

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

SARAH MARIA DA SILVA NAPOLEÃO

**ESTUDO SOBRE NANOLIPOSSOMAS ASSOCIADAS A ANTICORPO MONOCLONAL
NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências da Educação e Saúde-FACES, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, sob a orientação da Professora Dra. Anabele Azevedo Lima Barbastefano.

BRASÍLIA

2018

ESTUDO SOBRE A FORMULAÇÃO DE NANOLIPOSSOMAS ASSOCIADAS A ANTICORPO MONOCLONAL NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA

Sarah Maria Da Silva Napoleão¹
Anabele Azevedo Lima Barbastefano²

Resumo

O Câncer de mama é uma das maiores causas de mortes em mulheres adultas e possui uma patogênese de origem multifatorial, que envolve fatores biológicos, endócrinos, vida reprodutiva, entre outros. Os tratamentos convencionais para esse tipo de câncer se resumem ao procedimento local e/ou sistêmico que representam grande prejuízo funcional, imunossupressão e debilidade física e emocional. A procura por tratamentos alternativos e complementares foi se aperfeiçoando e uma dessas alternativas está no uso de nanobiotecnologia, com formulações sobre o uso de nanolipossomas funcionalizadas com anticorpos monoclonais carregando fármacos de interesse para desenvolvimento de um sistema de entrega eficiente e funcionalizado. Esse trabalho tem por objetivo descrever a formulação da associação das nanopartículas lipídicas e dos lipossomas, englobando antineoplásicos de interesse associados a anticorpo monoclonal no tratamento do câncer mamário, tal descrição será mostrada em forma de uma revisão bibliográfica narrativa fundamentada em artigos e dissertações publicados em bancos de dados de pesquisas online.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Câncer de mama. Lipossomas. Anticorpos. Trastuzumab. Immunolipossomas. Nanopartículas

STUDY ON THE FORMULATION OF NANOLIPOSOMES ASSOCIATED WITH MONOCLONAL ANTIBODY IN THE TREATMENT OF BREAST CANCER

Abstract

Breast cancer is one of the major causes of death in adult women and has a pathogenesis of multifactorial origin, involving biological, endocrine, reproductive life, among others. Conventional treatments for this type of cancer are limited to the local and/ or systemic procedure that represent great functional impairment, immunosuppression and physical and emotional weakness. The search for alternative and complementary treatments has been improving and alternative is the use of nanobiotecnology with formulations on the use of functionalized nanoliposomes with monoclonal antibodies carrying drugs of interest for the development of an efficient and functionalized drug delivery system. This work aims to describe the association of lipid nanoparticles and liposomes, encompassing antineoplastics of interest associated with a monoclonal anti-mammalian mammary antibody, such description will be shown in the form of a bibliographical bibliography based on articles and dissertations databases of online research.

Keywords: Nanotechnology. Breast cancer. Liposomes. Antibodies. Trastuzumab. Immunoliposomes. Nanoparticles

¹Graduanda do curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.
smnapoleao@gmail.com

²Bióloga, MsC e Dra. em Patologia Molecular-UnB, Professora de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB. anabele.lima@edu.ceub.br

1. INTRODUÇÃO

Câncer é um conjunto de manifestações patológicas caracterizado pela desordenada proliferação celular, pela capacidade de invadir tecidos adjacentes e/ou de migrar para tecidos distantes, as chamadas de metástases. Esse crescimento descontrolado de células reflete na formação de neoplasia ou tumor, cuja denominação se dá de acordo com o tecido de origem (MOREIRA, 2013).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2016), a incidência mundial de cânceres cresceu em 20% na última década, alcançando cerca de 22 milhões de novos casos ao ano, dos quais 13 milhões resultam em óbito. Dentre os diversos tipos de cânceres, o tumor de mama é a neoplasia maligna mais frequentemente diagnosticada no mundo todo desde os anos 1990. No Brasil, essa doença representa 28% dos casos de câncer e há a estimativa de mais de 59.000 mil novos casos em 2018 (INCA 2017). O Câncer de mama é uma das maiores causas de mortes em mulheres adultas, entre 40-50 anos, no mundo. No Brasil, grande número de óbitos tem como causa principal o diagnóstico tardio da doença.

O câncer de mama é um carcinoma de tecido epitelial heterogêneo, em nível molecular e histológico (MOREIRA, 2013). Ele possui uma patogênese de origem multifatorial, que envolve fatores biológicos, endócrinos, vida reprodutiva, fatores comportamentais e estilo de vida. Existem vários marcadores histopatológico-bioquímicos diferentes que permitem diferenciar os tipos de câncer de mama e prever o seu comportamento mediante as terapias existentes (COELHO, 2017).

Os tratamentos convencionais para esse tipo de câncer se resumem ao procedimento local (cirurgia e radioterapia) e/ou ao procedimento sistêmico (quimioterapia e hormonioterapia). Esses tratamentos, por sua vez, representam grande prejuízo funcional e baixa seletividade ao tecido tumoral, além de causar imunossupressão e debilidade física e emocional (GUARNERI *et al.*, 2004; FIRZUK *et al.*, 2011). O objetivo das terapias em desenvolvimento contra o câncer de mama é minimizar os danos colaterais do tratamento, atuando principalmente de forma mais seletiva sobre as células malignas (MIJAN, 2012; PEIXOTO, 2015).

A procura por tratamentos alternativos e complementares para o câncer de mama cresceu significativamente nas últimas décadas. Na atualidade, encontrar um tratamento eficaz e com menos efeitos colaterais é considerado um desafio para a medicina. Uma dessas alternativas está no uso de nanobiotecnologia.

No tratamento contra o câncer, a nanobiotecnologia visa à entrega eficiente e específica de fármacos ao local da doença, quer administrados por via oral, nasal, transdérmica, endovenosa e outras. Além disso, não raro seu uso promove a melhoria na eficácia da droga, que ao ser encapsulada ou associada a algum tipo de nanopartícula tem seus efeitos colaterais reduzidos (MOREIRA, 2013).

A utilização de nanopartículas para amenizar os efeitos colaterais dos quimioterápicos e melhorar a sua eficácia foi atestada por diferentes testes pré-clínicos e diversos estudos na área epidemiológica, que comprovaram o potencial da utilização de sistemas coloidais nanoparticulados na condução de fármacos, sintéticos ou naturais, para combater diversos tipos de câncer, entre eles o câncer de mama (COELHO, 2017).

A *Food and Drug Administration* (FDA) já aprovou o uso de diversas nanoestruturas. Fármacos são encapsulados dentro de nanopartículas de 50 a 80 nm, que não atravessam a parede dos vasos de regiões sadias do organismo porque o espaço entre essas células é de 15 a 30 nm. Nas regiões inflamadas, ou onde há presença de tumores, as células endoteliais estão menos unidas, o que permite um acúmulo de nanopartículas no tecido tumoral vizinho ao vaso sanguíneo (VIEIRA; GAMARRA, 2016).

Pela sua natureza biodegradável, biocompatível e não imunogênica; o que faz deles alvos atrativos para a área de pesquisa terapêutica e para as aplicações analíticas; os lipossomas são nanopartículas extremamente versáteis, definidos como vesículas compostas por uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas que separam-se por um meio aquoso e que podem englobar substâncias hidrofílicas, ou substâncias lipofílicas, inseridas ou absorvidas na membrana (BATISTA, 2007).

Os lipossomas são nanocarreadores que podem ser associados a anticorpos monoclonais, ou seus fragmentos, sendo possível direcioná-los para tipos celulares específicos que constituem tumores sólidos diversos. Inúmeros trabalhos de pesquisa atestam o sucesso desses nanocarreadores, contendo fármacos antineoplásicos, em estudos que utilizam modelos *in vitro* e/ou *in vivo*, seguidos de estudos pré-clínicos e clínicos (OLIVEIRA, 2012). A elucidação de alterações genéticas e expressões fenotípicas, como características de tipos específicos de cânceres, tornou possível aos pesquisadores identificar alvos potenciais, que resultaram na formulação de vários agentes antitumorais (DEL DEBBIO; TONON; SECOLI, 2007).

Atualmente, os anticorpos monoclonais são uma realidade na utilização terapêutica, principalmente por sua possibilidade de gerar moléculas com alto grau de especificidade a um dado antígeno, criando assim uma nova geração de biofármacos. O advento da

tecnologia do DNA recombinante, dos aprimoramentos em genômica, da obtenção de clonagem e da manipulação de genes codificadores de imunoglobulinas em geral, e especificamente de anticorpos monoclonais, possibilitaram, seja por processos de hibridização ou humanização, o uso desses anticorpos monoclonais em processos terapêuticos em potencial (REZENDE; SOCCOL, 2015).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi descrever a formulação da associação das nanopartículas lipídicas e dos lipossomas, englobando antineoplásicos de interesse, associadas a anticorpo monoclonal, na terapêutica do câncer mamário.

2. METODOLOGIA

O presente trabalho resultou de uma pesquisa de revisão de artigos científicos, buscando na base de dados *SciELO*, *Google Acadêmico*, *PubMed* e demais meios de pesquisa *online* as palavras-chave “nanotecnologia, câncer de mama, lipossomas, anticorpos, trastuzumab, imunolipossomas, nanopartículas”. Como critério de inclusão, foi delimitado o período de publicação de 2005 até 2017, em caso de conceitos mais estabelecidos foram utilizados trabalhos mais antigos, em português e inglês. Os artigos pesquisados descreveram sobre o uso de nanopartículas no tratamento do câncer de mama e os tipos de materiais de diversas nanopartículas.

Nas revisões narrativas são descritos e discutidos determinados assuntos, utilizando instrumentos como publicações, em uma perspectiva teórica ou contextual. Trata-se de uma análise da literatura publicada em livros, artigos, revistas impressas ou eletrônicas; sobre o tema proposto (BERNARDO *et al.*, 2004).

A metodologia dos artigos de revisão narrativa não permite a reprodução dos dados e também não fornece respostas quantitativas para as questões específicas, é essencialmente qualitativa. Esses artigos buscam na Literatura respostas para uma questão, sem usar, entretanto, critérios explícitos, sem sistematizar, sem aplicar estratégias sofisticadas para selecionar os trabalhos e os estudos que serão utilizados nessa busca. Não raro, é a subjetividade dos autores que determina a interpretação das informações coletadas (CORDEIRO *et al.*, 2007).

A revisão narrativa é adequada para fundamentar teoricamente artigos, dissertações, teses, trabalhos de conclusão de cursos, pois aparecem em diferentes estudos com denominações diversas, como revisão de literatura, revisão bibliográfica, estado da arte, revisão narrativa etc. (CORDEIRO *et al.*, 2007).

3. DESENVOLVIMENTO

3.1. Particularidades do câncer de Mama

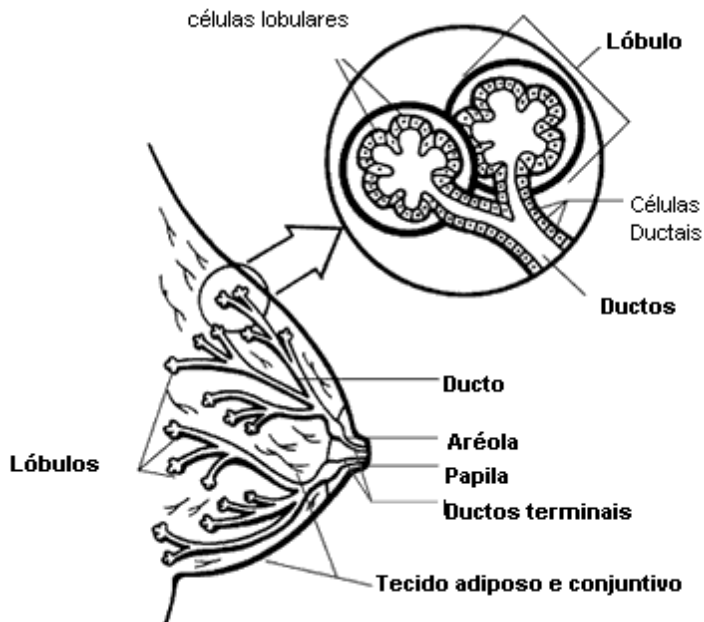
A etiologia do câncer de mama é considerada, na literatura, como multifatorial. Alguns casos estão relacionados à herança genética (entre 5 a 10% dos casos) como: mutação ou deleção do gene *BRCA1*, gene supressor tumoral localizado no cromossomo 17 que pode elevar o risco de câncer de mama antes dos 50 anos de idade; mutação do gene *BRCA2*, gene supressor de tumor localizado no cromossomo 13, que pode ocasionar no aumento do risco de câncer de ovário e aumento do risco de câncer de mama no homem. Além disso, cerca de 90% das mulheres que possuem mutação no gene *P53* (fator de transcrição) desenvolvem câncer de mama (HANSEL & DINTZIS; 2007).

Outros fatores envolvem, no caso das mulheres, as maiores vítimas da doença, a idade (entre 45-50 anos), o aumento da gordura corporal (especialmente o acúmulo abdominal), a ingestão de álcool nos períodos pré e pós-menopausa (nessa fase álcool pode ser agente cancerígeno), sedentarismo, primeira gestação tardia e exposição excessiva à radiação (SZVARÇA et al., 2015). Ou ainda utilização de alguns hormônios de crescimento que podem provocar alteração no padrão de expressão do DNA, quando promovem aumento da estatura na idade adulta, e tratamento com anticoncepcionais hormonais tanto na adolescência quanto na menopausa (TERRY et al, 2007).

Apesar de sua característica heterogênea, a mama é composta majoritariamente por tecido adiposo, seu interior é composto pelos lobos, responsáveis pela produção de leite; ductos, canais responsáveis interligados as glândulas que permitem a condução do leite até os mamilos; vasos tanto sanguíneos quanto linfáticos designados à nutrição e drenagem do tecido mamário; tecido conjuntivo, responsável pela sustentação física, conforme demonstra a figura 1(RAMIÃO et al., 2016).

Existem mais de 10 tipos histológicos de câncer de mama descritos na literatura, sua maioria originada de células epidérmicas localizadas nos ductos, conferindo-lhe a nomenclatura de carcinoma ductal. (HAHN, 2017). Como todos os cânceres, o câncer de mama passa pela etapa de tumor primário ou *in situ*, quando está localizado em apenas uma região, sem se espalhar. Tumores invasivos, onde já se tornou massa tumoral e atingiu os linfonodos; e metástase, quando partiu do local primário e afetou outras regiões do corpo. (WOLINSKY; COLSON; GRINSTAFF, 2012).

Figura 1: Anatomia da glândula mamária e esquema de visualização ampliada.



FONTE: RIBEIRO et al. (2002).

O estudo dos fatores biológicos, no aparecimento e desenvolvimento do câncer de mama, tem sido alvo das pesquisas que buscam compreender os mecanismos reguladores da diferenciação, da proliferação e do desenvolvimento das metástases tumorais. Os chamados marcadores biológicos estão presentes tanto no tumor quanto no sangue. Apresentam-se também em líquidos biológicos produzidos pelo próprio tumor ou como resposta à sua presença, o que serve para distinguir os tecidos saudáveis dos neoplásicos (RAMIÃO et al., 2016).

A bioquímica e os estudos moleculares localizam os marcadores tumorais, através da imuno-histoquímica ou por hibridização *in situ*; analisam a variedade de proteínas e o quanto elas estão associadas aos medidores de proliferação dos tumores ou aos elementos oncogênicos. Dentre os marcadores tumorais capazes de indicar a presença do câncer de mama destacam-se os receptores dos hormônios estrogênio, progesterona e do receptor de fator de crescimento (EISENBERG; KOIFMAN, 2001).

Por seu significativo valor prognóstico e terapêutico, os marcadores tumorais têm se mostrado um aliado na prática clínica. O ER (receptor de Estrógeno), o PR (Receptor de Progesterona) e o HER 2 (Receptor 2 do fator de Crescimento Epidermal Humano) são elementos essenciais para um bom diagnóstico e prognóstico de novos casos de Câncer de Mama, isto porque nos casos de hormonioterapia, a capacidade responsiva é marcada por

ER tanto quanto por PR. Por outro lado, em 30% dos casos, em média, há uma superexpressão do HER 2. A combinação desses marcadores possibilita a classificação do câncer de mama em grupos ER+ (ER+/ HER 2-), HER2- (ER-/HER2-), HER 2+(ER-/HER2+), triplo negativo (ER-/PR-/HER2-) e triplo positivo (ER+/PR+/HER2+) (ELOY et al., 2017).

O receptor HER2 possui tanto um domínio intracelular de tirosina quinase, quanto um domínio ligante extracelular importante para às fases de crescimento e diferenciação celular. Como um mecanismo chave de sobrevivência celular, a superexpressão de HER2 pode levar a progressão maligna, o que é associado a um prognóstico desfavorável para carcinomas mamários, ovário, gástrico e entre outros (TAI; MAHAT; CHENG, 2010). Estima-se que a superexpressão de HER2 apresenta-se em praticamente 25% de todos os cânceres de mama, associado às formas mais agressivas da doença, juntamente com a resistência a terapia hormonal. Estudos apontam que a inibição da expressão do receptor HER2 resultou em apoptose altamente relevante em células do câncer de mama, tornando-o alvo de diversos modelos terapêuticos (EGEL; KAKLAMANI, 2007).

3.1.2 Tratamento convencional do câncer de mama

As diretrizes de tratamento para o câncer de mama no Brasil seguem, principalmente, às recomendações do Ministério da Saúde, que preconiza o tríptico diagnóstico, que compreende a clínica (como a palpação, dores ou aparecimento de lesões), imagem (como a mamografia e ultrassonografia) e citologia (através de punção e biópsia para exames como imuno-histoquímica). Com a definição e categorização do tipo de achado e estágio do câncer, os tratamentos mais convencionais, como hormonioterapia, quimioterapia e radioterapia, são aplicados, associados a medidas tratativas mais extremas, como cirurgia de retirada local, parcial ou total da mama (NAZARIO; REGO; OLIVEIRA, 2007)

No grupo de medicamentos utilizados como quimioterápicos estão alguns agentes como os taxanos, as antraciclinas, que compreende a epirrubicina e doxorubicina; fármacos compostos de platina, como a cisplatina e carboplatina; e outros agentes terapêuticos como a capecitabina, vinorelbina, gencitabina e, atualmente, até mesmo alguns medicamentos de caráter não antineoplásicos como as biguanidas (JOHNSTON et al., 2011).

Os taxanos estão entre as classes medicamentosas mais efetivas em relação à resposta antitumoral no tratamento quimioterápico para o câncer de mama. O paclitaxel, por exemplo, é capaz de estabilizar os microtúbulos celulares, o que por consequência, impede

a despolimerização e a segregação mitótica, impactando diretamente no ciclo celular, ocasionando apoptose (GHERSI et al., 2015). Apesar disso, sua biodisposição é muito suscetível ao microambiente celular, o que leva a perda da sua efetividade e a reações adversas severas.

A metformina hidrocloreto faz parte de um grupo derivado de biguanidas de característica hidrofílica e está associada, principalmente, ao tratamento de diabetes tipo 2, porém estudos recentes associaram o seu uso terapêutico à redução do risco de câncer, além de uma resposta mais efetiva a quimioterapia no tratamento do câncer de mama. A metformina atua principalmente nos mecanismos envolvidos na ativação da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMP-AMPK), o que interfere diretamente na síntese de proteínas e na gliconeogênese durante o estresse celular, inibindo de forma eficaz o crescimento de diversas linhagens celulares, até mesmo linhagens cancerígenas mamárias. Além disso, a metformina interage muito bem associada ao anticorpo monoclonal trastuzumabe (ALJADA; MOUSA, 2012).

Outro agente farmacológico interessante para o tratamento quimioterápico do câncer de mama é a rapamicina, um antibiótico macrolídeo lipofílico inibidor da via mTOR, principalmente por agir na tradução de sinal, no RNA mensageiro (RNAm), o que por consequência altera a síntese proteica, o metabolismo da glicose e a síntese lipídica. A mTOR é uma serina-treonina quinase mediador da via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), envolvida em múltiplas funções de sobrevivência celular, como o controle transcricional e transducional. A via mTOR é frequentemente ativada na transformação maligna de certos cânceres humanos, tais como câncer de mama. Estudos clínicos utilizando rapamicina demonstraram seu potencial de burlar a resistência, que alguns pacientes podem desenvolver, ao trastuzumabe. A rapamicina apresentou uma otimização significativa no prognóstico dos pacientes diagnosticados (VICIER *et al.*, 2014; BLANCO *et al.*, 2014).

3.2 ANTICORPOS MONOCLONAIS

Os anticorpos, ou imunoglobulinas, são moléculas que podem localizar, reconhecer e ligar-se a antígenos específicos com a finalidade de inativar ou iniciar a eliminação. Os anticorpos são produzidos por linfócitos B e são consideradas glicoproteínas, estão presentes no sangue circulante e na linfa. (ARAUJO, 2009). Desde final do século XIX, os anticorpos são utilizados na clínica médica e agora com o avanço da engenharia genética e da biotecnologia, uma nova geração de anticorpos surgiu, possibilitando assim a produção de uma nova geração de biofármacos.

As imunoglobulinas, ou anticorpos, são capazes de reconhecer e ligar-se a antígenos tumorais, considerados como alvos, possibilitando respostas imunológicas. Com isso, as células saudáveis são poupadas dos efeitos tóxicos que o tratamento convencional por quimioterapia ocasiona. Os anticorpos monoclonais atuam através de mecanismos variados, como bloqueio de receptores ou fatores de crescimento que são essenciais para a viabilidade da célula, além de poder induzir apoptose, ligar-se a alvos celulares e recrutar funções como citotoxicidade complemento dependente (CDC) ou citotoxicidade celular anticorpo-dependente (ADCC), além de distribuir partículas citotóxicas como os radioisótopos e as toxinas (DEL DEBBIO; TONON; SECOLI, 2007).

O processo de criação de anticorpos monoclonais foi descrito por Kohler e Milstein em 1975, utilizando modelos com ratos. Os anticorpos murinos, porém, demonstraram alto grau de imunogenicidade, o que levou a formulação de formas quiméricas ou híbridas, para substituir os domínios ligantes do rato por domínios humanos, através de tecnologia recombinante, que visava gerar anticorpos majoritariamente humanos, tornando possível a formulação de anticorpos humanizados. Esses anticorpos possuem o seu arcabouço majoritariamente humano, no entanto, algumas de suas regiões codificantes são murinas e tem alta afinidade com o alvo terapêutico (REZENDE; SOCCOL, 2015).

A aplicação de imunoterapias mais eficientes na tratativa do câncer tornou-se possível graças a utilização de anticorpos monoclonais. O tratamento do carcinoma mamário convencional, associado ao uso do anticorpo monoclonal desenvolvido em 1992, anti-HER2 humanizado conhecido como trastuzumabe (HERCEPTIN), possibilitou um aumento na sobrevivência de pacientes com prognósticos desfavoráveis. O trastuzumabe é uma imunoglobulina da classe IgG que possui a particularidade de ligação seletiva com o HER2, o que desencadeia a inibição da transmissão de sinais estimulatórios do crescimento celular, inibindo a ação da proteína HER2 (SILVEIRA et al., 2008).

O trastuzumabe age, principalmente, no bloqueio da parte extracelular dos receptores de HER2, o que impede a ligação destes com os fatores de crescimento. Dessa forma, as vias de sinalização intracelulares (fosfatidilinositol-3-quinase e as quinases ativadas por mitógenos-MAPK) também ficam inibidas, interrompendo a proliferação celular, promovendo o efeito citostático e a destruição da célula por apoptose mediada por células NK (Natural Killer). O uso do trastuzumabe, associado a outros antineoplásicos medicamentosos, elevou às expectativas em relação a terapia tradicional, principalmente a aplicada ao câncer de mama do tipo HER2+ (HADDAD, 2010)

3.3 NANOTECNOLOGIA COMO PERSPECTIVA DE TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA.

3.3.1 Histórico e aplicação da nanotecnologia e das nanopartículas

A nanotecnologia aborda, de forma geral, o desenvolvimento, a obtenção e a caracterização de sistemas de tamanho nanométrico. (KAWASAKI; PLAYER, 2005). A palavra *nano* é originada do grego e significa *anão, muito pequeno*, ou seja, a nanotecnologia engloba todo o tipo de materiais que alcança a escala nanométrica, entre 0,1 e 1000 nanômetros (nm) (MOREIRA, 2013). Por ser uma área multidisciplinar, a nanotecnologia possibilita o desenvolvimento de vários compostos com diferentes aplicabilidades. No campo da medicina, o foco maior está na produção de nanopartículas para estudo de drogas, aprimoramento em diagnóstico em nanoescalas, engenharia de tecidos e biossensores (AHMED; SUBRAMAN, 2012).

Dentro da escala nanométrica, os átomos revelam características interessantes como apresentar tolerância à temperatura, cor, reatividade química, condutividade elétrica, ou mesmo exibir força de intensidade extraordinária, tornando assim possível a constituição de nanopartículas, também chamados de nanocarreadores ou nanossistemas, versáteis e adaptáveis (COSTA; SILVA, 2017). A nanobiotecnologia avançada tornou possível o recobrimento de nanopartículas magnéticas com materiais bioativos como íons específicos, nucleotídeos, peptídeos, vitaminas, antibióticos, substratos análogos ou anticorpos, possibilitando sobrepor questões fisiológicas básicas como atravessar barreiras endoteliais, afetar as células-alvo, sem prejudicar as células normais (LAURENT et al., 2008; LONG et al., 2015).

Além disso, as nanopartículas magnéticas podem ser encapsuladas em lipossomos, o que permite serem guiadas, ou localizadas em um alvo específico por campos magnéticos externos (BIXNER, REIMHULT, 2016; PREISS, BOTHUN, 2011). Essa estratégia de localização em sítio preferencial por gradientes de campos magnéticos propõe que lipossomos magnetizados e fluidos magnéticos se tornem efetivos carreadores de agentes ativos com alto grau de especificidade para a liberação de agentes quimioterápicos. (COSTA; SILVA, 2017). O tamanho da nanopartícula é um fator muito relevante para sua administração e absorção do organismo, e também do tempo o qual a nanopartícula fica na circulação sanguínea.

Nanopartículas maiores tendem a se acumular no baço, após administração, e podem ser removidas pelo retículo endoplasmático de seu parênquima por filtragem

mecânica externa, assim como sistemas carreadores de agentes ativos com tamanhos entre 100 a 200 nm são considerados relevantes por não serem filtrados no baço e no fígado, ou seja, não promovem a sobrecarga nociva dos mesmos. (PETROS; DE SIMONE, 2010).

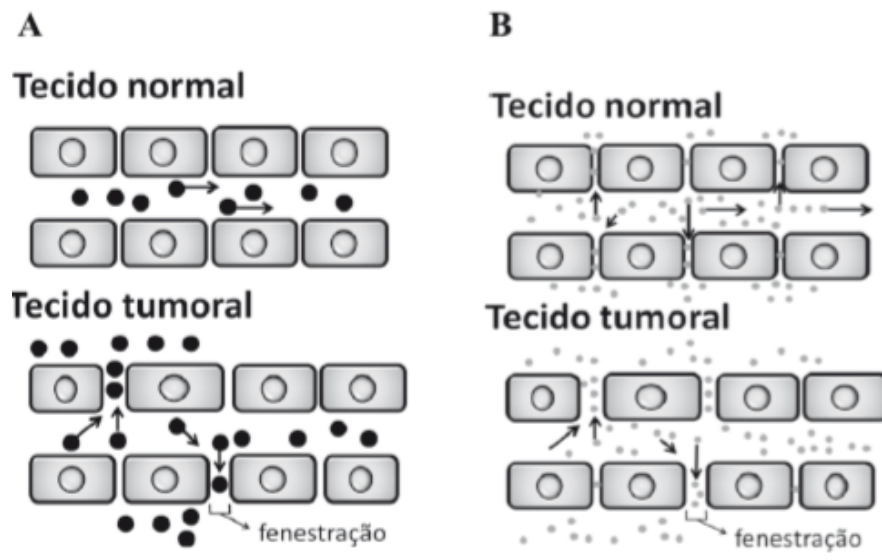
Em contrapartida, partículas com diâmetros inferiores a 5 nm são rapidamente eliminadas da circulação através da filtração por extravasamento (ALEXIS *et al.*, 2008; CHOI *et al.*, 2007), e partículas de tamanho de 15 nm podem se depositar no fígado, baço e medula óssea (PETROS; DE SIMONE, 2010), ou seja, o tamanho e a geometria da nanopartícula são parâmetros de significância na sua biodisposição e incorporação pelas células (COSTA; SILVA, 2017). Além disso, a sua propriedade iônica de superfície também é relevante para o período de permanência da nanopartícula na circulação sanguínea.

Nanopartículas com superfície aniônica tendem a serem absorvidas de maneira mais eficaz pelo retículo endoplasmático, que a remove da circulação sanguínea, diferente das partículas de carga neutra, que apresentam comportamento inverso e demoram a serem captadas pelo mesmo (ZHR *et al.*, 2006), enquanto nanopartículas de superfície catiônica favorecem a permeabilidade da membrana celular aumentando a sua captação pela célula, assim como polímeros policatiônicos são capazes de fazer aberturas na bicamada lipídica celular (CHEN *et al.*, 2009).

As nanopartículas, no sistema de entrega de fármacos, possibilitam a liberação prolongada dos mesmos, o que aumenta a permeabilidade passiva, direcionando-o como alvo a superfície celular, o que diminui os efeitos adversos das terapias convencionais conforme figura 2 (BOULAIZ *et al.*, 2011). Os fármacos convencionais tendem a ter uma janela terapêutica estreita devido principalmente à rápida elevação no plasma, o que leva a uma queda nas taxas de liberação ativa, o que acaba resultando em doses maiores, com efeitos relevantes menores e presença de efeitos colaterais agressivos (PAN *et al.*, 2007).

Quando, porém, o agente ativo do fármaco se encontra associado a uma nanopartícula biodegradável, o processo de liberação fica mais otimizado e específico, pois impedem que os fármacos sejam degradados no corpo antes que atinjam seu alvo, o que acaba aumentando a sua eficácia terapêutica. (COSTA; SILVA, 2017). Nanossistemas com aplicações terapêuticas para tratamento do câncer tem como objetivo principal transpor as barreiras do organismo, reconhecer e se acumular em alguns tipos de tumores e principalmente transportar fármacos citotóxicos para células cancerosas sem prejudicar as células normais (BERRY, CUTIS, 2003; LIM *et al.*, 2013).

Figura 2: Representação figurativa do efeito de permeabilidade em tecido normal e tumoral.



Legenda: A- as esferas pretas representam as nanopartículas contendo fármaco citotóxico que no tecido normal não consegue atravessar o endotélio. No tecido tumoral devido as fenestrações largas, atravessam o endotélio e ficam retidas. B - as esferas cinza representam o fármaco citotóxico que consegue atravessar tanto o endotélio normal quanto o tumoral. FONTE: OLIVEIRA et al, 2012.

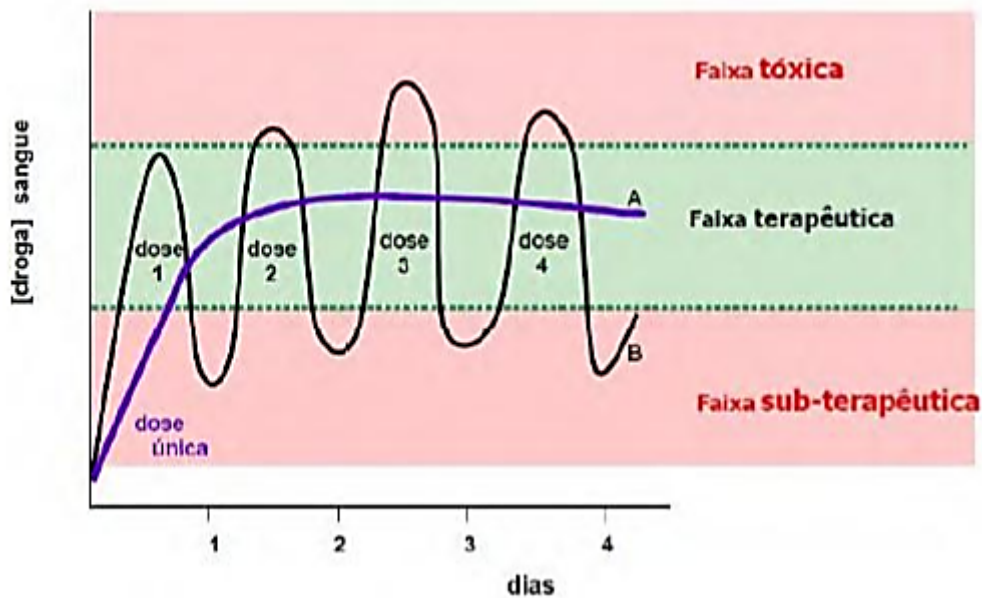
As nanopartículas podem se acumular em tumores sólidos por mecanismos de vetorização passiva e ativa (DANHIER et al, 2010). A vetorização passiva caracteriza-se pela fisiologia anormal dos neovasos presentes em tumores sólidos, isso é possível porque no tecido normal, o endotélio vascular é composto por fenestrações entre 5 a 10 nm, mas nos tecidos dos tumores sólidos essas aberturas na parede dos vasos são bem maiores, entre 100 e 758 nm, o que possibilita que nanopartículas com tamanho médio de 200 nm entrem com mais facilidade nas fenestrações dos neovasos, se acumulando no local de interesse, com pouco ou nenhuma concentração nos tecidos normais (COSTA; SILVA, 2017) caracterizando o mecanismo estabelecido como permeabilidade e retenção aumentada ou EPR (*enhanced permeability and retention*). (OLIVEIRA et al., 2012).

O fenômeno EPR pode aumentar a concentração do fármaco encapsulado em tumores sólidos em até 70 vezes. A vetorização ativa, por outro lado, caracteriza-se pelo uso de ligantes incorporados na superfície do nanocarreador que vai interagir com as células tumorais de forma específica, caracterizando assim o sistema de liberação de fármacos (*Drug delivery systems*) (OLIVEIRA et al., 2012).

Os sistemas de carregamentos e liberação de drogas é também uma das tratativas dentro do âmbito da nanotecnologia, principalmente para melhorar a eficiência terapêutica da droga em questão. A liberação controlada de fármacos visa principalmente o maior

aproveitamento do princípio ativo ao mesmo tempo em que diminui o aparecimento de doses tóxicas e subterapêuticas, com a vantagem de se utilizar uma menor quantidade do princípio ativo, diminuindo assim seu custo, aumentando os intervalos na administração, direcionando o princípio ativo para seu alvo específico demonstrado na figura 3 (UCHEGBU, 2006).

Figura 3: Representação de níveis plasmáticos atingidos por fármacos convencionais (B) e fármacos de liberação controlada (A)



FONTE: ADAPTADO DE MOREIRA, 2013.

Para que a liberação controlada seja eficaz, faz-se necessária uma associação química ou física dos fármacos com materiais biocompatíveis, para que tenham a capacidade de conduzir o fármaco até o seu sítio de atuação específico, com a taxa de liberação controlada. Compostos de natureza lipídica, inorgânica e polimérica têm sido utilizados como suporte para liberação controlada (MOREIRA, 2013)

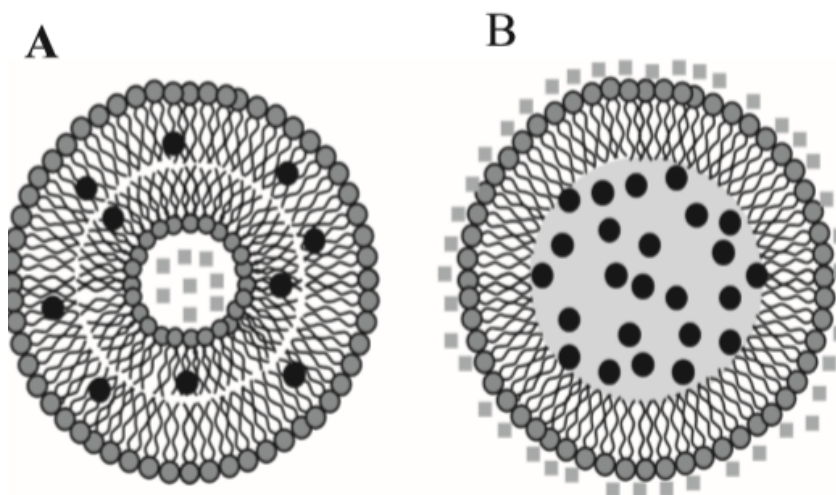
3.3.2 Nanopartículas lisossômicas e suas estruturas

A funcionalidade dos lipossomas foi aprimorada através de pesquisas que permitiram a elevação da estabilidade juntamente com desvendamento das propriedades físico-químicas e também do contato com fluidos biológicos. Um dos pré-requisitos básicos para a utilização de lipossomas carreadoras de fármacos baseia-se na utilização de metodologias que permitam a caracterizar e controlar fatores como preparação dos lipossomas, tamanho das vesículas, sua composição e estabilidade, que afetam de forma direta o comportamento dos lipossomas em meio biológico. (BATISTA et al., 2007).

Os lipossomas ou lipossomos definem-se por vesículas microscópicas que possuem em sua composição uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, que são dispersadas por um meio aquoso, que podem encapsular / englobar substâncias hidrofílicas no seu compartimento aquoso e também substâncias lipofílicas, inseridas ou absorvidas na membrana. (EDWARDS; BAEUMNER, 2006). Essas bicamadas, podem fundir-se com as camadas lipídicas das membrana celular e liberar o conteúdo armazenado dos lipossomas (MOREIRA, 2013). Os lipídios mais utilizados nas formulações de lipossomas são as fosfatidilcolinas, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e esfingomiéline, que formam uma bicamada estável em solução aquosa, sendo a fosfatidilcolinas as mais utilizadas em estudos de formulações de lipossomas por apresentar excelente estabilidade em pH variado ou concentração de sal no meio (BATISTA et al., 2007).

As nanopartículas lipídicas são desprovidas de toxicidade, e possuem maior praticidade relacionada a produção industrial. Consistem em uma matriz lipídica sólida com tamanho médio entre 40 a 1000 nm adaptadas para um sistema de liberação (WONG et al 2007; MEHNERT, MADER, 2001; WONG et al., 2010.). A principal diferença entre nanopartículas lipídicas e lipossomas está na característica estrutural, sendo os lipossomas mais fluidos, enquanto que as nanopartículas apresentam pouca ou nenhuma fluidez por conter um núcleo sólido conforme figura 4 (OLIVEIRA et al., 2012). O termo Nanolipossomas se refere tanto para estruturas lipossômicas quanto para nanopartículas lipídicas.

Figura 4: Representação figurativa de lipossomas e nanopartículas lipídicas.



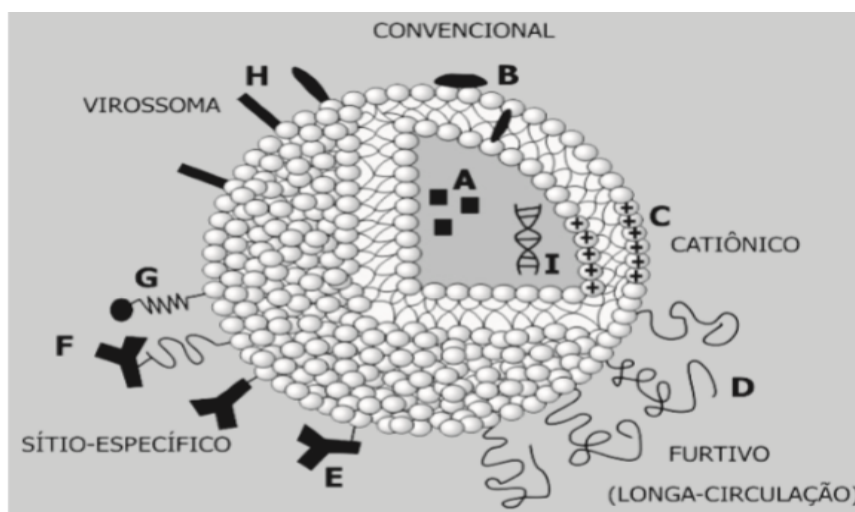
Legenda: (A) lipossoma: encapsulando antineoplásicos hidrofílico-quadrados cinza- e lipofílicos- esferas pretas na porção lipídica- e (B) nanopartículas lipídica: antineoplásicos hidrofílico absorvido na sua superfície- quadrados cinzas- e encapsulando antineoplásicos lipofílico- esferas pretas. FONTE: OLIVEIRA et al., 2012.

Acredita-se que as nanopartículas lipídicas, por apresentarem uma estrutura mais rígida que a dos lipossomas, são mais estáveis no controle de sistema de liberação de fármacos no sítio de interesse. Porém, os estudos com lipossomas são mais abundantes na literatura, e tem uma taxa de sucesso maior que as terapias convencionais para tratativa de tumores sólidos, em ambos os casos, a associação com fármacos de interesse e mecanismos mais elaborados corroboram a praticidade e eficácia terapêutica relacionada ao estudo geral de nanolipossomas. (OLIVEIRA et al., 2012).

Os lipossomas podem ser compostos por uma bicamada lipídica única, chamados de unilamelar ou bicamadas múltiplas em torno do compartimento aquoso interno, classificados como multilamelar. Essa classificação é relevante para comparação de tamanhos, os lipossomas unilamelares podem ser pequenos, SUV (*Small unilamellar vesicles*) e grandes, LUV (*Large unilamellar vesicles*). Quanto a sua técnica de preparação, caracterizam-se como REV (vesículas obtidas por evaporação em fase reversa), FPV (Vesículas obtidas em prensa *French*), e EIV (vesículas obtidas por injeção de éter). (LASIC, 1998; VEMURI; RHODES, 1995)

Com a evolução das nanolipossomas no processo de carreadores de fármacos, diversas modificações foram feitas na sua molécula básica para possibilitar uma melhor eficácia terapêutica, como na figura 5, possibilitando a sua classificação quanto a características de interação com sistemas biológicos (TORCHILIN, 2005).

Figura 5: Características estruturais de variados tipos de lipossomas convencionais



Legenda:(A) fármaco hidrofílico englobado do lipossoma e (B) fármaco lipofílico absorvido ou inserido na bicamada lipídica. Catiônicos (C); de longa circulação-com polímero hidrofílico na superfície (D); sítios – específicos (E), anticorpos ligantes (F), e com peptídeos e proteínas ligantes na superfície (G); Virossomas- com envelope viral na superfície (H); DNA- plasmídeo encapsulado em lipossomas catiônicos (I). FONTE: BATISTA et al., 2007.

Dentro dos grupos de caracterizações de lipossomas existe os convencionais, que são compostos por fosfolipídios e colesterol juntamente com um lipídio de carga negativa ou positivo, para evitar o efeito de agregação dos nanolipossomas, aumentando sua estabilidade em suspensão. Em modelos *in vivo* os nanolipossomas convencionais tendem a serem reconhecidos pelo sistema fagocítico mononuclear, o que os levam a serem removidos da corrente sanguínea mais rapidamente (BATISTA et al. 2007).

Os lipossomas de circulação estendida em modelos *in vivo* podem ser obtidos por diversos métodos, como por exemplo, revestir a superfície lisossômica com componentes hidrofílicos com caráter natural, como o monossialogangliosídeo GM1 e fosfatidilinositol, ou polímeros hidrofílicos de caráter sintético, com ênfase nos polietilenoglicóis (PEG) (SAGRISTÁ et al., 2000; TORCHILIN, 2005) A presença da camada hidrofílica superficial destes polímeros nos nanolipossomas propõem o aumento do tempo de circulação das mesmas por prevenir o reconhecimento e a associação de opsoninas no plasma, o que inibe o processo de reconhecimento e captura pelas células fagocitárias (BATISTA et al., 2007).

Os lipossomas de sítios-específicos foram propostos, principalmente, para aumentar a especificidade de interação de nanolipossomas com as células alvo e aumentar a quantidade de fármaco liberado nestas células. Para isso, foram acoplados ligantes na superfície dos nanolipossomas, para que fosse possível conferir seletividade na distribuição do fármaco encapsulado no sítio de ação desejada, além disso, Eloy et al., (2017) também propuseram a formulação de estruturas nanolipídicas associadas a anticorpos monoclonais terapêuticos e às denominaram imunolipossomas (SIHORKAR; VYAS, 2001. SAPRA; ALLEN, 2003; ELOY et al., 2017).

3.3.3 Formulações de nanolipossomas associadas a anticorpos monoclonais e fármacos de interesse para tratamento do câncer de mama.

Entre os sistemas de *delivery* de fármacos mais promissores estão as formulações lipossomais, isso porque a ligação do fármaco com o carreador lipídico promove acentuada otimização da farmacocinética. A rápida eliminação dos lipossomas pelo retículo endotelial é um inconveniente que pode ser resolvido utilizando-se de polímeros hidrofílicos flexíveis, como o polietilenoglicol (PEG), para modificar a superfície dos lipossomas. Essa estratégia permite o escape de sistema fagocitário mononuclear, o que possibilita maior circulação dos lipossomas na corrente sanguínea. Dessa maneira, ocorre o acúmulo passivo das nanolipossomas no tumor sólido, por meio da retenção e do aumento da permeabilidade dos

vasos sanguíneos fenestrados nutrem o tumor (efeito EPR) (MAEDA,2004; FANG et al., 2011).

Diversas formulações como lipossomas tradicionais, etereamente estabilizados (PEGLados), catiônicos, magnetolipossomas e imunolipossomas, foram especificamente desenvolvidos para associações com medicamentos de interesse, como o paclitaxel. Essas formulações apresentam uma efetividade melhor que formulações dos medicamentos antineoplásicos convencionais (KOULDELKA,2010; CROSASSO et al.,2000; ZHANG et al., 2005; YANG et al., 2007). Além disso, a liberação de rapamicina contidas em lipossomas tem se mostrado de suma importância (HAERI et al., 2011)

Estudos propunham a aplicabilidade de co-encapsulação de paclitaxel e rapamicina em nanolipossomas, como estratégia para tratamentos do câncer (ELOY et al., 2016). Blanco et al. (2014) reportaram a co-encapsulação de paclitaxel e rapamicina em modelos de nanopartículas poliméricas como uma estratégia para obter sinergismo entre fármacos para inibição tumoral. Essa estratégia permitiu liberar fármacos no mesmo local e com quantidades específicas. Neste trabalho, foi relatado pela primeira vez a co-encapsulação de paclitaxel e rapamicina numa formulação lipossomal. Estudos provaram que uma composição baseada em SPC /Chol / DSPE-PEG (2000) permitiu um encapsulamento satisfatório de ambas as drogas, com tamanho de partícula para entrega parenteral de drogas. A formulação mostrou excelente estabilidade coloidal e drogas retidas englobadas, com liberação sustentada e evidente ação de ambas as drogas sinergicamente tanto *in vitro*, em linhagens de células de carcinoma mamário 4T1, como *in vivo*, em Camundongos portadores de tumor 4T1, com promissor controle de crescimento tumoral (ELOY et al. 2016)

A adsorção de anticorpos monoclonais, e seus fragmentos, na superfície de nanocarreadores permite que sejam reconhecidos pelas células cancerosas alvos desses mesmos anticorpos; isso ocorre graças a presença, em sua membrana, de certas e específicas proteínas, que não estão presentes nas células normais. (DANHIER; FERON; PRÉAT, 2010.).

Ao interagir com os receptores das superfícies das células e interferir na transdução de sinais, os anticorpos monoclonais direcionam o sistema dos nanocarreadores à massa tumoral. Ocorre também a regulação da expressão de proto-oncogenes e a alteração dos mecanismos de proliferação celular. (COSTA; SILVA, 2017)

É necessário observar que outros elementos ligantes não imunogênicos, como o ácido fólico e o ferro, têm a capacidade de serem adsorvidos na superfície das

nanopartículas, ligando-se a elas e interagindo com os receptores de transferrina e folato. Esses receptores estão superexpressos nas células de tumores sólidos, devido a alta demanda metabólica das mesmas. Ao inibir esses receptores, ocorre a diminuição do crescimento do tumor. (DANHIER; FERON; PRÉAT, 2010.).

Apesar do crescimento da utilização de anticorpos monoclonais na terapêutica de câncer, os mesmos apresentam a desvantagem de serem macromoléculas que sofrem depuração rápida em tumores. Para contornar essa desvantagem, Wen et al., (2013) descreveram os imunolipossomas, ou seja, um sistema originado da conjugação de anticorpos monoclonais sobre a superfície de nanolipossomas, gerando assim um sistema de automontagem injetável para reter anticorpos IgG em tumores mamários, uma outra abordagem para entrega aumentada usando anticorpos terapêuticos. A parte específica dos anticorpos reconhece os receptores superexpressos nas células do câncer, permitindo a administração direcionada da droga, com consequente entrega seletiva de drogas para células cancerígenas. Esta abordagem, portanto, permite a redução de efeitos colaterais (ELOY et al., 2017).

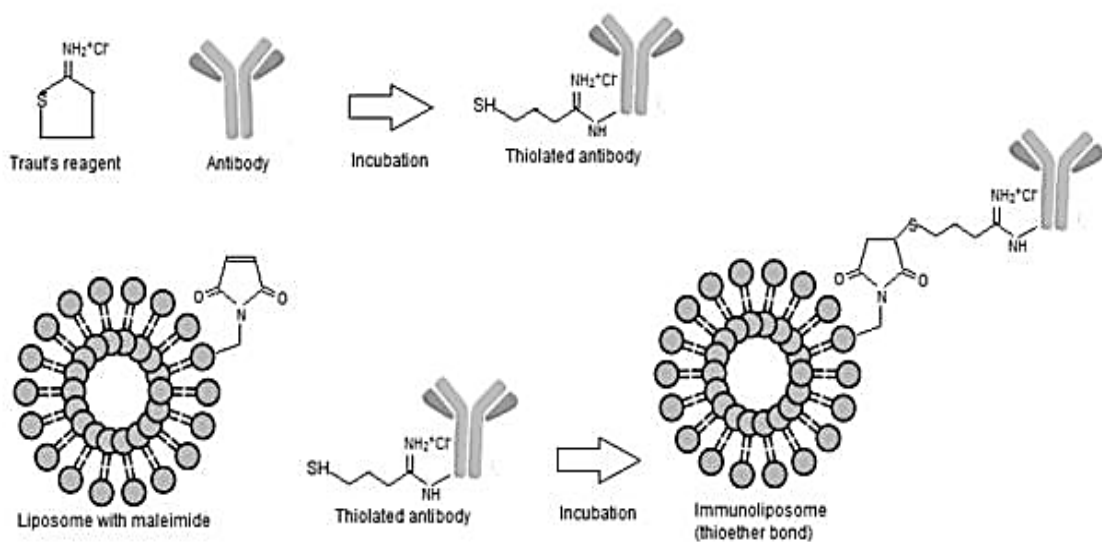
Yang et al. (2007) conseguiram formular imunolipossomas funcionalizados com trastuzumabe carreando paclitaxel, avaliado em modelo murino HER2+ e HER2- e fizeram uma comparação entre os anticorpos e os lipossomas livres com as imunolipossomas englobando o fármaco. O resultado foi que a associação da imunolipossoma com o fármaco melhorou o efeito antitumoral do paclitaxel em tumores HER2+, principalmente em função da endocitose da nanoestrutura mediada por interação anticorpo receptor.

A associação entre os anticorpos com os nanolipossomas necessita que o anticorpo seja inserido na nanolipossoma de forma conjugada, através de ligação covalente entre as cadeias pesadas dos anticorpos e os grupos presentes na superfície do nanolipossoma (PAN, 2007). Vários métodos de associação entre anticorpos monoclonais e nanolipossomas, através do terminal PEG funcionalizado com um grupo quimicamente reativo, como hidrazida N-3, foram relatados, principalmente usando lipídios PEGlados funcionalizados com um grupo terminal quimicamente reativo, como hidrazida N-3-(piridilditio) propionato, maleimida, succinil, entre outros (SCHNYDER, 2004).

Uma das técnicas mais utilizadas para derivatização é a utilização do reagente de Traut, que gera um grupamento tiol no anticorpo, permitindo a ligação covalente através da reação com a maleimida no lípido DSPE-PEG-maleimida (1,2-diestearoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina-N-maleimidapoli(etilenoglicol) 2000 (HUWYLER; WU; PARDRIDGE, 1996;

BARRAJÓN-CATALÁN et al., 2011), demonstrado na Figura 6. ELOY et al. (2017) utilizaram o trastuzumabe tiolado e o conjugaram, com sucesso, ao DSPE-PEG-mal na superfície da bicamada lipídica por ligação covalente. A eficiência de funcionalização correspondeu a 62,78% e 80,49%, respectivamente, para o imunolipossoma em branco e o imunolipossoma carregado com rapamicina, avaliados a quantificação de proteína nas frações imunolipossomas em relação à proteína total.

Figura 6: Representação de nanolipossoma associada ao anticorpo monoclonal através da técnica com reagente de Traut.



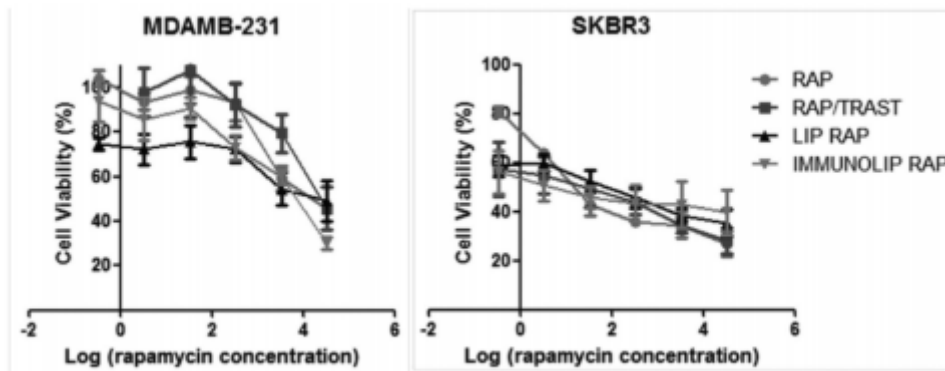
Fonte: ELOY et al., 2017.

SAPHA e SHOR, em 2013, concluíram, através de seus estudos da avaliação pré-clínica de imunolipossomas, que ainda existe um número muito reduzido de imunolipossomas formuladas e testadas. Eloy et al (2017) conseguiram formular e funcionalizar a encapsulação de rapamicina e paclitaxel em imunolipossomas, a integridade do trastuzumabe após funcionalização do lipossoma foi confirmada por SDS-PAGE (Gel de eletroforese dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida) eletroforese sob condições redutoras, o trastuzumabe foi incorporado intacto ao lipossoma superfície, similarmente às observações de Yang et al. (2007), que desenvolveu o trastuzumabe imunolipossomas contendo paclitaxel em sua linha de pesquisa.

A citotoxicidade da rapamicina, trastuzumabe e formulações foram avaliadas *in vitro* nas linhagens celulares MDA-MB-231 que é HER2- e SK-BR-3, que é HER2+. Figura 7.

Curiosamente, o grupo de pesquisa conseguiu observar que a linhagem celular MDA-MB-231 é muito mais resistente a fármaco ou rapamicina lipossômica (ELOY et al., 2017). Zheng et al. (2011) discutiram que a linhagem celular humana MDA-MB-231 é resistente ao tratamento com rapamicina in vitro devido a algumas características que contribuem para o seu mecanismo molecular resistente à rapamicina, incluindo baixa atividade da Akt, alto nível de fosfolipase D (PLD), receptor de estrogênio negativo e baixa expressão de HER2. SK-BR-3 maior sensibilidade à rapamicina pode ser explicada pelo HER2 amplificação que ativa a via de sinalização mTOR.

Figura 7: Curvas de citotoxicidade obtidas por teste de MTT após 120 horas de incubação com rapamicina, trastuzumabe, lipossomos e imunolipossomas em linhagens MDA-MB-231 e SK-BR-3



FONTE: ELOY et al., 2017.

Em geral, para se observar a funcionalização das formulações de nanolipossomas associadas a anticorpos monoclonais e encapsulando um fármaco de interesse necessita de algumas avaliações para serem consideradas funcionais, como o tamanho da partícula e sua polidispersão, e potencial zeta, algumas técnicas como FTIR (Espectroscopia Infravermelha de Fourier), DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial), avaliação da Integridade do Anticorpo por Eletroforese SDS-PAGE e também a avaliação da citotoxicidade da formulação em linhagens de células de interesse, nesse caso de carcinoma mamário como 4T1, SK-BR-3 entre outras.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo da presente pesquisa foi fazer uma descrição da formulação da associação das nanopartículas lipídicas e dos lipossomas, englobando antineoplásicos de interesse, associadas a anticorpo monoclonal, no tratamento do câncer de mama. Utilizando a revisão narrativa, apresentou-se a patogênese e as particularidades da doença, para se abordar as novas tecnologias, apoiadas nas inovações nanobiotecnológicas, de aprimoramento dos tratamentos atualmente disponíveis.

O trabalho mostrou a eficácia do uso de anticorpos monoclonais associados à nanolipossomas, para o sistema de liberação eficiente de fármacos de interesse no combate ao câncer de mama. Essa associação visa, principalmente, abordar os tipos de câncer que apresentam resistência ao tratamento quimioterápico tradicional, os efeitos colaterais adversos e a melhora no prognóstico de câncer de mama em estágios graves. Observa-se também que ainda são poucas as formulações atuais que utilizam dessa tecnologia combinada, isso porque os estudos que buscam demonstrar sua eficácia permanecem em estágio pré-clínicos.

Essa realidade torna-se um incentivo para o desenvolvimento de mais pesquisas sobre o tema, principalmente no Brasil; e demonstra a necessidade de profissionais especializados no aprimoramento de novas tecnologias na área biomédica, tanto para avaliar a eficácia na evolução de medidas tratativas, na adoção de inovações tecnológicas como também seus possíveis efeitos adversos a longo prazo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AHMED, W; SUBRAMANI, K. **Introduction to Nanotechnology** In Nanobiomaterials in Clinical Dentistry. 1ª ed.. Elsevier, Preston, 2012.

ANDRIOLO, A. Marcadores tumorais. **Rev Bras Med**, Brasil, v.53, p.641-53. Jan 1996.

ALEXIS, F; PRIDGEN, E; MOLNAR, L.K; FAROKHZAD, O.C. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, Washington DC, v.5, n.4, p.505-515, Jun-Aug 2008.

ALJADA, A., MOUSA, S.A. Metformin and neoplasia: Implications and indications. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 133, n.1, p. 108-115, Jan. 2012.

ARAÚJO, T. G.Construção de uma biblioteca de anticorpos recombinantes (Fab) anti-carcinoma mamário e obtenção de fragmentos ligantes de antígenos tumorais por phage display. p. 134, 2009.

BARRAJÓN-CATALÁN, E; MENÉNDEZ-GUTIÉRREZ, M.P; FALCÓ, A; SACEDA, M; CATANIA, A; MICOL, V. Immunoliposomes: A Multipurpose Strategy in Breast Cancer Targeted Therapy. Breast Cancer: **Current and Alternative Therapeutic Modalities**. Spain, p.437–452. Nov. 2011.

BATISTA, C; CARVALHO, C; MAGALHÃES, N. Lipossomas e suas aplicações terapêutica: Estado da Arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.43, n.2, p. 167-179. Jun 2007.

BERNARDO, W.M; NOBRE, M.R.C; JATENE, F.B. A prática clínica baseada em evidências: parte II- buscando evidências em fontes de informação. **Revista da associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.50, n.1, p.104-108, Out. 2004.

BERRY, C.C; CURTIS, A.S.G; Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of physics D: Applied Physics**, England, v.36, n.1, p.198-206, Jun 2003.

BIXNER, O; REIMHULT, E. Controlled magnetosomes: embedding of magnetic nanoparticles into membranes of monodisperse lipid vesicles. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v.466, n.1, p.62-71, Mar 2016.

BOULAIZ, H. et al. Nanomedicine: Application areas and development prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, Switzerland, v. 12, n. 5, p. 3303–3321, May 2011.

BLANCO, E. et al. Colocalized delivery of rapamycin and paclitaxel to tumors enhances synergistic targeting of the PI3k/Akt/mTOR pathway. **Molecular Therapy**, San Diego, v.22, n.7, p.1310-1319, Jul. 2014.

CHEN, J; HESSLER, J.A; PUTCHAKAYALA, K; PANAMA, B.K; KHAN, D.P; HONG S et al. Cationic nanoparticles induce nanoscale disruption in living cell plasma membranes. **The Journal of Physical Chemistry**, Washington DC, v.113, n.32, p.11179-11185. Aug 2009.

CHOI, H.S; LIU, W; MISRA, P; TANAKA, E; ZIMMER, J.P; ITTY IPE, B; BAWENDI, M.G; FRANGIONI, J.V.. Renal clearance of quantum dots. **Nature Biotechnology**, New York, v.25, n.10, p.1165-1170, Oct, 2007.

COELHO, J.M. **Nanocápsulas com núcleo de óleo de rícino e invólucro de poli (metil vinil co-anidrido maleico) contendo doxorubicina: Desenvolvimento e avaliação da sua atividade citotóxica contra células de câncer de mama humano e murinho *in vitro***. Brasília, 2017. 96f. Dissertação de mestrado (M) - Universidade de Brasília/ Instituto de Ciências Biológicas, 2017.

CORDEIRO, A.M, *et al*. Revisão sistemática: uma revisão narrativa. **Revista do Colégio Brasileiro de cirurgões**, Rio de Janeiro, v.34, n.6, p.428-431, Nov/Dez. 2007.

COSTA, A. M; SILVA, V.V. Estratégias nanotecnológicas para diagnóstico e tratamento do câncer. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, Tres Lagoas, v.5, n.2, p.1-13, Ago/Dez 2017.

CROSASSO, P., *et al*. Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposome. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam v.63, n.1, p. 19-30, Jan.2000

DANHIER, F; FERON, O; PRÉAT, V. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v.148, n.1, p.135-146. Dec. 2010.

DEL DEBBIO, C.; TONON, L.; SECOLI, S. Terapia com anticorpos monoclonais: uma revisão de literatura. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, Rio Grande do Sul, v. 28, n. 1, p. 133–142, 2007.

EDWARDS, K. A.; BAEUMNER, A. J. Liposomes in analyses. **Talanta**, London, v. 68, n.5, p.1432-1441, Feb. 2006.

EISENBERG, A. L. A.; KOIFMAN, S. Câncer De Mama : Marcadores Tumorais. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 4, p. 377–388, Jan 2001.

ELOY, J.O.; PETRILLI, R.; BRUEGGEMEIER, R.W.; MARCHETTI, J.M.; LEE, R.J. Rapamycin-loaded Immunoliposomes Functionalized with Trastuzumab: A Strategy to Enhance Cytotoxicity to HER2-positive Breast Cancer Cells.**Anticancer Agents Med Chem**, San Francisco, CA,v.17, n.1, p.48-56, Jan. 2017.

ENGEL, R.H, KAKLAMANI, V.G. HER2-positive breast cancer: Current and future treatment strategies. **Drugs**. New Zealand, v.67, n.9, p.1329–1341. jan. 2007.

FANG, H. *et al*. The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v.63, n.3, p.136-151, Mar. 2011.

FRICZUK, M., NOWIS, D. GOLAB, J. *PDT*- Induced inflammatory and host responses. **Photochemical Photobiological Sciences**, Cambridge, v.10, n.5, p.653-663, May 2011.

GHERSI, D. *et al*. Taxane containing regimens for metastatic breast cancer. **Cochrane database of systematic reviews**, Oxford, v.3, n.6, p.3003, Jun. 2015.

GUARNERI, V; CONTE P.F. The curability of breast cancer and the treatment of advanced disease. **Europe Journal of nuclear medicine and molecular imaging**, Berlin, v.31, n.1, p.149-161, Jan.2004.

GUPTA, G.P; MASSAGUÉ, M. Cancer metastasis: building a framework. **Cell Press**, Cambridge, v.127, n.4, p. 679-695, Nov. 2006.

- HADDAD, C. F. Trastuzumab no câncer de mama. **FEMMA**, Lavras-MG, v.38, n.2, P. 73-78, Fev. 2010.
- HAERI, A., et al. Use of remote fim loading methodology to entrap sirolimus into liposomes: preparation, characterization and *in vivo* efficacy for treatment of restenosis. **International Journal of Pharmaceutics** Amsterdam, v.414, n.1, p.16-27, Jul.2011.
- HAHN, E.C. **Mutação germinativa TP53 p.Arg337His e câncer de mama : Análise de prevalência em uma série de pacientes provenientes de um hospital público do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, 2017. Dissertação de mestrado do Instituto de Biociências- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.
- HANSEL, Donna E., DINTZIS, Renee Z. **Fundamentos de Rubin - Patologia**. ed.1. São Paulo: Guanabara Koogan, 2006.
- HUWYLER, J; WU, D; PARDRIDGE, W.M. Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, n.24, p.14164–14169. Jan. 1996.
- INCA (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER). **Câncer de mama estimativas 2018**.Disponível:<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama>. Acesso em: 08 de Ago. 2017.
- JOHNSTON, S.R.D. The role of chemotherapy and targeted agents in patients with metastatic breast cancer. **European Journal of Cancer**, Oxford, v.11, n. 38, p.70145-70149, Sep. 2011.
- KAWASAKI, E.S; PLAYER, A. Nanotechnology, nanomedicine and the development of new, effective therapies for cancer. **Nanomedicine**, Maryland, v.1, n.2, p.101-109, June 2005.
- KOUDELKA, S. et al. Liposomes with high encapsulation capacity for paclitaxel: preparation, characterization and in vivo anticancer effect. **Pharmaceutical Sciences**,United States v.99, n.5, p. 2309-2319, May.2010.
- LADEIRA. K.M; MARTINS. S.F.F. Impacto prognóstico do número de linfonodos ressecados na sobrevida de pacientes com câncer colorretal. **Journal of Coloproctology**, Rio de Janeiro, v.16, n.3, p.130-138, 2016.
- LASIC, D. D. **Liposomes: from physics to applications**. 1ª ed. Elsevier Science Publishers: Amsterdam, cap.3,p.63-90, 1993.
- LAURENT. S; FORGE. D; PORT. M; ROCH. A; ROBIC .C; ELST, L.V; MULLER, R.N. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. **Chemical Reviews**, United States, v.108, n.6, p. 2064-2111, June 2008.
- LIM, E; JANG, E; LEE, K; HAAM, S; HUH, Y. Delivery of cancer therapeutics using nanotechnology. **Pharmaceutics**, Switzerland, v.5, n.2, p.294-317. Jun 2013.
- LONG, N.V; YANG, Y; TERANISHI, T; THI C.M; CAO, Y; NOGAMI, M. Biomedical applications of advanced multifunctional magnetic nanoparticles. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, United States, v.5, n.12, p.10091-10107, Dec 2015.
- MAEDA, N. et al. Anti-neovascular therapy by use of tumor neovasculature-targeted long circulating liposome. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v.100, n.1, p.41-52, Jan. 2004.

MEHNERT, W; MADER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Adv Drug Deliv Rev**, Amsterdam, v.47, n.2-3, p.165-196, April 2001.

MIJAN, M. C. **Terapia fotodinâmica mediada por alumínio-cloro-ftalocianina em formulação lipossomal no tratamento de câncer de mama in vitro e in vivo: mecanismos de ação e perfil imuno estimulatório**. Brasília, 2012. 87f. Dissertação de mestrado (M) – Universidade de Brasília/ Faculdade de Ciência da Saúde, 2012.

MOREIRA, J. R. L. **A nanotecnologia na liberação controlada de fármacos no tratamento do câncer de mama**. Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico na faculdade de Ceilândia. Brasília, 2013.

NAZÁRIO, A.C.P.; REGO, M.F.; OLIVEIRA, V.M. Nódulos benignos da mama: uma revisão dos diagnósticos diferenciais e conduta. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Brasil, v.29, n.4, p.211-219, Jan. 2007.

OLIVEIRA, L.C.; TAVEIRA, E.J.F.; SOUZA, L.G.; MARRETO R.N.; LIMA, E.M.; TAVEIRA, S.F. Aplicações das Nanopartículas Lipídicas no Tratamento de Tumores Sólidos: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 4, p. 695-701, Maio 2012.

PAN, Y; NEUSS, S; LEIFERT, A; FISCHLER, M, WEN F, SIMON U et al. Size dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. **Small**, Germany, v.3, n.11, p.1941-1949, Nov 2007.

PAN, X.; WU, G.; YANG, W.; BARTH R.F.; TJARKS, W.; LEE, R.J. Synthesis of cetuximab-immunoliposomes via cholesterol-based membrane anchor for targeted delivery of a neutron capture therapy (NCT) agent to glioma cells. **Bioconjugate Chemistry**, Washington D.C., v.18, n.1, p.101–108. Aug. 2009.

PEIXOTO, R.C. *et al.* Antitumor effect of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles on mice bearing breast cancer: a systemic toxicity assay. **Tumor Biology**, Thousand Oaks, v.36, n.5, p.3325-3336, May 2015.

PETROS, R.A; DE SIMONE, J.M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v.9, n.1, p.615-627, Aug 2010.

PREISS, M.R; BOTHUN, G.D. Stimuli-responsive liposome-nanoparticle assemblies. **Expert Opinion on Drug Delivery**, London, v.8, n.8, p.1025-1040, Aug 2011.

RAMIÃO, N. G. *et al.* Biomechanical properties of breast tissue, a state-of-the-art review. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology**, Germany, v. 15, n. 5, p. 1307–1323, Oct. 2016.

REZENDE, R.R.; SOCCOL, R.C. **Biotecnologia aplicada à saúde: Fundamentos e aplicações**, volume 2. 1ª edição, São Paulo: Blucher, 2015

SAGRISTÁ, M. L.; MORA, M.; MADARIAGA, M. A. Surface modified liposomes by coating with charged hydrophilic molecules. **Cell. Mol. Biol. Lett.**, Washington, v. 5, n.1, p. 19-33, Mar.2000.

SAPHA, P., SHOR, B. Monoclonal antibody-based therapies in cancer: Advances and challenges. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v.138, n.3, p. 452-469, Jul.2013.

SIHORKAR, V.; VYAS, S. P. Potential of polysaccharide anchored liposomes in drug delivery, targeting and immunization. **J. Pharm. Sci.**, Hoboken, v. 4, n. 2, p. 138-158, 2001.

SILVEIRA, L. A. **Princípios dos agentes antineoplásicos** In: GUIMARÃES, J. R. Q. Manual de oncologia, 3ª Ed. São Paulo: BBS, 2008. Cap.14.

- SCHNYDER, A.; KRÄHENBÜHL, S.; TÖRÖK, M.; DREWE, J.; HUWYLER, J. Targeting of skeletal muscle in vitro using biotinylated immunoliposomes. **Biochemical. Journal**, London, v.377, n.1, p.61–67, Jan.2004.
- SZVARÇA et al. Regras De Associação Temporal Em Câncer De Mama. **Revista de Engenharia e Tecnologia**, v. 7, n. 4, p. 84–90, 2015.
- TAI, W, MAHAT, R, CHENG, K. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. **J. Control. Release**. Netherlands, v.146, n. 3, p.264–275. Sep. 2010.
- TORCHILIN, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carrier. **Nature Rev. Drug Disc.**, London, v. 4,n.2, p. 145-160, Feb.2005.
- UCHEGBU, I.F. Pharmaceutical nanotechnology: polymeric vesicles for drug and gene delivery. **Expert Opin Drug Deliv**, London, v.3, n.5, p 629-640, Sep. 2006.
- WEN, Y; KOLONICH, H.R; KRUSZEVSKY, K.M; GIANNOUKAKIS, N; GAWALT, E.S; MENG, W.S. Retaining Antibodies in Tumors with Self-Assembling Injectable System. **Molecular Pharmaceutics**, Washington D.C. ; v.10, n.3, p.1035–1044, Mar. 2013.
- WOLINSKY, J.B; COLSON, Y.L; GRINSTAFF, M.W. Local drug delivery strategies for cancer treatment: gels, nanoparticles, polymeric films, rods, and wafers. **J Control Release**, Netherlands, v. 159, n.1, p.14-26, Apr. 2012.
- WONG, H.L; BENDAYON, R; RAUTH, A.M; LI, Y; WU, X.Y. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. **Adv Drug Deliv Rev**, Amsterdam, v.59, n.6, p.491-504, Jul. 2007.
- WONG, H.L; CHATTOPADHYAY, N; WU, X.Y; BENDAYAN, R. Nanotechnology applications for improved delivery of antiretroviral drugs to the brain. **Adv Drug Deliv Ver**, Amsterdam, v. 62, n.4-5, p.503-517, Mar. 2010.
- VEMURI, S.; RHODES, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharm. Acta Helvetica**, Berne, v. 70,n.2, p.95-111, Jul.1995.
- VICIER, C. et al. Clinical development of mTOR inhibitors in breast cancer. **Breast Cancer Research**, London, v.16, n.1, p.203. Feb. 2014.
- VIEIRA, B. D; GAMARRA, F.L. Avanços na utilização de nanocarreadores no tratamento e no diagnóstico de câncer. **Einstein**, São Paulo, v.14, n.1, p.99-103, Jan. 2016.
- YANG, T. et al. Antitumor effect of paclitaxel-loaded PEGylated immunoliposome against Human Breast cancer cells. **Pharmaceutical Research**, New York, v.24, n.12, p.2402-2422, Dec. 2007.
- ZAHR, A.S; DAVIS, C.A; PISHKO, M.V. Macrophage uptake of core-shell nanoparticles surface modified with poly (ethylene glycol). **Langmuir**, Washington DC, v.22, n.19, p.8178-8185, Sep 2006.
- ZENG, Q. YANG, Z. GAO, Y.J, YUAN, H., CUI, K., SHI, Y., WANG, H., HUANG, X., WONG, S.T., WANG, Y., KESARI, S.,JI R.R., XU, X. Treating triple-negative breast cancer by a combination of rapamycin and cyclophosphamide: An in vivo bioluminescence imaging study. **Europ. J. Cancer**. Oxford, v.46, p.1132– 1143. Jan. 2010.
- ZHANG, J.A., et al. Development and characterization of a novel cremophor EL free liposome based paclitaxel (LEP-ETU) formulation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v.59, p.177-187, Jan. 2005.

