.

VIALE, G. The current state of breast cancer classification. **Annals of Oncology**, v. 23, n. SUPPL. 10, 2012.

WALKO, Christine M; LINDLEY, Celeste. Capecitabine: A Review. **Clinical Therapeutics**, v. 27, n. 1, 2005.

WEIGELT, Britta; REIS-FILHO, Jorge S. Histological and molecular types of breast cancer: Is there a unifying taxonomy? **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 6, n. 12, p. 718–730, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.166>>.

WHO. **Cancer**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 2 fev. 2023.

WILD, C. P.; WEIDERPASS, E.; STEWART, B. W. (ed.). **World Cancer report 2020**. [S.l: s.n.], 2020. v. 199.

YOSHIMURA, Akihiko et al. Purification and tissue distribution of human thymidine

phosphorylase; high expression in lymphocytes, reticulocytes and tumors. **BBA - General Subjects**, v. 1034, n. 1, p. 107–113, 1990.

ZAID, Abdel Naser; ABDALLAH, Yaser; ZYOUN, Sa'ed H. Knowledge, Attitudes, and Practices of Pharmacists Toward Splitting or Crushing Oral Solid Dosage Forms in Palestine: Safety and Therapeutic Implications. **Palestinian Medical and Pharmaceutical Journal**, v. 4, n. 1, p. 11–26, 2019.