

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ENCAPSULAÇÃO DE DITOSILATO DE LAPATINIBE EM NANOCÁPSULAS
MULTIPAREDE FUNCIONALIZADAS COM O ANTICORPO TRASTUZUMABE:
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL**

DANIELI ROSANE DALLEMOLE

PORTO ALEGRE, 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Encapsulação de ditosilato de lapatinibe em nanocápsulas multiparede funcionalizadas com o anticorpo trastuzumabe: avaliação da atividade antitumoral

Tese apresentada por **Danieli Rosane Dallemole**
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em
Ciências Farmacêuticas

Orientador (a): Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

Coorientador (a): Profa. Dra. Karina Paese

Porto Alegre, 2023

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em Nível Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27 de fevereiro de 2023, pela banca examinadora constituída por:

Profa. Dra. Aline Ferreira Ourique

Universidade Franciscana – UFN

Profa. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna

Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Profa. Dra. Monique Deon

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA

Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

CIP - Catalogação na Publicação

Dallemole, Danieli Rosane
Encapsulação de ditosilato de lapatinibe em nanocápsulas multiparede funcionalizadas com o anticorpo trastuzumabe: avaliação da atividade antitumoral / Danieli Rosane Dallemole. -- 2023. 228 f.
Orientador: Adriana Raffin Pohlmann.

Coorientador: Karina Paese.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Câncer de mama. 2. anticorpo monoclonal. 3. inibidores de receptores tirosina quinase . 4. nanopartículas. I. Pohlmann, Adriana Raffin, orient. II. Paese, Karina, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Sistemas Nanoestruturados para Administração de Fármacos, Lab. 405, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; no Laboratório de Biotecnologia do Câncer da Universidade Federal de Pelotas e no Laboratório de Sinalização Celular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O projeto foi desenvolvido com financiamento do CNPq e FAPERGS e o autor recebeu bolsa de estudos da CAPES.

Dedicatória: Dedico esse trabalho aos meu pais, Ari e Natalina, e ao meu amigo e namorado, Fernando.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente às professoras Adriana Raffin Pohlmann e Karina Paese pela orientação, pela oportunidade, pelo incentivo e ensinamentos ao longo do mestrado e do doutorado.

Às professoras Silvia Guterres e Luiza Frank, e ao professor Vladimir Lavayen pelo incentivo e contribuições para elaboração do trabalho.

Ao professor Tiago Collares, à professora Fabiana Seixas, e aos colegas de laboratório Bruna, Camila, Fernanda e Lucas que me acolheram na Universidade Federal de Pelotas e me ajudaram a executar os experimentos.

Ao professor Guido Lenz, e aos colegas do Labsinal, em especial à Daphne e à Luiza pelos ensinamentos, incentivo e ajuda durante o desenvolvimento do trabalho.

À professora Irene Guerrero por me supervisionar no estágio docente e por toda a troca de experiência nesse período.

Agradeço à UFRGS, CAPES, FAPERGS e CNPq pela infraestrutura e recursos financeiros.

Agradeço aos professores que participaram como banca do exame de qualificação e da defesa de tese pela disponibilidade em participar da avaliação do trabalho, pelas sugestões, discussões e troca de experiência.

Aos colegas do Lab 405! Vocês deixaram meus dias mais leves com as brincadeiras, os abraços, as conversas e com os inúmeros cafés. Também me ajudaram muito a crescer como pessoa e como profissional! Tenho um carinho enorme por cada um de vocês!

Agradeço as minhas “companheiras de experimentos e discussões científicas”: Aline, Taiane, Bárbara, Priscilla e Samanta pelo carinho, incentivo e pela palavra amiga em todas as horas.

Ao meus pais, Natalina e Ari, que não mediram esforços para que eu pudesse chegar até aqui, que me confortaram nos momentos mais difíceis, vibraram com as minhas vitórias e compreenderam a minha ausência! Eu amo vocês!

Ao meu amor, Fernando. Sem você o caminho até aqui não seria tão divertido!

À minha família, em especial aos meus irmão e sobrinhos, por todo amor, carinho e apoio.

Agradeço imensamente aos meus amigos, pelo incentivo, pelo ombro nas horas difíceis, e por todos os momentos felizes que passamos juntos.

RESUMO

Primeiramente, o objetivo desta tese foi realizar um levantamento bibliográfico sobre as aplicações biológicas das nanocápsulas de núcleo lipídico. Essa pesquisa resultou na elaboração de um artigo de revisão que contempla detalhes importantes sobre fatores metodológicos que influenciam nas características físico-químicas das nanocápsulas de núcleo lipídico, sua estrutura supramolecular, estratégias de marcação fluorescente e modificação de superfície. Posteriormente, desenvolvemos nanocápsulas de núcleo lipídico multiparede contendo o fármaco ditosilato de lapatinibe e funcionalizadas com anticorpo trastuzumabe (LAP-LNC⁺-TRAS), ambos inibidores do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico 2 (HER2). Além disso, avaliamos o seu potencial antitumoral *in vitro*, frente a linhagens de câncer de mama HER2 positivo. Isso porque, cerca de 20 a 30% dos cânceres de mama apresentam superexpressão HER2, os quais são caracterizados por serem invasivos e metastáticos. Nesse sentido, a formulação foi preparada por deposição interfacial de polímero pré-formado, seguido de revestimento com quitosana e complexação organometálica (utilizando Zn²⁺ como íon metálico) com trastuzumabe (LAP-LNC⁺-TRAS). A partir de um estudo de pré-formulação foi definida a concentração de anticorpo (200 µg mL⁻¹) adequada para manter a estabilidade físico-química da partícula. Além disso, LAP-LNC⁺-TRAS apresentou formato esférico, com diâmetro médio <200 nm e baixa polidispersividade. O potencial zeta foi positivo, o teor de fármaco e a eficiência de encapsulação registrados foram próximos a 100%. A complexação do anticorpo à partícula foi verificada por cromatografia em papel. Modos vibracionais característicos das matérias-primas que compõem a formulação foram observados por FT-IR, além de alterações no entorno químico das partículas após a complexação com o anticorpo, demonstrando a interação do trastuzumabe com o sistema. *In vitro*, a formulação desenvolvida reduziu a viabilidade celular da linhagem SKBR3 (HER2 positivo). No ensaio de captação celular, a presença do anticorpo na superfície da partícula mostrou-se importante para o direcionamento e internalização do corante lipofílico incorporado às nanocápsulas. Embora a formulação desenvolvida tenha reduzido a viabilidade celular na linhagem HCC1954 (HER2 positiva, intrinsecamente resistente a inibidores de tirosina quinase) um efeito semelhante foi observado para formulações que não continham ditosilato de lapatinibe e trastuzumabe. O tratamento com LAP-LNC⁺-TRAS não alterou a expressão gênica de genes relacionados a morte celular por apoptose na linhagem HCC1954. Também verificamos que LAP-LNC⁺-TRAS é estável em fluidos gástrico e intestinal simulados, sendo que a presença do revestimento com quitosana foi importante para a manutenção do diâmetro de partícula. Esses achados abrem caminho para uma possível administração oral dessa partícula, além da via

intravenosa. Em conclusão, demonstramos a viabilidade de obtenção da formulação LAP-LNC⁺-TRAS, ora inédita, e que apresenta a vantagem de combinar, em um mesmo nanocarreador, dois inibidores de HER2. Ademais, evidenciamos o potencial de LAP-LNC⁺-TRAS para o direcionamento ativo de fármacos e a sua utilização como uma possível estratégia para melhorar o tratamento do câncer de mama HER2 positivo. Consequentemente, esta partícula merece uma investigação mais aprofundada em novos estudos pré-clínicos.

Palavras-chave: Câncer de mama; anticorpo monoclonal; inibidores de receptores tirosina quinase; nanopartículas.

ABSTRACT

Encapsulation of lapatinib ditosylate in multi-wall nanocapsules functionalized with trastuzumab antibody: evaluation of anti-tumor activity

Firstly, the objective of this thesis was to conduct a comprehensive bibliographic survey about the biological applications of lipid-core nanocapsules. This research resulted in a review article that includes important details on methodological factors that influence the physicochemical characteristics of lipid-core nanocapsules, their supramolecular structure, fluorescent labeling strategies, and surface modification. Subsequently, we developed multiwall lipid-core nanocapsules containing the drug lapatinib ditosylate and functionalized with trastuzumab antibody (LAP-LNC⁺-TRAS), both inhibitors of epidermal growth factor 2 (HER2) receptor type 2. Additionally, we evaluated their antitumor potential *in vitro* against HER2-positive breast cancer cells. This is because about 20 to 30% of breast cancers overexpressed HER2 and are characterized by being invasive and metastatic. In this sense, the formulation was prepared by interfacial deposition of preformed polymer, followed by coating with chitosan and organometallic complexation (using Zn²⁺ as metallic ion) with trastuzumab (LAP-LNC⁺-TRAS). Based on a pre-formulation study, the concentration of antibody (200 µg mL⁻¹) appropriated to maintain the physicochemical stability of the particle was defined. Furthermore, the LAP-LNC⁺-TRAS exhibited a spherical shape, with an average diameter <200 nm and low polydispersity. The zeta potential was positive, the drug content and encapsulation efficiency recorded were close to 100%. The complexation of the antibody to the particle surface was confirmed by paper chromatography. FT-IR analysis revealed vibrational modes characteristic of the formulation's raw materials, and changes in the chemical environment of the particles after antibody complexation demonstrated the interaction between trastuzumab and the system. *In vitro*, the developed formulation reduced the cell viability of the SKBR3, a HER2-positive cell line. The presence of the antibody on the particle surface proved to be crucial for targeting and internalizing the lipophilic dye incorporated into the nanocapsules, as observed in the cellular uptake assay. Although the developed formulation reduced cell viability in the HCC1954 cell line (HER2 positive and intrinsically resistant to tyrosine kinase inhibitors), a similar effect was observed for formulations not containing lapatinib ditosylate and trastuzumab. Furthermore, treatment with LAP-LNC⁺-TRAS did not alter gene expression of genes related to cell death to apoptosis (HCC1954 cell line). We also verified that LAP-LNC⁺-TRAS is stable in simulated gastric and intestinal fluids, and the presence of the chitosan

coating was important for the maintenance of the particle diameter. These findings present the possibility of oral administration of this particle, besides to the intravenous route. In conclusion, we demonstrate the feasibility of obtaining the LAP-LNC⁺-TRAS formulation, an innovative nanocarrier that combines two HER2 inhibitors within the same nanocarrier. Moreover, we demonstrate the potential of LAP-LNC⁺-TRAS for active drug targeting, highlighting its potential as a strategy for improving the treatment of HER2-positive breast cancer. Consequently, this particle warrants further investigation in pre-clinical studies.

Keywords: Breast cancer, monoclonal antibody, receptor tyrosine kinase inhibitors, nanoparticles.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1. Câncer de mama: epidemiologia e fatores de risco.....	22
2.2. Características estruturais da mama.....	23
2.3. Classificação dos cânceres de mama.....	25
2.4. Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano - HER2.....	28
2.5. Tratamentos anti-HER2.....	31
2.6. Trastuzumabe.....	32
2.7. Lapatinibe.....	35
2.8. Combinação de trastuzumabe e tapatinibe dos ensaios <i>in vitro</i> aos ensaios clínicos.....	37
2.9. Nanopartículas como ferramenta alternativa para direcionamento de fármacos para o tratamento do câncer de mama: lapatinibe e trastuzumabe.....	38
3. OBJETIVOS	41
3.1. Objetivo Geral.....	42
3.2. Objetivo Específico.....	42
4. CAPÍTULO 1	43
5. CAPÍTULO 2	121
6. CAPÍTULO 3	153
7. CAPÍTULO 4	181
8. DISCUSSÃO GERAL	209
9. CONCLUSÕES	213
10. PERSPECTIVAS	215
11. REFERÊNCIAS	217
12. APÊNDICE	227

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os primeiros relatos de câncer de mama datam de 3.500 a.C.. Desde então, têm sido investigada a biologia do câncer de mama, fatores genéticos e ambientais que influenciam no seu desenvolvimento, além de formas de tratamentos. Descobertas importantes foram feitas ao longo das últimas décadas permitindo que técnicas cirúrgicas, radioterapia, quimioterapia e terapias-alvo estejam disponíveis para o tratamento do câncer de mama (LUKONG, 2017).

Além do tratamento, várias campanhas incentivam a realização de exames de rotina e o autoexame da mama, o que auxilia no diagnóstico precoce da doença, aumentando as chances de sobrevivência (WHO, 2020). Contudo, o câncer de mama ainda é um grave problema de saúde pública, sendo a neoplasia maligna mais frequente e com maior letalidade no sexo feminino atualmente (GLOBOCAN, 2022; HARBECK et al., 2019).

Com o advento de técnicas de biologia molecular e a elucidação de características moleculares do câncer, o câncer de mama passou a ser classificado de acordo com a expressão de biomarcadores. Tais biomarcadores são utilizados como prognóstico e como alvos terapêuticos. Os principais marcadores encontrados no câncer de mama são: receptor de estrogênio, receptor de progesterona e receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2). Ainda, a ausência desses marcadores caracteriza um tipo de tumor denominado como triplo negativo (BROSNAN, ANDERS, 2018).

O HER2 é um receptor de membrana da família dos receptores de tirosina quinase, superexpresso em 20% a 30% dos cânceres de mama (ZHAO et al., 2021). Esse receptor desempenha um papel na transdução de sinal do exterior para o interior celular, sendo capaz de ativar fatores de transcrição relacionados como proliferação celular, sobrevivência, diferenciação, angiogênese, invasão e por consequência, metástase (GUTIERREZ, SCHIFF, 2011). Dessa forma, tumores de mama que apresentam superexpressão de HER2 possuem um prognóstico ruim pois, são altamente invasivos e estão relacionados com processos metastáticos (BROSNAN, ANDERS, 2018). No entanto, cânceres com essa característica podem se beneficiar de terapias-alvo.

Entre o arsenal terapêutico existente para o câncer de mama HER2 positivo está o fármaco lapatinibe e o anticorpo monoclonal trastuzumabe. O trastuzumabe foi o primeiro anticorpo de uso terapêutico direcionado a um produto de um oncogene a ser aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 1998 (LUKONG, 2017). Esse anticorpo reconhece

a porção extracelular do receptor HER2, enquanto que o lapatinibe é um inibidor reversível de EGFR e HER2 que atua na porção intracelular desses receptores. Devido a esse caráter complementar contra HER2, ambos têm sido aplicados na prática clínica na tentativa de melhorar os desfechos do câncer de mama (XU et al., 2017). Apesar da associação entre lapatinibe e trastuzumabe ser promissora, efeitos colaterais são relatados. Além disso, para a administração do trastuzumabe é necessário um profissional capacitado e condições clínico-hospitalares adequadas (WALLER, MÖBIUS, FUENTES-ALBURO, 2021).

Diante dessas limitações e com o advento da nanotecnologia, nanocarreadores vêm sendo desenvolvidos a fim de transpor barreiras biológicas e proporcionar a entrega de fármacos no sítio-alvo, bem como, visando a redução dos efeitos adversos. Ainda, o emprego de nanopartículas para vetorização de fármacos pode melhorar a biodisponibilidade dos mesmos, resultando na redução da dose efetiva. Ainda, o uso dessa tecnologia pode contribuir para reduzir a degradação do fármaco em meios biológicos e favorecer o desenvolvimento de diferentes formas farmacêuticas, possibilitando vias de administração distintas (BONDE et al. 2018; MEEL et al., 2013).

Entre os nanocarreadores, nanocápsulas de núcleo lipídico têm apresentado resultados promissores como carreadores de fármacos, incluindo atividade antineoplásica em modelo *in vitro* de câncer de mama. Nesse sentido, nanocápsulas de núcleo lipídico contendo éster dietílico de metotrexato foram capazes de provocar efeito citotóxico, via apoptose, em células de câncer de mama (linhagem MDA-MB-231 - triplo negativo) resistentes ao fármaco metotrexato (YURGEL et al. 2014). Outro estudo pré-clínico demonstrou um efeito antiproliferativo das nanocápsulas de núcleo lipídico contendo doxorubicina frente a outra linhagem de câncer de mama (MCF-7) (ANTONOW et al., 2017).

As nanocápsulas de núcleo lipídico também são passíveis de comportar ligantes em sua superfície, via complexação organometálica (BENDER et al., 2014). Dessa forma, nanocápsulas funcionalizadas com bromelina apresentaram um efeito antiproliferativo mais acentuado em células MCF-7 do que a bromelina em solução (OLIVEIRA et al., 2017). Nanocápsulas funcionalizadas com o tripeptídeo arginina glicina ácido aspártico (RGD) e contendo doxorubicina também apresentaram capacidade antitumoral frente células de câncer de mama (ANTONOW et al., 2018). Ainda, as nanocápsulas de núcleo lipídico contendo metotrexato (ou seu éster dietílico) encapsulado e também como ligante na superfície da partícula, mostraram-se seletivas e aumentaram o efeito citotóxico em células de câncer de mama com superexpressão de receptores de folato (MCF-7) (OLIVEIRA et al., 2018).

Além disso, as nanocápsulas de núcleo lipídico foram empregadas na encapsulação de ditosilato de lapatinibe, obtendo altas taxas de eficiência de encapsulação e diâmetro adequado para estudos pré-clínicos (CEOLIN, 2016). Neste contexto, a hipótese desse trabalho está centrada no desenvolvimento de nanopartículas de núcleo lipídico multiparede contendo ditosilato de lapatinibe e funcionalização de superfície com o anticorpo trastuzumabe, visando atividade antitumoral *in vitro* frente às células de câncer de mama HER2 positivo. A utilização de ditosilato de lapatinibe e trastuzumabe em combinação já é explorada como tratamento de câncer de mama HER2 positivo, no entanto a combinação do fármaco e do anticorpo em uma mesma partícula é inédita. O desenvolvimento desse sistema pode contribuir para o direcionamento ativo do fármaco, além de contar com a atividade antitumoral do anticorpo adicional ao lapatinibe. Outra vantagem do uso das nanocápsulas de núcleo lipídico como nanocarreador é a ampliação das possibilidades de vias de administração (por exemplo, intravenosa e/ou oral).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Câncer de mama: epidemiologia e fatores de risco

O câncer está entre as principais causas de mortes prematuras (entre 30-70 anos de idade) em todo em mundo. No Brasil, essa doença é considerada a segunda causa de morte, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares (BRAY et al., 2021). Dados do Observatório Global do Câncer (GLOBOCAN) apontam que ocorreram 19.3 milhões de novos casos e cerca de 10 milhões de mortes por câncer em 2020, em todo o mundo. Entre os tipos de cânceres com maior incidência, para ambos os sexos, estão câncer de mama, pulmão, colorretal, próstata, e câncer de estômago (GLOBOCAN, 2022, SUNG et al., 2021).

Curiosamente, no ano de 2020 a incidência do câncer de mama ultrapassou o câncer de pulmão e representa 11,7% de todos os casos de câncer (2,3 milhões de novos casos) (**Figura 1A**), esse tipo de câncer também configura como a quinta causa de morte (6,9% - 685.000 aproximadamente) quando considerados ambos os sexos (**Figura 1B**) (GLOBOCAN, 2022; SUNG et al., 2021). Em relação ao sexo feminino, o câncer de mama é a neoplasia maligna mais frequente e com maior letalidade (GLOBOCAN, 2022; HARBECK et al., 2019).

Contudo, a incidência de câncer de mama é maior em países desenvolvidos, o que pode estar associado a maior exposição à fatores de risco, assim como, ao acesso à formas de detecção precoce. Por outro lado, as maiores taxas de mortalidade ocorrem em países em desenvolvimento (HARBECK et al., 2019, SUNG et al., 2021), fato que é associado a detecção tardia e conseqüentemente, em estágio mais avançados da doença.

No Brasil, a estimativa de novos casos é de 66.280 para cada ano do triênio 2020-2022 (INCA, 2019). A exemplo do que ocorre em outros países em desenvolvimento, no Brasil uma parte importante dos casos de câncer mama têm sido identificados em estágios tardios da doença (III e IV), apesar da existência de campanhas para diagnóstico precoce e o fornecimento de exames pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (BRETAS, RENNA, BINES 2021, SÁ, 2021). Vale ressaltar que entre as dificuldades relacionadas ao diagnóstico e tratamento do câncer de mama também se encontram a vasta extensão territorial do país e a desigualdade na disponibilização de recursos (humanos e financeiros) para essa finalidade. Ainda, há um outro inconveniente na rede pública de saúde brasileira que é a necessidade do paciente se deslocar entre as unidades de consulta, diagnóstico e tratamento (BRETAS, RENNA, BINES 2021).

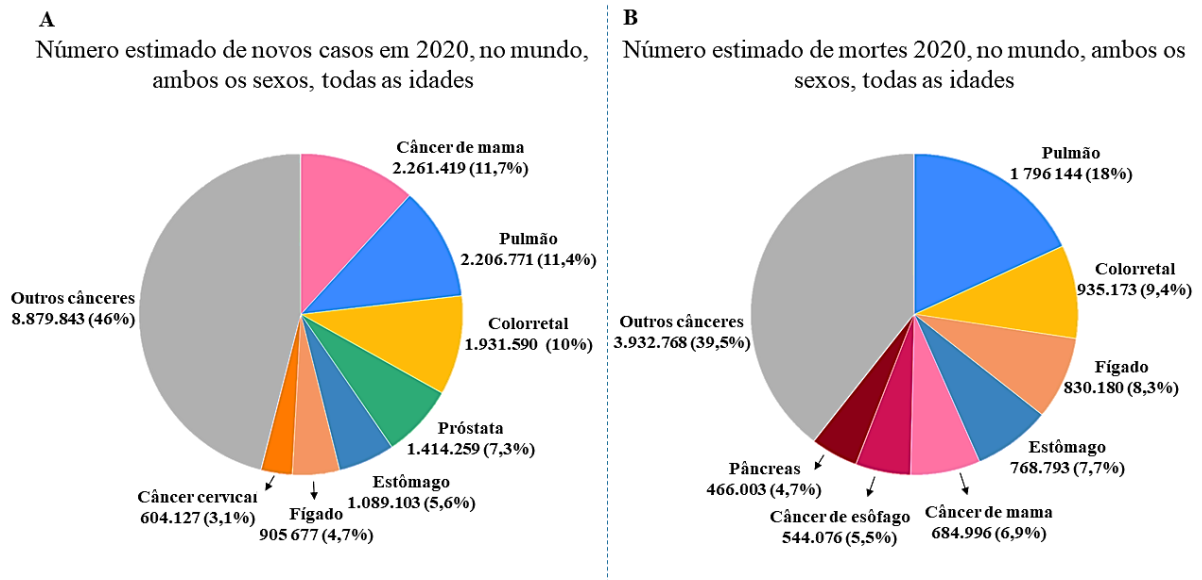


Figura 1: (A) Incidência de câncer na população mundial em 2020; (B) Número estimado de óbitos devido ao câncer em 2020 na população mundial. **Fonte:** GLOBOCAN, 2022.

Aliado a isso, a pandemia pelo SARS-CoV 2 (COVID 19) pode ter um impacto negativo no diagnóstico do câncer de mama e de outras doenças. Um estudo realizado entre 2019-2020 demonstrou que houve uma redução de 42% no número de mamografias entre as mulheres na faixa etária de 50 a 69 anos atendidas pelo SUS (dados de exames realizados fora da rede pública não foram contabilizados). Esse resultado foi acompanhado do aumento no número de mulher com nódulos palpáveis (cerca de 7%) (BESSA, 2021). No entanto, o real impacto dessa redução no diagnóstico será observado nos próximos anos.

Em relação aos fatores de risco, os casos de câncer de mama estão associados a fatores hereditários em 10% dos casos (LOIBL et al., 2021). No entanto, o estilo de vida (falta de atividade física, obesidade, ingestão de bebidas alcoólicas, uso de cigarros, alta ingestão de gordura), fatores associados à gravidez e características anatômicas (gestação tardia, não amamentação, alta densidade mamária, menarca precoce, menopausa tardia), exposição hormonal e idade são considerados fatores de risco para o desenvolvimento desse tipo de câncer (BRITT, CUZICK, PHILLIPS, 2020; LOIBL et al., 2021).

2.2. Características estruturais da mama

As glândulas mamárias são estruturas únicas que caracterizam e fornecem o nome aos mamíferos. Sua função é a produção de uma secreção, o leite, o qual é espécie-específico e possui a função de nutrir a prole. Devido a sua função secretora, a mama é uma estrutura

tecidual complexa, regulada por hormônios e muito dinâmica devido aos ciclos estrais e a gravidez (HASSIOTOU, GEDDES, 2012, TAURIN, ALKHALIFAB, 2020).

Estruturalmente, a mama é formada por tecido glandular secretor, tecido adiposo e sustentada por tecido conjuntivo fibroso. O tecido glandular está organizado em unidades secretoras tuboalveolares que se situam na extremidade de pequenos ductos, os quais drenam os alvéolos para um ducto principal, chamado ducto lactífero. O ducto lactífero se direciona ao seio lactífero, junto ao mamilo (**Figura 2**) (KIERSZENBAUM, TRES 2012, pág. 676).

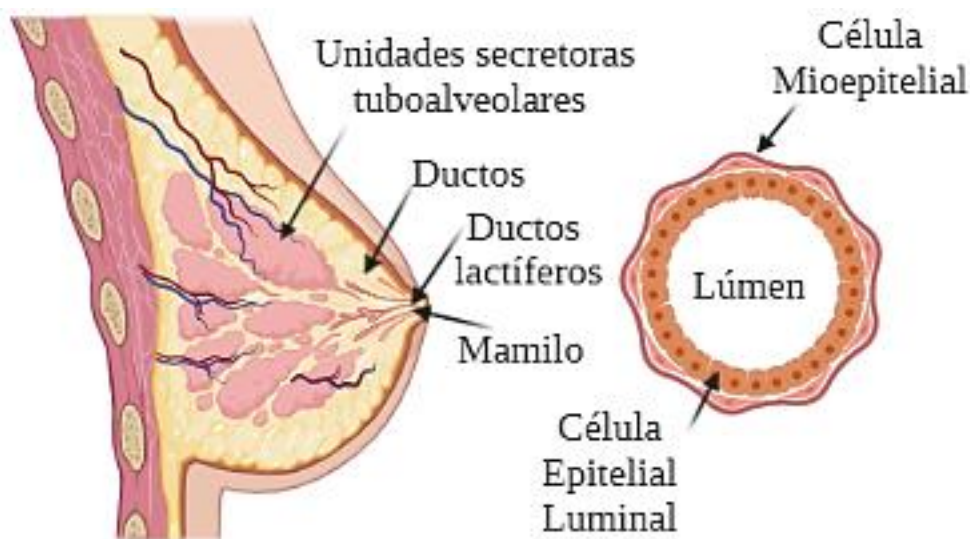


Figura 2: Organização anatômica e histológica da mama. Fonte: Do autor, 2022 - baseado em Harbeck et al., 2019. Criado com BioRender.com

Quanto à histologia, a glândula mamária se caracteriza por um epitélio cúbico luminal circundado por células basais mioepiteliais (**Figura 2**). As células mioepiteliais apresentam propriedades semelhantes às células musculares lisas, são responsáveis pela produção da membrana basal e auxiliam na polarização das células luminiais. Por outro lado, as células luminiais, quando da lactação, tem o potencial em se diferenciar em células secretoras de leite (lactócitos). Devido a essa diferenciação durante a lactação, diz-se que a completa maturação da mama ocorre apenas durante o período gravidez/lactação pela influência hormonal em nível celular e a consequente remodelação do tecido glandular (HASSIOTOU, GEDDES, 2012; KIERSZENBAUM, TRES 2012, pág. 676).

Além das células luminiais e mioepiteliais, a mama é composta por células-tronco mamárias (*Mammary Stem Cells*). As células-tronco mamárias são células multipotentes auto-renováveis que podem se diferenciar nas células epiteliais que compõem a mama. São essas células que estão envolvidas no desenvolvimento da mama durante a puberdade e a expansão

da mesma durante a gravidez e lactação. Devido a essas características as células-tronco mamárias podem ser um tipo celular vulnerável a tumorigênese (YANG, WANG, JIAO, 2017). Visto a complexidade da estrutura mamária e a alta regulação hormonal, é compreensível que este tecido seja suscetível a uma variedade de cânceres de mama (MOCCIA, HAASE, 2021).

2.3. Classificação dos cânceres de mama

Os cânceres de mama são um grupo de doenças com propriedades histopatológicas, moleculares e clínicas heterogêneas (ELIYATKIN et al. 2015, MOCCIA, HAASE, 2021; ZUBAIR, WANG, ALI, 2021). Para facilitar a compreensão da doença e estabelecer tratamentos e prognósticos, o câncer de mama pode ser classificado de acordo com características histopatológicas. Além dessas características, observações do grau de diferenciação histológico, do tamanho do tumor, de marcadores moleculares, da invasão de linfonodos e a presença de metástases fornecem informações importantes para a tomada de decisão na clínica e na orientação do tratamento (ELIYATKIN et al. 2015, TSANG, TSE, 2020).

De acordo com o tipo de tecido de origem, os cânceres de mama podem ser denominados sarcomas ou carcinomas. Os sarcomas originam-se de células de tecido conjuntivo (sustentação), enquanto que são classificados como carcinomas os tumores com características de células epiteliais que compõem a glândula mamária (**Figura 3**) (ZUBAIR, WANG, ALI, 2021).

Em relação à localização e invasividade os tumores mamários podem ser classificados com carcinoma *in situ*, cuja localização é restrita aos lóbulos (carcinoma lobular *in situ*) ou ductos (carcinoma ductal *in situ*) de forma bem delimitada, sem invasão de tecidos circundantes. Por outro lado, são denominados carcinomas invasivos, aqueles que têm a tendência de se expandir para tecidos vizinhos e ainda, desenvolver metástases em outros tecidos ou órgãos (ZUBAIR, WANG, ALI, 2021). Os carcinomas invasivos podem ser classificados histologicamente como: sem tipo especial, sendo que os carcinomas ductais invasivos sem tipo especial representam 70% dos casos; ou morfológicamente identificável. A alta porcentagem de tumores categorizados com sem tipo especial reflete a necessidade da investigação de outros parâmetros a fim de uma melhor compreensão e personalização do tratamento (**Figura 3**) (TSANG, TSE, 2020).

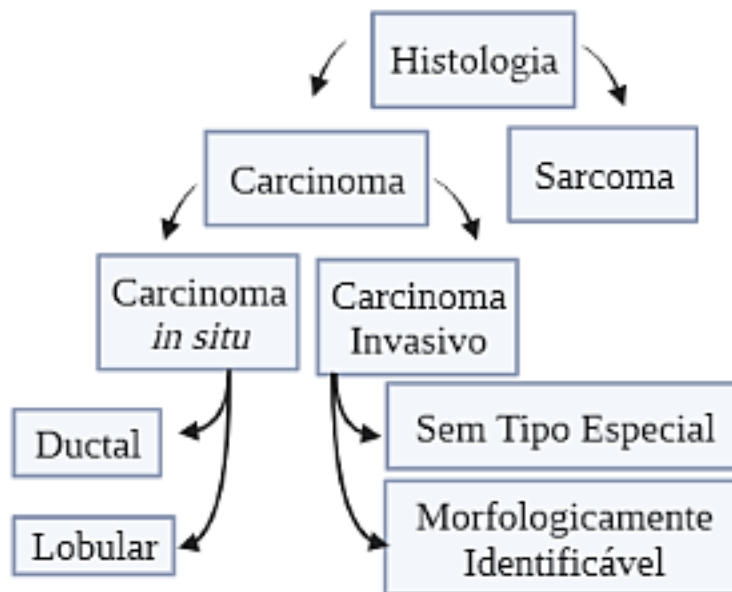


Figura 3: Classificação histológicas dos cânceres de mama. Do autor, 2022 - baseado em Harbeck et al., 2019. Criado com BioRender.com

De forma complementar, os tumores podem ser classificados quanto ao grau histológico (I-III), o qual é definido com base no grau de diferenciação tumoral, pleomorfismo e pela presença de figuras de mitose (ELIYATKIN et al. 2015). Outra caracterização importante é o estadiamento, o qual é baseado nas características do tamanho do tumor primário (T), na infiltração tumoral nos linfonodos (status nodal) (N) e a presença de metástase (M). Essas observações constituem o sistema TNM de classificação e o estadiamento anatómico varia de 0 a IV, sendo o estadiamento 0 mais favorável ao paciente do que o estadiamento mais alto (KALLI et al., 2018).

Biomarcadores moleculares também fazem parte da caracterização dos cânceres de mama. Assim, investigações sobre a expressão de receptores de estrogênio, receptores de progesterona e HER2 levam à categorização dos tumores em cinco subtipos: I) Luminal A; II) Luminal B; III) HER2 positivo, IV) Triplo negativo ou V) “Tipo normal” (*normal-like*) (**Figura 4**) (ELIYATKIN et al. 2015, ZUBAIR, WANG, ALI, 2021). Tal classificação também auxilia no prognóstico e decisão do regime terapêutico. A fim de auxiliar nessa classificação, a proteína Ki-67 também é investigada.

Dessa forma, o subtipo Luminal A caracteriza-se pela expressão de receptores de estrogênio e/ou progesterona (alta expressão de progesterona), HER2 negativo, apresenta baixa proliferação celular (Ki-67 menor que 20%), baixo grau histológico e um bom prognóstico. O subtipo Luminal B também apresenta expressão de receptores de estrogênio e/ou progesterona, porém em menores taxas que o tipo Luminal A. Pode ou não apresentar a expressão de HER2

(expresso em aproximadamente 20% dos tumores Luminais B), apresenta-se proliferativo (Ki-67 maior que 20%) e, conseqüentemente, apresenta maior grau histológico do que tumores Luminais A e prognóstico intermediário. O tratamento desses tumores podem se beneficiar da terapia hormonal isolada, visto a expressão de receptores hormonais, ou em combinação com agentes quimioterápicos (principalmente no subtipo Luminal B) (**Figura 4**) (HARBECK et al., 2019; TAURIN, ALKHALIFAB, 2020, TSANG, TSE, 2020).

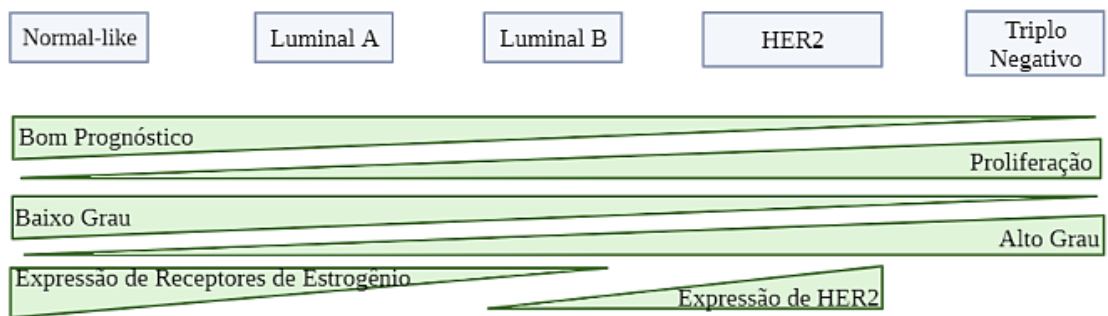


Figura 4: Classificação dos cânceres de mama de acordo com a expressão de marcadores moleculares. Do autor, 2022 - baseado em Harbeck et al., 2019. Criado com BioRender.com

Tumores que não expressam os receptores hormonais, mas expressam HER2 são denominados como tumores HER2 positivo. Tais tumores são altamente invasivos e proliferativos, apresentam alto grau histológico e prognóstico intermediário porém, podem se beneficiar de terapias-alvo anti-HER2 (**Figura 4**) (HARBECK et al., 2019).

Como a própria denominação sugere, os tumores triplo-negativo não apresentam expressões significativas de receptores hormonais e HER2 além disso, expressam genes característicos de células basais e/mioepiteliais da mama. Esses tumores também são altamente invasivos e proliferativos, conseqüentemente, o prognóstico não é favorável. Os tumores “tipo-normal” são descritos como tendo poucas células tumorais e possuem componentes teciduais não tumorais (ELIYATKIN et al., 2015). Além disso, a sua expressão gênica se assemelha a expressão gênica do epitélio normal da mama.

No entanto, a classificação dos cânceres de mama não se restringe apenas aos marcadores descritos acima, pois outras características moleculares podem e devem ser investigadas para direcionar a escolha dos tratamentos (HARBECK et al., 2019; TSANG, TSE, 2020).

2.4. Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano - HER2

O receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (*HER2-neu*, ErbB2) é uma glicoproteína transmembrana de 185 kDa codificada pelo oncogene *HER2-neu* localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q) (LIAO, et al, 2010; LV et al., 2016). Esse receptor pertence à família de receptores conhecidos como HER ou ErbB, a qual inclui outros três receptores: o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR-HER1-ErbB1), o receptor tipo 3 do fator de crescimento epidérmico humano (HER3-ErbB3) e o receptor tipo 4 do fator de crescimento epidérmico (HER4-ErbB4) (MOASSER, 2007).

Os receptores ErbB/HER são um conjunto de receptores tirosina quinase tipo I. As glicoproteínas que compõem essa família de receptores apresentam uma organização molecular semelhante, composta por uma região extracelular, a qual é constituída por duas regiões ricas em cisteína (CR1 e CR2 ou domínios II e IV, respectivamente) e duas regiões de reconhecimento de ligantes (LD1 e LD2 ou domínios I e III, respectivamente). Além disso, estas glicoproteínas apresentam um curto domínio transmembrana e na porção intracelular, um domínio tirosina quinase e a cauda carboxi-terminal rica em tirosina (APPERT-COLLIN et al., 2015; MOASSER, 2007; YARDEN, SLIWKOWSKI, 2001) (**Figura 5A**).

Análises filogenéticas indicam que eventos de duplicação de genes levaram à formação dos quatro receptores em humanos. Dessa forma, a primeira duplicação deu origem ao precursor de ErbB1 e 2, bem como, ao precursor de ErbB3 e 4. Posteriormente, nos tetrápodes, esses precursores sofreram novas duplicações, permitindo a formação de uma rede complexa de sinalização, composta pelos quatro receptores e seu ligantes que incluem: fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformador ($TGF-\alpha$), anfiregulina, epiregulina, betacelulina, neuregulina (1, 2, 3, 4), Fator de crescimento semelhante a EGF de ligação à heparina (HB-EGF). Esses ligantes podem reconhecer um ou mais receptores da família HER (CITRI, YARDEN, 2006, STEIN, STAROS, 2006, WU et al., 2021).

De forma geral, as vias de sinalização celular relacionadas aos receptores HER são dependentes da interação de um ligante específico à porção extracelular do receptor em sua forma monomérica, ativando-o (**Figura 5B**). A interação entre ligante-receptor desencadeia mudanças conformacionais que permitem a formação de homo ou heterodímeros, devido à interação entre o domínio II dos receptores envolvidos na dimerização. Ademais, na porção intracelular ocorre a transfosforilação e o acoplamento de proteínas adaptadoras ou enzimas,

ativando cascatas de sinalização (**Figura 5B e C**) (APPERT-COLLIN et al., 2015; MOASSER, 2007; YARDEN, SLIWKOWSKI, 2001).

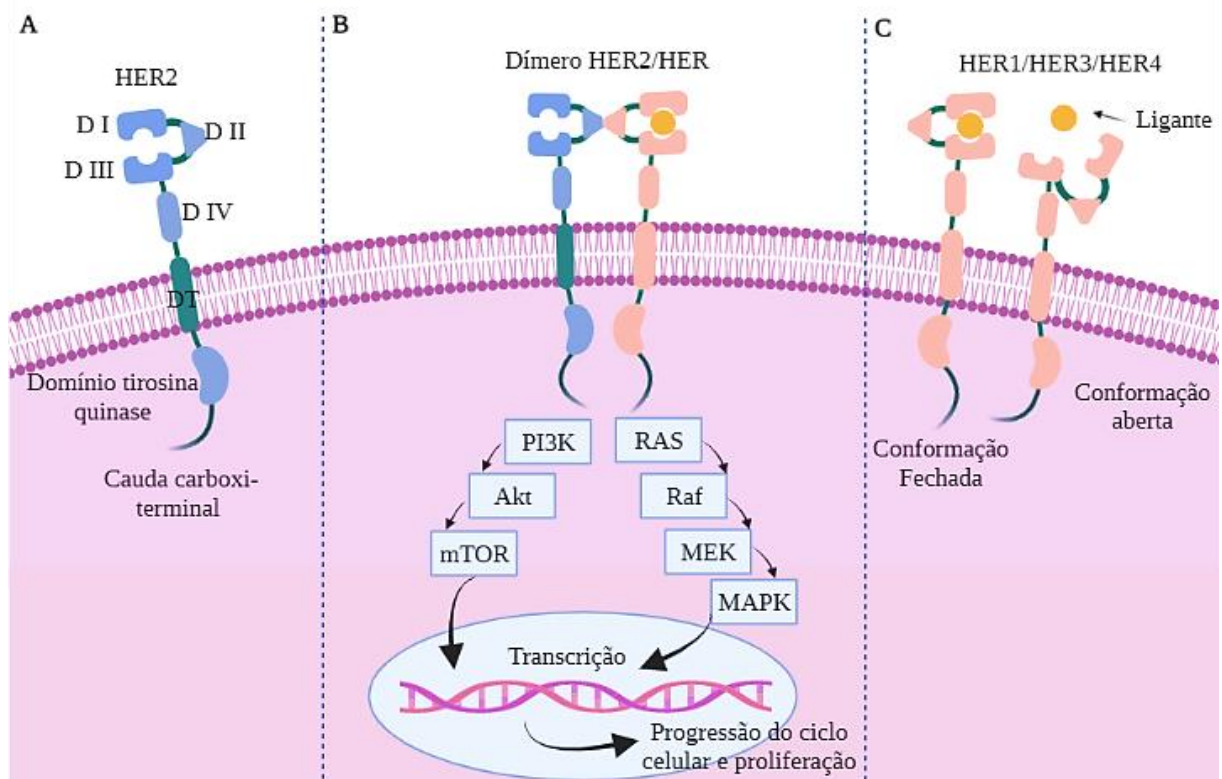


Figura 5: Diagrama esquemático das vias de sinalização HER2. (A) Organização estrutural dos receptores HER2. (B) Vias de sinalização ativadas por dímeros HER; (C) Modificação na conformação do receptor mediada por ligante. DI – Domínio I, DII – Domínio II, DIII – Domínio III, DIV – Domínio IV, DT – Domínio Transmembrana. Fonte: Do autor, 2022 - baseado em Lv et al., 2016. Criado com BioRender.com

A formação de dímeros, especialmente heterodímeros, demonstra uma interdependência desses receptores e a complexa rede de sinalização proveniente dessas interações. Importante destacar que essas interações são essenciais para a transdução de sinal intracelular e ativação de diversos efeitos biológicos (NELSON, 2014a), uma vez que, os receptores HER2 e HER3 são moléculas incompletas. O HER3 possui quinases inativas, enquanto que HER2 é considerado um receptor órfão, pois não possui ligantes específicos conhecidos (STEIN, STAROS, 2006).

Apesar da ausência de ligantes específicos para HER2, a sua função biológica está relacionada à sua capacidade de formar dímeros com outros receptores, uma vez que, consiste no parceiro de ligação preferido dos demais receptores (GRAUS-PORTA et al., 1997). Essa preferência por heterodímeros com HER2 parece estar associada ao aumento na especificidade do ligante ao par dimerizado e à amplificação da sinalização (YARDEN, SLIWKOWSKI,

2001). Aliado a isso, os domínios I e III do HER2 organizam-se de uma forma que o sítio de dimerização (II) esteja sempre disponível para formar a ligação com o parceiro, enquanto que nos outros receptores dessa família, na ausência de ligante, o sítio do domínio II está inibido devido a sua interação com o domínio IV. Essa ligação (II-IV) se desfaz quando um ligante interage com o receptor, devido a aproximação dos domínios I e III e exposição do sítio II para a dimerização (CITRI, YARDEN, 2006) (**Figura 5A**).

A formação de homo ou heterodímeros promove a sinalização por vias distintas. A ativação dessas vias é dependente do ligante (sinal extracelular) e dos receptores que formam o dímero. Nesse sentido, a formação de heterodímeros entre HER2/HER3 acarreta na ativação da via fosfatidil inositol 3-quinase- proteína quinase B (PI3K – Akt), mas também pode induzir a ativação da via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), sendo estas as vias principais ativadas por receptores HER. A via MAPK também pode ser ativada pelos dímeros HER2/HER1, HER2/HER2 HER2/HER4 (**Figura 5B**) (CITRI, YARDEN, 2006; LV et al., 2016; TAI, MAHATO, CHENG, 2010).

A presença dos receptores ErbB/HER e a formação de seus complexos e ativação de vias de sinalização são de suma importância para diferenciação de linhagens celulares, assim como, favorecem as interações celulares durante a organogênese (incluindo o desenvolvimento das glândulas mamárias) e nos indivíduos adultos (STERNLICHT, 2005; YARDEN, SLIWKOWSKI, 2001). Isso, porque as vias de sinalização relacionadas aos receptores ErbB/HER estão envolvidas em processo de regulação da divisão celular, adesão, migração, diferenciação e apoptose (YARDEN, SLIWKOWSKI, 2001, ZACZEK, BRANDT, BIELAWSKI, 2005).

Apesar da importância biológica dessas vias, a desregulação na expressão dos receptores HER, está associada ao desenvolvimento e progressão de diferentes tipos de câncer. A desregulação na expressão de HER2 é associada com a patogênese de cânceres de mama, ovário, gástrico, esofágico, câncer de pulmão e de mama (NELSON, 2014b; TAI, MAHATO, CHENG 2010).

Cerca de 20% a 30% dos cânceres de mama apresentam alteração nos receptores HER2 (OH, BANG 2020, ZHAO et al., 2021). Essas alterações são oriundas da superexpressão do gene, amplificação, mutação ou ainda de alterações transcricionais ou pós-transcricionais, como por exemplo, a inibição da degradação do receptor (NELSON, 2014a, OH, BANG, 2020).

A superexpressão de receptor HER2 e seu estado conformacional apropriado para dimerização faz com que ocorra uma sinalização celular prolongada, com ativação de vias

anteriormente mencionadas que são importantes para proliferação e sobrevivência celular. Além disso, a superexpressão permite uma evasão dos processos de atenuação de sinal. Ainda, o aumento na expressão acarreta na sua homodimerização, bem como, heterodimerização com EGFR, o que pode desencadear a perda da polaridade celular e desregular a adesão célula-célula (MOASSER, 2007). Por fim, recentemente foi demonstrado que altos níveis de HER2 na superfície celular, levam a deformação da membrana celular, promovendo a formação de protuberâncias. A presença dessas protuberâncias limita a interação entre as células e entre células-substrato, o que pode contribuir para a aquisição de um fenótipo invasivo, independentemente das vias clássicas de sinalização (CHUNG et al., 2016). Devido as essas características, a expressão de HER2 além de estar associada a tumorigênese, é considerada um fator prognóstico e um alvo terapêutico para o câncer de mama (IQBAL, IQBAL, 2014).

2.5. Tratamentos anti-HER2

O tratamento dos cânceres de mama é multidisciplinar consistindo em ressecção cirúrgica, radioterapia e tratamentos sistêmicos, incluindo terapias endócrinas, quimioterapias, terapias-alvo contra receptores HER2 e imunoterapia (HARBECK et al., 2019). A escolha para o melhor tratamento se baseia nas características tumorais, incluindo os marcadores moleculares, como mencionado anteriormente.

Neste contexto, um dos marcadores que influencia na escolha do regime terapêutico é o HER2. A determinação desse biomarcador necessita ser confiável a fim de determinar o status do receptor no tumor, visto os benefícios das terapias anti-HER2 (GUTIERREZ, SCHIFF, 2011). Atualmente, as técnicas de identificação utilizadas são a imunohistoquímica (IHC) (detecção da proteína), utilizada como um teste de triagem e a hibridização *in situ* (FISH) (detecção da amplificação gênica), o qual é um teste de confirmação quando os resultados por IHC não são esclarecedores (AHN, et al., 2020).

Após a confirmação do status HER2, os tratamentos disponíveis para esse tipo tumoral são anticorpos monoclonais como o trastuzumabe, pertuzumabe e margetuximabe; pequenas moléculas inibidoras de receptores tirosina quinase, a exemplo do lapatinibe, neratinibe, tucatinibe e pirotinibe e os fármacos conjugado à anticorpos como trastuzumabe-deruxtecano e ado-trastuzumabe-emtansina (SCHLAM, SWAIN, 2021, WYNN, TANG, 2022). Esses são agentes específicos direcionados ao HER2, porém o tratamento pode contar com outros agentes quimioterápicos, tratamentos cirúrgicos, além da radioterapia.

2.6. Trastuzumabe

O trastuzumabe é anticorpo humanizado monoclonal produzido pela técnica de DNA recombinante. Esse anticorpo foi a primeira terapia direcionada aos receptores HER2 a chegar ao mercado, sendo aprovado pelo FDA em 25 de setembro de 1998 (FDA, 1998) e registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) desde 1999 (ANVISA, 1999). A sua aprovação teve e ainda tem, um enorme impacto na vida de dezenas de mulheres com diagnóstico de câncer de mama HER2 positivo. Além disso, abriu novas perspectivas para a engenharia de anticorpos monoclonais (SAWYERS, 2019).

Primeiramente comercializado com o nome de Herceptin (atualmente existem biossimilares no mercado), o trastuzumabe, é um anticorpo da classe IgG1 de 145,5 kDa (DRUGBANK, 2022). Por ser um anticorpo humanizado, ele contém regiões hipervariáveis (reconhecimento do antígeno) das cadeias leves e pesadas (Fab) de origem murina, as quais representam 5% da composição do anticorpo. As cadeias constantes e características de IgG (Fc) são de origem humana e correspondem a 95% da composição do anticorpo (**Figura 6A**) (BAYER, 2019; HARRIES, SMITH, 2002)

Apesar de não ser completamente elucidado, o seu mecanismo de ação conta com o reconhecimento do domínio IV da porção extracelular do receptor HER2 e inibe indiretamente a sua dimerização, uma vez que a dimerização ocorre pela interação entre os domínios II dos receptores (**Figura 6A**). (LV et al., 2016, ZHAO et al., 2021). A não dimerização impede a fosforilação da porção intracelular do receptor e a sinalização celular. Além disso, o trastuzumabe aumenta a internalização e degradação dos receptores HER2, inibem a clivagem da região extracelular do receptor e a formação do fragmento p95 (fragmentos carboxi-terminais de HER2) (**Figura 6A e C**) e ativam a citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (HUDIS, 2007, LV et al., 2016) (**Figura 6C**).

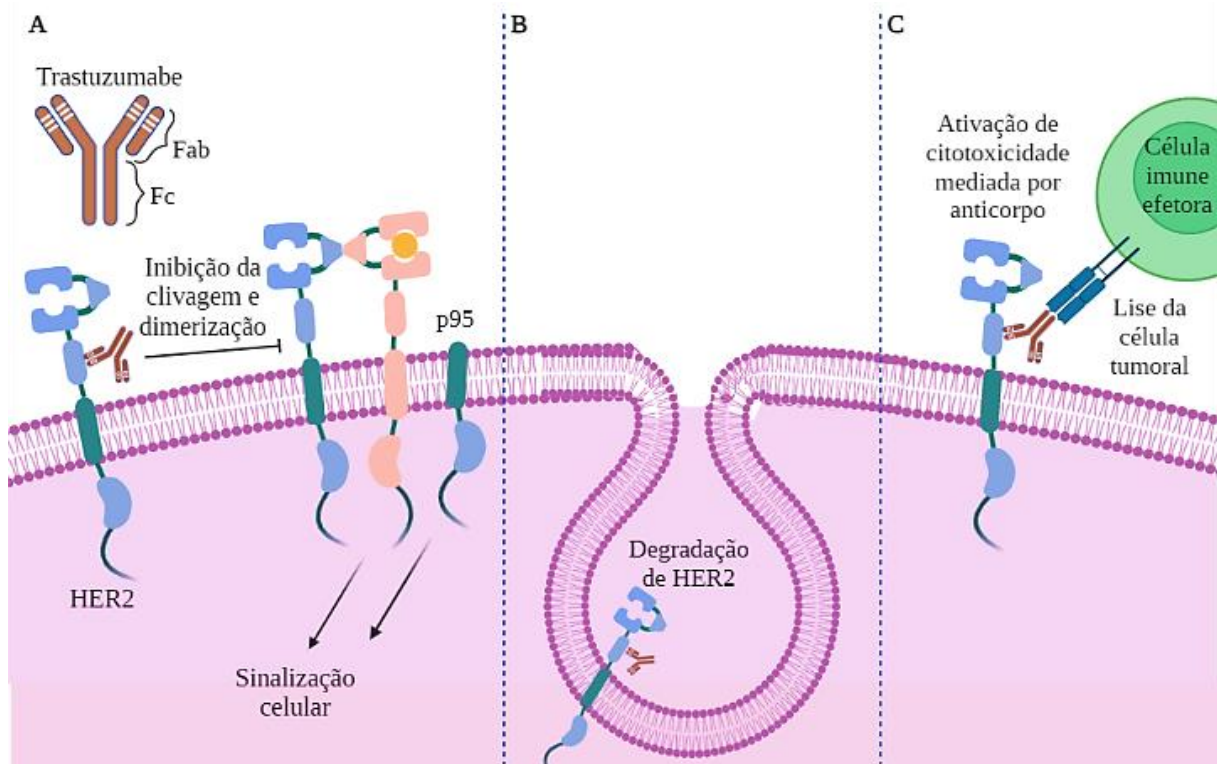


Figura 6: Mecanismos de ação do trastuzumabe. (A) Estrutura do anticorpo; Inibição da clivagem do receptor e homo ou heterodimerização; (B) Degradação do receptor; (C) Ativação de citotoxicidade mediada por anticorpo. Fonte: Do autor, 2022 - baseado em Hudis et al., 2007. Criado com BioRender.com

A administração do trastuzumabe é realizada por infusão intravenosa, com um regime terapêutico que pode ser semanal ou a cada 3 semanas. No regime semanal, a primeira dose a ser administrada corresponde a 4 mg kg^{-1} , seguida de doses de manutenção de 2 mg kg^{-1} . Enquanto que, nas administrações a cada 3 semanas, a dose de ataque é de 8 mg kg^{-1} , com doses subsequentes de 6 mg kg^{-1} a cada 21 dias (BOEKHOUT, BEIJNEN, SCHELLENS, 2011). As administrações do anticorpo ocorrem em ambiente clínico-hospitalar. Além disso, as infusões iniciais têm duração de 90 minutos, já as doses de manutenção podem ser administração por perfusão de 30 minutos de duração (FDA, 2018).

Alternativamente, uma formulação de aplicação subcutânea contendo trastuzumabe e a enzima hialuronidase foi aprovada pelo FDA em 28 de fevereiro de 2019, destinada ao tratamento do câncer de mama. Assim como para a administração intravenosa, o regime terapêutico conta com a aplicações a cada 3 semanas, sendo a dose de 600 mg (5 mL), administrados durante aproximadamente 2 a 5 minutos (FDA, 2019). Apesar das diferenças nas rotas de administração a farmacocinética, eficácia e segurança são similares (WALLER, MÖBIUS, FUENTES-ALBURO, 2021).

A farmacocinética do trastuzumabe ainda não foi totalmente compreendida, porém sabe-se que este é metabolizado a peptídeos e aminoácidos. Sua eliminação é mediada por células epiteliais devido à metabolização intracelular. Sua meia-vida é longa, sendo de aproximadamente 28 dias (BOEKHOUT, BEIJNEN, SCHELLENS, 2011, FDA, 2019).

O trastuzumabe faz parte da primeira linha do arsenal terapêutico para o câncer de mama HER2 positivo, contudo nem todos os pacientes se beneficiam desse agente terapêutico devido à existência de mecanismos de resistência a esse anticorpo. Os mecanismos de resistência contemplam: obstáculos de reconhecimento anticorpo receptor, por exemplo, a existência de p95HER2 e mascaramento de epítipo por glicoproteínas como a Mucina-4. A regulação positiva das vias de sinalização por perda de função de outros componentes da via de sinalização, como a perda da função da fosfatase PTEN, a qual normalmente inibe a ativação de PI3K, também estão associadas à resistência ao tratamento. Ainda, mutações em PI3K (*PIK3R1* e *PIK3CA*) podem acarretar na ativação exacerbada da via PI3K-Akt (NAHTA, ESTEVA, 2006, POHLMANN et al., 2009).

Outro fator envolvido na resistência terapêutica ao trastuzumabe é sinalização celular por vias alternativas, como por exemplo a sinalização via receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1R), sinalização por homodímeros EGFR e heterodímeros EGFR/HER3. Falha na ativação de mecanismos de citotoxicidade mediada por anticorpo, a qual pode resultar de polimorfismos em receptores das células imunes que reconhecem a porção Fc do anticorpo, também podem prejudicar a sua utilização (NAHTA, ESTEVA, 2006, POHLMANN et al., 2009). Aliado aos mecanismos de resistência, efeitos adversos como reações infusionais (febre e calafrios, náuseas, vômitos, dor de cabeça, tontura, dispneia, hipotensão, erupção cutânea e astenia) e cardiotoxicidade clínica e subclínica são reportados para os tratamentos com trastuzumabe (FDA, 2018). A fim de transpor esses mecanismos de resistência, estudos têm combinado o trastuzumabe com agentes quimioterápicos e outros inibidores de receptores tirosina quinase (WYNN, TANG, 2022).

Além dos mecanismos de resistência, outro fator que impede a sua ampla utilização é o alto custo do tratamento. No Brasil, o custo estimado do medicamento para o tratamento de uma pessoa de 60 kg, considerando uma dose de ataque de 8 mg kg⁻¹ e outras 17 doses de 8 mg/kg distribuídas em ciclos de 21 dias, chega a 12.698,93 dólares (BOTELHO, ESTEVEZ-DIZ, CAMPOLINA, 2021). Vale ressaltar que o valor representa apenas o medicamento e que uma importante parcela dos tratamentos é custeado pelo SUS. O SUS contempla o tratamento com o trastuzumab desde 2012 (BRASIL, 2012). Em 2016, os gastos com esse tratamento

representaram 74,9% (R\$ 374.003.094,00) dos recursos utilizados para compra de medicamentos oncológicos de maior custo, estando no topo dos gastos para essa categoria de medicamentos (CHAVES et al., 2018; CASTRO, 2020). Assim, outro fator importante para a utilização da terapia combinada é redução dos custos do tratamento.

2.7. Lapatinibe

O lapatinibe é um fármaco sintético da classe das 4-quinazolinaminas, cujo mecanismo de ação é a ligação reversível e, conseqüentemente, a inibição dos receptores tirosina quinase EGFR-HER1 e HER2. O efeito inibitório ocorre pela ligação do lapatinibe aos sítios de ligação do trifosfato de adenosina (ATP) na porção intracelular dos receptores. Essa interação fármaco-receptor inibe a sua fosforilação e a ativação das vias de sinalização celular (PI3K-Akt e MAPK), podendo promover a morte celular (DRUGBANK, 2022 PUBCHEM, 2022) (Figura 7). Seu mecanismo de ação permite também, o reconhecimento de receptores HER2 truncados, conhecidos como p95-HER2. O fragmento p95-HER2 não apresenta a porção extracelular do receptor, mas mantém domínio quinase funcional. Devido a essa característica, a presença de p95-HER2 em tumores de mama pode ser um mecanismo de resistências às terapias com anticorpos direcionados à porção extracelular do receptor (ARRIBAS et al., 2011).

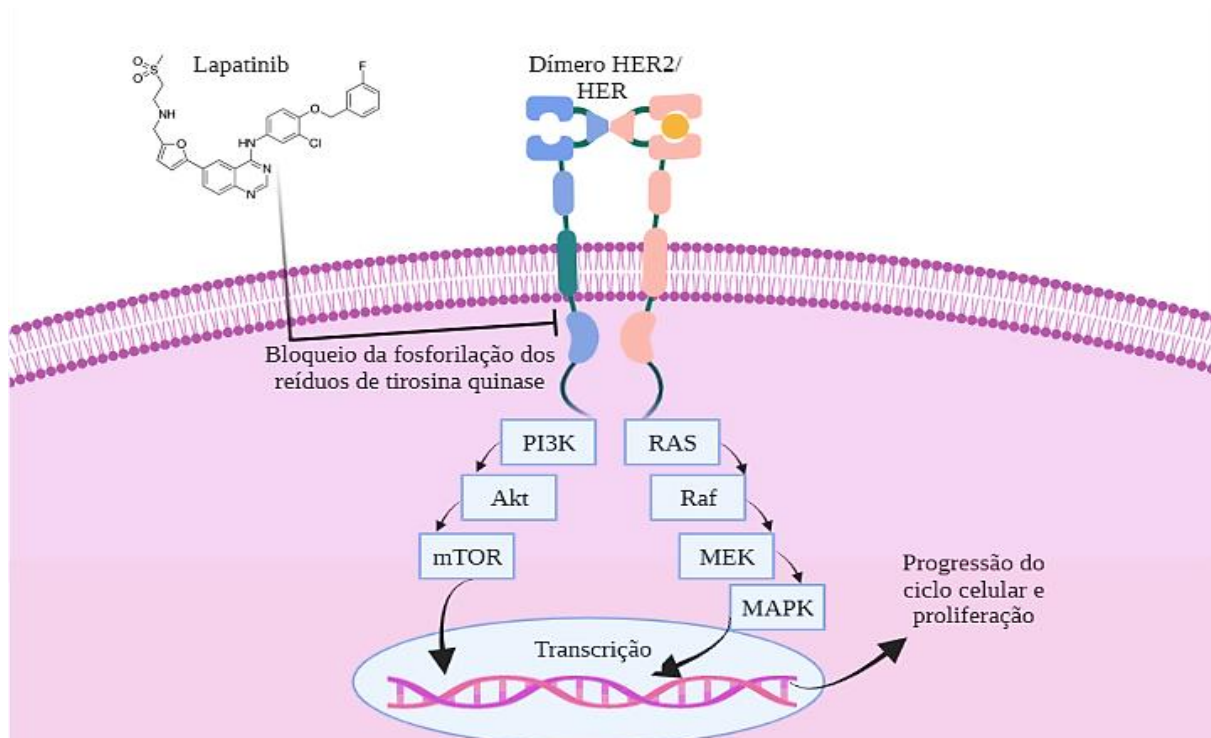


Figura 7: Mecanismos de ação do lapatinibe. Fonte: Do autor, 2022. Criado com BioRender.com

O lapatinibe foi aprovado pelo FDA para o tratamento de tumores sólidos, incluindo câncer de mama HER2 positivo e câncer de pulmão em 2007 (DRUGBANK, 2022) e está disponível no Brasil desde 2009 (BVSMS, 2009). Em se tratando de câncer de mama, esse fármaco é indicado para o tratamento de câncer de mama avançado ou metastático em combinação com capecitabina ou letrozol em pacientes previamente tratados com antraciclina, taxano e trastuzumabe (FDA, 2010; SCHLAM, SWAIN, 2021).

Apesar de estar disponível no Brasil, a maioria dos pacientes não têm acesso ao tratamento com lapatinibe, pois este medicamento é utilizado em clínicas privadas ou é fornecido pelo sistema público de saúde via processos judiciais (DEBIASI et al., 2016; VIDAL et al., 2013). Devido a isso, as informações sobre os custos do tratamento são escassas. Contudo, um estudo realizado em 2013 sobre as ações judiciais que reivindicavam medicamentos antineoplásicos, aponta o lapatinibe como o segundo fármaco mais oneroso entre os fármacos solicitados. De acordo com o valor de mercado no momento em que o estudo foi realizado, para atender apenas 3 solicitações de tratamento seriam necessários 230.077,30 reais, valor esse que representa apenas os custos com a aquisição do medicamento (VIDAL et al., 2013).

Contudo, o lapatinibe é um fármaco de administração oral, com apresentação farmacêutica na forma de comprimidos contendo 250 mg do derivado ditosilato de lapatinibe (SARDESAI, STORNILOLO, 2015), o que proporciona maior comodidade ao paciente, visto que pode ser administrado em ambientes não hospitalares. A dose diária recomendada para o tratamento do câncer de mama é entre 1.250 mg a 1500 mg (5 a 6 comprimidos) uma vez ao dia, em ciclos de 21 dias. A sua administração é preferível uma hora antes ou depois das refeições, pois a sua absorção é influenciada pela presença de alimento no trato gastrointestinal, podendo aumentar a exposição sistêmica. Mesmo nas condições ideais de administração, a sua absorção é incompleta e variável (FDA, 2010), sendo a sua biodisponibilidade oral completa desconhecida. Isso pode estar relacionado ao fato que o lapatinibe é substrato da glicoproteína P (P-gp- a qual é relacionada ao efluxo e resistência às drogas) e sua solubilidade é dependente de pH. Dessa forma, em situações onde o pH do trato gástrico encontra-se elevado a absorção do fármaco pode diminuir (FDA, 2010). No entanto, a sua concentração plasmática em um estado de equilíbrio (*steady-state*) após a administração de uma dose de 1.250 mg por dia é próxima a 2,43 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (SARDESAI, STORNILOLO, 2015). Ainda, o metabolismo do lapatinibe é hepático com excreção de 27% nas fezes (FDA, 2010).

De forma geral, o lapatinibe é bem tolerado, porém pode acarretar em toxicidade cardíaca. Os principais efeitos adversos relacionados ao tratamento com o lapatinibe são

diarreia e erupção cutânea, náuseas, neutropenia e anemia (IQBAL, IQBAL, 2014; SARDESAI, STORNILO, 2015). Os efeitos gastrointestinais são amplamente reportados para inibidores de receptores tirosina quinase e parecem ser mais exacerbados quando moléculas com ligação irreversível são utilizadas como por exemplo, o neratinibe ou o pirotinibe (SCHLAM, SWAIN, 2021), sendo este um fator limitante para a adesão ao tratamento e também para absorção desses fármacos.

Apesar de ainda não estarem elucidados, alguns achados apontam que um dos fatores que desencadeiam a diarreia após a administração de inibidores de receptores tirosina quinase, seja a alguns achados apontam que há uma redução na expressão de HER2 e EFGR no tecido intestinal, o qual é acompanhado de algumas alterações morfológicas (BOWEN et al., 2014). Dessa forma, novas estratégias para veiculação do lapatinibe, como por exemplo a sua nanoencapsulação, podem contribuir para redução de efeitos adversos, melhorar suas características farmacocinéticas, bem como melhorar o seu direcionamento para tecidos-alvos e redução da dose efetiva (BONDE et al., 2018).

2.8. Combinação de trastuzumabe e lapatinibe dos ensaios *in vitro* aos ensaios clínicos

Inicialmente, estudos *in vitro* demonstraram um efeito sinérgico entre lapatinibe e trastuzumabe (0,039 a 5,0 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ de lapatinibe e 0,31 a 4,0 $\mu\text{mol mL}^{-1}$) em linhagens de câncer de mama com superexpressão de HER2 (SKBR3; MDA-MB-453, MDA-MB-361 e BT474) reduzindo a viabilidade celular das mesmas (KONECNY et al., 2006). Ainda, a combinação de 100 nM de lapatinibe e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ trastuzumabe induziu níveis de apoptose mais elevados do que as monoterapias na linhagem BT474 (XIA et al., 2005).

Além disso, um dos achados importantes sobre essa combinação terapêutica, *in vitro* nas linhagens SKBR3, MCF-7HER2 ou BT474, é que o lapatinibe pode reduzir a ubiquitinação de HER2, prevenindo a sua degradação e favorecendo a sua acumulação nas membranas celulares. O acúmulo de HER2 inativo na superfície celular possibilita o reconhecimento dos mesmos pelo trastuzumabe e leva ao aumento na ativação de citotoxicidade imunomediada induzida por anticorpo (MURUYAMA et al., 2011; SCALTRITI et al., 2009). Em modelos de xenoenxerto (linhagem celular BT474 VH2) a combinação dos agentes terapêuticos (lapatinibe 100 mg kg^{-1} e 10 mg kg^{-1} , 3 \times na semana) levou à completa remissão do tumor após o tratamento (SCALTRITI et al., 2009).

Em estudos clínicos, a combinação de lapatinibe e trastuzumabe (aliado à quimioterapia) para o tratamento de cânceres de mama HER2 positivo (tratamento neoadjuvante) demonstrou melhora na resposta patológica completa quando comparado ao tratamento apenas com trastuzumabe em combinação com quimioterapia (CLAVAREZZA et al., 2016). Ainda, essa meta-análise verificou que o efeito dessa combinação (lapatinibe-trastuzumabe) é mais acentuado em tumores não positivos para receptores hormonais (CLAVAREZZA et al., 2016). Dados semelhantes foram observados por Guarneri et al., 2022, sendo também relatado um aumento na sobrevida global dos pacientes que receberam trastuzumabe e lapatinibe associados à quimioterapia, em relação aqueles que receberam apenas trastuzumabe associado à quimioterapia ou lapatinibe associado à quimioterapia.

Outra revisão sistemática e meta-análise de ensaios clínicos randomizados apontou que o uso combinado de lapatinibe e trastuzumabe melhorou a resposta patológica completa, a sobrevida livre de progressão e sobrevivência global dos pacientes, quando comparada às terapias administradas de forma isolada, em pacientes com câncer de mama HER2 positivo. No entanto, eventos adversos foram frequentemente relatados após administração combinada de trastuzumabe e lapatinibe (XU et al., 2017).

De acordo com as informações disponíveis sobre os medicamentos, entre os efeitos adversos relatados para terapias isoladas com trastuzumabe e lapatinibe está a cardiotoxicidade (FDA, 2010, FDA, 2018). Contudo, a combinação entre trastuzumabe e lapatinibe mostrou-se segura do ponto de vista cardíaco em ensaios clínicos, no entanto alguns eventos cardíacos sintomáticos e assintomáticos foram relatados (EIGER et al., 2020).

2.9. Nanopartículas como ferramenta alternativa para direcionamento de fármacos para o tratamento do câncer de mama: lapatinibe e trastuzumabe

Apesar dos avanços nas descobertas sobre a biologia do câncer, nos procedimentos para a prevenção, bem como, novas alternativas terapêuticas, o câncer de mama ainda provoca altas taxas de morbidade e mortalidade. Nesse sentido, novas estratégias têm sido exploradas para melhorar a eficácia terapêutica e o direcionamento alvo-específico, incluindo a utilização da nanotecnologia (WHITE et al., 2020).

A nanotecnologia aplicada para tratamento do câncer, explora as características singulares de nanocarreadores lipídicos, poliméricos e inorgânicos (WHITE et al., 2020). Entre as características dos nanocarreadores estão o aumento da eficácia terapêutica devido ao maior

acúmulo no tecido-alvo, isso porque, essas partículas em escala nanométrica podem melhorar o perfil farmacocinético de fármacos e sua distribuição tecidual. Além disso, o direcionamento específico contribui para a redução de efeitos adversos. Outra vantagem dessa tecnologia é a viabilidade de combinar diferentes agentes terapêuticos em uma mesma partícula, e a manipulação de superfície para obter direcionamento ativo e especificidade para o alvo, ou ainda para reduzir a interação da partícula com proteínas plasmáticas e reduzir o reconhecimento pelo sistema fagocitário (MEEL et al., 2013).

Neste sentido, lipossomas pH responsivos contendo lapatinibe e funcionalizado com o peptídeo T7 (ligante de transferrina) demonstrou-se mais eficaz contra o câncer de mama HER2 positivo e mais seguro do que o fármaco livre em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Além disso, estudos de distribuições demonstraram que a presença do peptídeo na superfície da partícula melhorou o direcionamento e acúmulo das partículas na região tumoral e possibilitou um aumento na biodisponibilidade do fármaco (ZHANG et al., 2021).

Em outro estudo, nanopartículas de albumina contendo lapatinibe foram desenvolvidas visando à aplicação por via intravenosa. Nos testes preliminares, *in vitro*, as nanopartículas demonstraram citotoxicidade às células SKBR3 (células de câncer de mama HER2 positivo), a qual foi mediada pela internalização das partículas por endocitose, e ativação de vias de apoptose. *In vivo*, as nanopartículas promoveram redução do volume tumoral superior (volume tumoral ao término do tratamento 21,1%) ao fármaco livre (39,8%). Ainda, a formulação não apresentou potencial hepatotóxico, o qual foi avaliado por meio de análises histológicas e marcadores bioquímicos (WAN et al., 2015).

Além do câncer de mama locorregional, outra preocupação durante o diagnóstico do câncer de mama e progressão da doença é o surgimento de metástases, incluindo as metástases cerebrais, devido à dificuldade em tratar esses tumores (BROSNAN, ANDERS 2018). Dessa forma, nanocarreadores estão sendo desenvolvidos com a intenção de superar as barreiras para a entrega ao tecido cerebral, com por exemplo micelas contendo lapatinibe e paclitaxel decoradas com Angiopep-2 (direcionamento via receptor de lipoproteína de baixa densidade). Tais partículas demonstraram capacidade de transpor a barreira hematoencefálica em modelos *in vitro* e *in vivo*, com acúmulo significativo nas metástases cerebrais. *In vitro*, as micelas reduziram a viabilidade celular em linhagem HER positiva e foram mais citotóxicas do que em células que não expressavam o receptor (LU et al., 2022).

Nanopartículas biodegradáveis funcionalizadas com trastuzumabe e contendo dasatinibe, um inibidor multiquinase utilizado no tratamento de leucemia linfoblástica aguda e

leucemia mieloide crônica, demonstraram um maior efeito citotóxico em células de câncer de mama HER2 positivo (BT474) e HER2 positivo resistente ao trastuzumabe, comparado aos fármacos em solução. Aliado a isso, o tratamento induziu apoptose e parada de ciclo celular em G1/G0 (NIZA et al., 2019). Da mesma forma, “*Nanorods*” contendo paclitaxel e superfície funcionalizada com o anticorpo trastuzumabe demonstraram redução na viabilidade celular de células HER2 positivas (SKBR3 e BT474), parada de ciclo celular em G2/M, além da ativação de vias de morte celular por apoptose. Além disso, a formulação apresentou menor toxicidade para células normais, indicando seletividade para as células cancerígenas (ABEDIN et al., 2021).

Resultados interessantes também foram observados em modelo murino de xenoinxerto, com células de câncer de mama HER2 positivo, após a administração de um lipossoma catiônico (Lipoplex) contendo substâncias ativas encapsuladas (curcumina ou doxorrubicina) e a complexação de trastuzumabe (complexação não covalente) à superfície da partícula. Neste contexto, a formulação apresentou a capacidade de direcionar as substâncias ativas para o tecido tumoral, melhorando a eficácia, uma vez que, reduziu o volume tumoral quando comparada com as substâncias ativas administradas de forma isolada. Ainda, a administração da formulação desenvolvida aumentou a taxa de sobrevivência dos animais tratados (LIN et al., 2019).

Além disso, o nosso grupo de pesquisa demonstrou que é possível encapsular o fármaco ditosilato de lapatinibe em nanocápsulas de núcleo lipídico e que esta formulação apresenta resultados promissores contra célula de câncer de bexiga (BUSS et al., 2019). Ainda, outros estudos do nosso grupo de pesquisa demonstraram que ligantes como anticorpos e fragmentos de anticorpos podem ser acoplados à superfície das nanocápsulas de núcleo lipídico via complexação organometálica (ALVES et al., 2020; ALVES et al., 2021; BENDER et al., 2014; CAVALCANTE et al., 2016; CAVALCANTE et al., 2021).

Como citado acima, a combinação entre lapatinibe e trastuzumabe já está sendo explorada na clínica. Além disso, vários trabalhos demonstram que a encapsulação do lapatinibe e o direcionamento de partícula pela funcionalização de superfície com o trastuzumabe são alternativas para melhorar o tratamento de câncer de mama HER2 positivo. Contudo, até o momento essa combinação ainda não foi explorada utilizando nanocápsulas de núcleo lipídico, nem mesmo com outras partículas de base nanotecnológica.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver nanocápsulas de núcleo lipídico multiparede contendo o fármaco ditosilato de lapatinibe e funcionalizadas com anticorpo monoclonal trastuzumabe, além de avaliar o seu potencial antitumoral *in vitro*, frente às células de câncer de mama HER2 positivo.

3.2. Objetivo Específico

Capítulo 1: Realizar levantamento bibliográfico sobre as nanocápsulas de núcleo lipídico, desde o processo de síntese, características físico-químicas, métodos de marcação fluorescente e modificação de superfície até as aplicações biológicas, a fim de redigir um artigo de revisão.

Capítulo 2: Desenvolver uma formulação de base nanotecnológica com a associação ditosilato de lapatinibe e trastuzumabe, caracterizando as nanocápsulas por diferentes técnicas. Além disso, avaliar o efeito antitumoral frente a células com superexpressão de HER2 (linhagem SKBR3) e investigar o processo de internalização das partículas.

Capítulo 3: Avaliar o efeito antitumoral frente a células com superexpressão de HER2, resistentes a inibidores de receptores tirosina quinase (linhagem HCC1954). Investigar alterações de expressão gênica relacionada a morte celular por apoptose e parada de ciclo celular.

Capítulo 4: Investigar a estabilidade da formulação desenvolvida em fluidos gástrico e intestinal simulados.

O texto completo do capítulo 1, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 44-119, foi suprimido por tratar-se de um manuscrito intitulado: “Nanocápsulas de Núcleo Lipídico: Preparação, Caracterização e Aplicações Biológicas”, publicado na revista Química Nova. Neste capítulo consta uma revisão bibliográfica sobre nanocápsulas de núcleo lipídico. As informações abordadas vão desde a estrutura supramolecular, aspectos metodológicos de preparação, fatores que influenciam nas suas características físico-químicas, bem como estratégias de marcação fluorescente e modificação de superfície. Neste artigo, também descrevemos a versatilidade desse sistema, o qual permite a obtenção de formulações com potencial aplicação nas áreas farmacêutica, médica e veterinária.

O texto completo do capítulo 2, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 122-151, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Neste capítulo consta a descrição do desenvolvimento de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo lapatinibe e funcionalização de superfície com o anticorpo trastuzumabe, sua caracterização físico-química, bem como, testes de viabilidade celular com a linhagem SKBR3 (HER2 positiva) para avaliar a citotoxicidade da formulação desenvolvida e a sua internalização celular (direcionamento ativo).

O texto completo do capítulo 3, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 154-180, foi suprimido por tratar-se da descrição de resultados que serão utilizados para a preparação de um manuscrito, o qual será posteriormente publicado em periódico científico. Neste capítulo consta uma breve descrição da caracterização físico-química de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo lapatinibe e funcionalização de superfície com o anticorpo trastuzumabe, bem como, testes de viabilidade celular na linhagem HCC1954 (HER2 positiva, intrinsecamente resistente a inibidores de tirosina-quinase) para avaliar a citotoxicidade da formulação desenvolvida, bem como, resultados da expressão gênica de marcadores relacionados a morte celular por apoptose e ciclo celular.

O texto completo do capítulo 4, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 182-208, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Neste capítulo a estabilidade das nanocápsulas de núcleo lipídico contendo lapatinibe e funcionalização de superfície com o anticorpo trastuzumabe foi avaliada após a exposição frete à fluidos biológicos simulados (fluido gástrico e intestinal).

8. DISCUSSÃO GERAL

8. DISCUSSÃO GERAL

O termo câncer representa um amplo espectro de doenças que apresentam como característica principal o crescimento descontrolado. Isso porque, as células que compõem os tumores apresentam sinalização proliferativa sustentada, evasão dos mecanismos de supressão de crescimento, células que apresentam resistência aos processos de morte celular e imortalidade replicativa (HANAHAN, WEIBERG, 2011). Outras características podem ser adicionadas as anteriormente descritas como: a evasão do sistema imunológico e reprogramação metabólica (HANAHAN, WEIBERG, 2011). Essas características aumentam os desafios para que os tratamentos sejam efetivos.

Entre as mulheres, o câncer de mama é a neoplasia mais frequente e com maior letalidade (GLOBOCAN, 2022). Assim como para outros tipos de câncer, há a necessidade do desenvolvimento de novos tratamentos para o câncer de mama, ou melhoria das opções já existentes. Nesse sentido, as pesquisas na área da nanotecnologia voltadas para o *drug delivery*, tem ganhado destaque. Diversos trabalhos investigam o direcionamento tumoral de antineoplásicos clássicos e novas moléculas, que estão sob investigação, via nanocarreadores orgânicos e inorgânicos. Além disso, a nanotecnologia aplicada a área médica e farmacêutica como um possibilidade para a implementação de terapias individualizadas (KEMP; KWON, 2021).

Entre as nanopartículas investigadas para essa finalidade estão as nanocápsulas de núcleo lipídico. Como pode ser observado no levantamento bibliográfico contemplado no artigo de revisão – Capítulo 1, uma parcela significativa dos artigos publicados entre 2013 – 2021, envolvendo nanocápsulas de núcleo lipídico, tem como objeto de investigação diferentes tipos de câncer. Também fica evidente a potencialidade desse sistema para tal finalidade visto o aumento da citotoxicidade de fármacos (ANTONOW et al., 2017; BRUINSMANN et al., 2020; FIGUEIRÓ et al., 2015), indução de diferentes mecanismos antitumorais (BUSS et al., 2019) e direcionamento ativo, evidenciados em estudos *in vitro* (ANTONOW et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018). Para além dos estudos *in vitro*, os estudos em modelo murinos demonstram que em um organismo complexo essas nanopartículas conseguem transpor barreiras biológicas e promover a entrega das substâncias ativas de estudos, atingindo o principal objetivo que é a redução tumoral (ALVES et al., 2021; PEREIRA et al., 2018; RODRIGUES et al., 2016). Mais importante que isso, é existência de estudo clínico aplicando as nanocápsulas de núcleo lipídico para o tratamento de lesões pré-tumorais (*clinical trials*: NCT04219358). O ingresso desse tipo

de nanopartícula nos ensaios clínicos, reforça a sua importância e a necessidade de avançar nos estudos que já foram iniciados com nanocápsulas de núcleo lipídico visando o tratamento oncológico. Além de explorá-la para a incorporação/completação de outros antineoplásicos.

Diante da versatilidade e potencialidade das nanocápsulas de núcleo lipídico, o presente estudo investigou a possibilidade de combinar, em uma mesma partícula, um inibidor específico e reversível dos receptores tirosina quinase EGFR e HER2 – o ditosilato de lapatinibe e um anticorpo monoclonal que reconhece a porção extracelular de HER2 – o trastuzumabe (XU et al., 2017). Como demonstrado no Capítulo 2, essa combinação é possível através da encapsulação do fármaco e a complexação do anticorpo na superfície da partícula, mantendo as características físico-químicas anteriormente relatadas para as nanocápsulas de núcleo lipídico (BRUINSMANN et al., 2020; BUSS et al., 2019).

Além das características físico-químicas, a formulação LAP-LNC⁺-TRAS apresentou direcionamento para células com expressão de HER2, uma vez que formulações marcadas, mas sem a funcionalização de superfície, apresentaram internalização de vermelho do Nilo similar ao corante em solução. Estudos comparativos com diferentes partículas, demonstram diferença na entrega de vermelho do Nilo comparado ao corante em solução, o que é atribuído a encapsulação (CADETE et al., 2019; SNIPSTAD et al., 2014). Além disso, partículas com diferentes características de superfície apresentaram internalização do corante de forma semelhante (CADETE et al., 2019). O dado de internalização vai ao encontro do teste de viabilidade celular, visto que o IC₅₀ por número de partícula foi menor para a formulação contendo o anticorpo na superfície após as 48 h de exposição.

A combinação de ditosilato de lapatinibe e trastuzumabe em uma mesma partícula é uma abordagem interessante, visto que essa combinação é utilizada na clínica para o tratamento do câncer de mama, principalmente em estágio mais avançados da doença, e até onde sabemos, até o momento, não havia sido explorada em nanocarreadores.

As formas farmacêuticas existentes para a administração do lapatinibe são por via oral e do trastuzumabe injetável (i.v ou intradérmico), respectivamente (WALLER, MÖBIUS, FUENTES-ALBURO, 2021). O lapatinibe possui baixa absorção pela via oral e baixa solubilidade em água. Neste contexto, a administração oral necessita de altas doses e a administração pela via intravenosa é dificultada (BUDHA et al. 2012; WAN et al., 2015). Aqui demonstramos que o ditosilato de lapatinibe pode ser encapsulado nas nanocápsulas de núcleo lipídico, as quais já foram exploradas para administração intravenosa de diferentes fármacos (PEREIRA et al., 2018) e talvez essa possa ser uma via de administração para a formulação

proposta. Lipossomas contendo lapatinibe melhoram o direcionamento do fármaco e apresentaram melhora na eficácia terapêutica após administração por via intravenosa de forma isolada ou em combinação com lipossomos de doxorubicina (SAREMI et al., 2021). Por outro lado, também demonstramos, no Capítulo 4, a manutenção do sistema nanoestruturado após a exposição a fluidos gástrico e intestinal, sendo essa também uma possível alternativa de administração, visto que a administração oral de nanocápsulas de núcleo lipídico melhoram o efeito terapêuticos alguns fármacos (MICHALOWSKI et al., 2021).

O presente trabalho demonstrou a possibilidade de produção da nanocápsulas e algumas atividades biológicas, porém ele não contempla todas as respostas sobre a funcionalidade e as limitações do sistema desenvolvido. Dessa forma, ele servirá de base para futuras investigações. Como relatamos no Capítulo 3, a baixa carga de fármaco e os ensaios *in vitro*, em um sistema de monocamada, evidenciaram o efeito da estrutura supramolecular das partículas sobre a viabilidade celular, no entanto efeitos adicionais, pela presença do fármaco e anticorpo não foram observados. Mendes et al., (2015) relatou que além do número de partícula, o tipo de nanocarreador pode influenciar negativamente a viabilidade celular em ensaios pré-clínicos. Além disso, demonstrou que sistemas poliméricos podem ser mais citotóxicos do que lipossomas. Neste contexto ainda há a necessidade de elucidar a forma com as nanocápsulas afetam os ensaios *in vitro*, bem como buscar novos modelos experimentais.

Outro resultado importante, descrito no Capítulo 3, foi a observação de que a formulação contendo ditosilato de lapatinibe e funcionalização de superfície proporcionou um aumento da expressão de P21 na linhagem HCC1954, sem que ocorressem alterações nas expressões de marcadores relacionados a apoptose e a P53. Esse resultado sugere que vias de sinalização relacionadas a parada de ciclo celular ou outra vias de morte podem, de alguma forma, influenciar na viabilidade celular e esses mecanismos merecem ser explorados em trabalhos futuros.

9. CONCLUSÕES

9. CONCLUSÕES

A elaboração do artigo de revisão permitiu o resgate das pesquisas recentes desenvolvidas com as nanocápsulas de núcleo lipídico demonstrando a versatilidade do sistema e sua potencialidade de aplicação nas áreas farmacêutica, médica e veterinária. Aliado a isso, o material elaborado conta com detalhes importantes sobre a síntese das nanocápsulas de núcleo lipídico, incluindo fatores metodológicos que influenciam nas características físico-químicas, sua estrutura supramolecular, estratégias de marcação fluorescente e modificação de superfície que podem contribuir para a elaboração de novos trabalhos.

Quanto a parte experimental, os resultados obtidos demonstram que nanocápsulas de núcleo lipídico contendo o fármaco ditosilato de lapatinibe podem ser obtidas pelo método de deposição de polímero pré-formado e que estas são passíveis de revestimento com o polímero catiônico quitosana e funcionalização, por complexação organometálica, com o anticorpo monoclonal trastuzumabe. Ainda, as formulações desenvolvidas apresentaram características físico-químicas que possibilitaram os ensaios *in vitro*.

In vitro, a formulação desenvolvida foi capaz de reduzir a viabilidade de uma linhagem celular HER2 positiva, a qual também é sensível ao fármaco ditosilato de lapatinibe e ao anticorpo trastuzumabe quando em solução. Aliado ao resultado de viabilidade, foi possível observar a importância da funcionalização de superfície para o direcionamento das nanocápsulas para células com superexpressão de HER2.

Também *in vitro* demonstramos que as partículas desenvolvidas são capazes de reduzir a viabilidade celular de células de câncer de mama HER2 positivas que apresentam resistência intrínseca a inibidores de tirosina quinase. Contudo, o efeito pode estar relacionado apenas à estrutura supramolecular do nanocarreador. Além disso, nessa linhagem e condição experimental, as características de superfície não exerceram influência no resultado.

Por fim, foi possível verificar a influência do revestimento com o polímero catiônico na estabilidade das partículas quando expostas a fluidos biológicos simulados, sendo esta essencial para que não ocorra redução no diâmetro de partícula quando da exposição ao fluido intestinal. Essa observação abre oportunidade para novas investigações, incluindo a estabilidade dos anticorpos quando complexados às nanocápsulas de núcleo lipídico e expostos aos fluidos gástrico e intestinal simulados.

10. PERSPECTIVAS

10. PERSPECTIVAS

Ainda são necessários estudos para compreender melhor como ocorre o direcionamento ativo para as células com superexpressão de HER2, principalmente como acontece o reconhecimento entre anticorpo e receptor, bem como o processo de internalização das partículas. Além disso, estudos futuros poderão elucidar se a redução na viabilidade celular de células sensíveis a inibidores de tirosina quinase, está associada ao direcionamento ativo da partícula ou ainda pela liberação do fármaco a partir nanocápsulas. Aliado a isso, são necessários ensaios para identificar quais os processos envolvidos na redução da viabilidade celular, incluindo a investigação de mecanismos de morte celular diferentes da apoptose. Também faz-se necessário estudos sobre o efeito da formulação proposta em linhagens de células normais (por exemplo, fibroblastos), a fim de confirmar sua seletividade para as células tumorais. Por fim, para determinar a eficácia da formulação no tratamento de câncer de mama, ensaios em modelos pré-clínicos alternativos ou modelo murino de câncer de mama são necessários, bem como estudos farmacocinéticos a fim de avaliar a administração da formulação por via oral ou intravenosa.

11. REFERÊNCIAS

ABEDIN, M. R. *et al.* Antibody – drug nanoparticle induced synergistic treatment efficacy in HER2 positive breast cancer cells. **Scientific Reports**, v. 11, p. 1–17, 2021.

AHN, S. *et al.* HER2 status in breast cancer : changes in guidelines and complicating factors for interpretation. **Journal of Pathology Translational Medicine**, v. 51, n. 1, p. 34–44, 2022.

ALVES, A. de C. S. *et al.* Chitosan-Coated Lipid-Core Nanocapsules Functionalized with Gold-III and Bevacizumab Induced *In Vitro* Cytotoxicity against C6 Cell Line and *In Vivo* Potent Antiangiogenic Activity. **Pharmaceutical Research**, v. 37, n. 91 , p. 1-17, 2020.

ALVES, A. de C. S. *et al.* EGFRvIII peptide nanocapsules and bevacizumab nanocapsules: a nose-to-brain multitarget approach against glioblastoma. **Nanomedicine**, v. 16, n. 20, p. 1775-1790, 2021.

ANTONOW, M. B. *et al.* Liquid formulation containing doxorubicin-loaded lipid-core nanocapsules: Cytotoxicity in human breast cancer cell line and in vitro uptake mechanism. **Materials Science Engineering C**, v. 76, p. 374–382, 2017.

ANTONOW, M. B. *et al.* Arginylglycylaspartic acid-surface-functionalized doxorubicin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to target alpha (V) beta(3) integrin expressed on tumor cells. **Nanomaterials**, v. 8, p. 1–18, 2018.

ANVISA. Agência de Vigilância Sanitária. Farmacopéia Brasileira. Ed. 6, v. 1, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/arquivos/7985json-file-1>. Acesso em: 29 de ago. 2020.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Herceptin. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/250000233539912/>. Acesso em: 10 de abr. de 2022.

APPERT-COLLIN, A. *et al.* Role of ErbB receptors in cancer cell migration and invasion. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. 283, p. 1-10, 2015.

ARRIBAS, J. *et al.* p95HER2 and breast cancer. **Cancer Research**, v. 71, n. 5, p. 1515-1519, 2011.

BAYER, V. An overview of monoclonal antibodies. **Seminars in oncology nursing**, v. 35, n. 5, p. 150927, 2019.

BENDER, E. A. *et al.* New strategy to surface functionalization of polymeric nanoparticles: one-pot synthesis of scFv anti- -functionalized nanocapsules. **Pharmaceutical Research**, v. 31, n. 11, p. 2975-2987, 2014.

BESSA, J. D. F. Breast imaging hindered during covid-19 pandemic in Brazil. **Rev. Saúde Pública**, p. 1–8, 2021.

BOEKHOUT, ANNELIES H.; BEIJNEN, JOS H.; SCHELLENS, JAN HM. Trastuzumab. **The oncologist**, v. 16, n. 6, p. 800-810, 2011.

BONDE, G. *et al.* Lapatinib nano-delivery systems: a promising future for breast cancer treatment. **Expert opinion on drug delivery**, v. 15, n. 5, p. 495-507, 2018.

BOTELHO, C. H.; ESTEVES-DIZ, M. D. P; CAMPOLINA, A. G.; Cost-effectiveness analysis of trastuzumab for early breast cancer in Brazil. **Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research**, p. 1-10, 2021.

BOWEN, J.M. *et al.* Determining the mechanisms of lapatinib - induced diarrhoea using a rat model. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 74, p. 617–627, 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde – Portaria nº 18, de 25 de julho de 2012. Torna pública a decisão de incorporar o medicamento trastuzumabe no Sistema Único de Saúde (SUS) para o tratamento do câncer de mama localmente avançado. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sctie/2012/prt0018_25_07_2012.html#:~:text=Torna%20p%C3%ABblica%20a%20decis%C3%A3o%20de,20%20e%20art. Acesso em: 15 de jan. 2023.

BRAY, F. *et al.* The Ever- - Increasing Importance of Cancer as a Leading Cause of Premature Death Worldwide 2020–2021. **Cancer**, v. 127, n. 16, p. 3029-3030, 2021.

BRETAS, G., RENNA, N.L., BINES, J. Practical considerations for expediting breast cancer treatment in Brazil. **The Lancet Regional Health – Americas 2**, n. 10028, 2021.

BRITT, K.L., CUZICK, J., PHILLIPS, A. Key steps for effective breast cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 20, p. 417-436, 2020.

BROSNAN, E. M.; ANDERS, C. K. Understanding patterns of brain metastasis in breast cancer and designing rational therapeutic strategies. **Annals of translational medicine**, v. 6, n. 9, p. 1-14, 2018.

BRUINSMANN, F. A. *et al.* Chitosan-coated nanoparticles: Effect of chitosan molecular weight on nasal transmucosal delivery. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 2, p. 86, 2019.

BRUINSMANN, F. A. *et al.* Erlotinib-loaded poly (ϵ -caprolactone) nanocapsules improve in vitro cytotoxicity and anticlonogenic effects on human A549 lung cancer cells. **AAPS PharmSciTech**, v. 21, n. 6, p. 1-12, 2020.

BVSMS. Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde: Gsk disponibiliza no Brasil comprimido para tratar câncer de mama, 2009. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/outubro/gsk_comprimido_cancer_mama_2110.pdf>. Acesso em: 10 de abr. de 2022.

BUDHA, N. R. *et al.* Drug Absorption Interactions Between Oral Targeted Anticancer Agents and PPIs: Is pH-Dependent Solubility the Achilles Heel of Targeted Therapy? **Clinical pharmacology & Therapeutics**, v. 92, n. 2, 2012.

BUSS, J. H. *et al.* Lapatinib-loaded nanocapsules enhances antitumoral effect in human bladder cancer cell. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. 203, p. 1-10, 2019.

CADETE, A. *et al.*, Self-assembled hyaluronan nanocapsules for the intracellular delivery of anticancer drugs. **Scientific Reports**, v. 9, n. 11565, p. 1-11, 2019.

CASTRO, Aila. Mabla. Azarias de. **O impacto de políticas públicas no acesso ao trastuzumabe para o tratamento de pacientes com câncer de mama em um Hospital Universitário**. 2020. Dissertação (Mestrado Profissional em Gestão de Organizações de Saúde) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Gestão de Organizações de Saúde, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

CAVALCANTE, M. F. *et al.* A nanoformulation containing a scFv reactive to electronegative LDL inhibits atherosclerosis in LDL receptor knockout mice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 107, p. 120-129, 2016.

CAVALCANTE, M. F. *et al.* scFv-Anti-LDL (-)-Metal-Complex Multi-Wall Functionalized-Nanocapsules as a Promising Tool for the Prevention of Atherosclerosis Progression. **Frontiers in Medicine**, v. 8, n. 652137, p. 1-14, 2021.

CÉ, R. *et al.* Chitosan-coated dapsone-loaded lipid-core nanocapsules: Growth inhibition of clinical isolates, multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus* ssp. **Colloids and Surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 511, p. 153-161, 2016.

CEOLIN, Taíse. **Desenvolvimento farmacotécnico de nanocápsulas multiparede contendo ditosilato de lapatinib e complexadas com metal para funcionalização de superfície**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2016.

CHAVES, G. C. *et al.* Medicamentos em situação de exclusividade financiados pelo Ministério da Saúde: análise da situação patentária e das compras públicas - Rio de Janeiro: Fiocruz, ENSP, 2018.

CHUNG, I. *et al.* High cell-surface density of HER2 deforms cell membranes. **Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2016.

CITRI, A., YARDEN, Y. REVIEWS EGF – ERBB signalling: towards the systems level **Nature Reviews**, v. 7, p. 505–516, 2006.

CLAVAREZZA, M. *et al.* Dual Block with Lapatinib and Trastuzumab Versus Single-Agent Trastuzumab Combined with Chemotherapy as Neoadjuvant Treatment of HER2-Positive Breast Cancer: **A Meta-analysis of Randomized Trials**, v. 22, p. 4594–4603, 2016.

DEBIASI, M. *et al.* Estimation of premature deaths from lack of access to anti-HER2 therapy for advanced breast cancer in the Brazilian public health system. *Journal of Global Oncology*, v. 3, n. 3, p. 201-207, 2017.

DRUGBANK. Lapatinib. Disponível em: <<https://go.drugbank.com/drugs/DB01259>>. Acesso em: 16 de mar. de 2022.

EIGER, D. *et al.* Long-term cardiac outcomes of patients with HER2-positive breast cancer treated in the adjuvant lapatinib and / or trastuzumab Treatment Optimization. **British Journal of Cancer**, v. 122, n. 10, p. 1453-1460, 2020.

ELIYATKIN, N. *et al.* Molecular Classification of Breast Carcinoma : From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. **The Journal of Breast Health**, v. 11, n. 2, p. 59–66, 2015.

FDA. Herceptin (trastuzumab), 2018. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/103792s5345lbl.pdf>. Acesso em: 16 de mar. de 2022.

FDA. Herceptin Hylecta, 2019. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/761106s000lbl.pdf>. Acesso em: 16 de mar. de 2022.

FDA. Trastuzumab, Genentech Herceptin approval letter. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/applletter/1998/trasgen092598l.pdf>. Acesso em: 16 de mar. de 2022.

FDA. Tykerb (Lapatinib), 2010. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/022059s007lbl.pdf>. Acesso em: 16 de mar. de 2022.

FIGUEIRÓ, F. *et al.* Pharmacological improvement and preclinical evaluation of methotrexate-loaded lipid-core nanocapsules in a glioblastoma model. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 11, n. 10 1808–1818., 2015.

GLOBOCAN. Cancer Today. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=2&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0>. Acesso em: 18 de jan. de 2022.

GRAUS-PORTA, D. *et al.* ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. **The EMBO Journal**. v. 16, p. 1647–1655, 1997.

GUARNERI, V. *et al.* Survival after neoadjuvant therapy with trastuzumab e lapatinib and chemotherapy in patients with HER2-positive early breast cancer : a meta-analysis of randomized trials. **ESMO Open**, v. 7, n. 100433, p. 1-6, 2022.

GUTIERREZ, C, SCHIFF., HER2: biology, detection, and clinical implications. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 135, n. 1, p. 55-62, 2011.

HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, 2011.

HARBECK, N. *et al.* Breast cancer. **Nature Reviews**, v. 5, n. 66, p.1-13, 2019.

HARRIES, M., SMITH, I. The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin). **Endocrine Related Cancer**, v. 9, n. 2 p. 75–85, 2002.

HASSIOTOU, F., GEDDES, D. Anatomy of the Human Mammary Gland: Current Status of Knowledge. **Clinical Anatomy**. v. 26, n. 1, p. 29-48, 2012.

HUDIS, C. A. Trastuzumab—mechanism of action and use in clinical practice. **New England journal of medicine**, v. 357, n. 1, p. 39-51, 2007.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 23 de jan. de 2022.

IQBAL, N., IQBAL, N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers : Overexpression and Therapeutic Implications, **Molecular Biology International**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

KALLI, S. *et al.* American joint committee on cancer's staging system for breast cancer: what the radiologist needs to know. **Radiographics**, v. 38, n. 7, p. 1921-1933, 2018.

KEMP, J. A., KWON, Y. J. Cancer nanotechnology: current status and perspectives. **Nano Convergence**, v. 8, n. 34, p. 1-38, 2021.

KIERSZENBAUM, Abraham; TRES, Laura. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. 3. Ed. Elsevier, 2008, p. 676.

KONECNY, G. E., *et al.* Activity of the Dual Kinase Inhibitor Lapatinib (GW572016) against HER-2-Overexpressing and Trastuzumab-Treated Breast Cancer Cells. **Cancer Research**, v. 66, n. 3, p. 1630–1639, 2006.

LIAO, J. *et al.* Lapatinib: new opportunities for management of breast cancer. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 2, p. 79-91, 2010.

LIN, Y. L. *et al.* Specific drug delivery efficiently induced human breast tumor regression using a lipoplex by non-covalent association with anti-tumor antibodies. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 17, n. 1, p. 1-11, 2019.

LOIBL, S. *et al.* 2021. Seminar Breast cancer. **Lancet**, v. 397, n. 10286, p. 1750–1769, 2021.

LU, H. *et al.* Dual targeting micelles loaded with paclitaxel and lapatinib for combinational therapy of brain metastases from breast cancer. **Scientific Reports**, v. 12, n. 2610, p. 1–10, 2022.

LUKONG, K. E. Understanding breast cancer—The long and winding road. **BBA clinical**, v. 7, p. 64-77, 2017.

LV, Q. *et al.* Molecular mechanisms and translational therapies for human epidermal receptor 2 positive breast cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2095, p. 1-21, 2016.

MARUYAMA, T. *et al.* Lapatinib enhances herceptin-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity by up-regulation of cell surface HER2 expression. **Anticancer Research**, v. 31, n. 9, p. 2999-3005, 2011.

MAYER, F. Q. *et al.* Laronidase-functionalized multiple-wall lipid-core nanocapsules: promising formulation for a more effective treatment of mucopolysaccharidosis type I. **Pharmaceutical Research**, v. 32, n. 3, p. 941-954, 2015.

MEEL, R. van der, *et al.* Ligand-targeted particulate nanomedicines undergoing clinical evaluation: **Current status. Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 10, p. 1284–1298, 2013.

MENDES, L. P. *et al.* Biodegradable nanoparticles designed for drug delivery: The number of nanoparticles impacts on cytotoxicity. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 6, p. 1268-1274, 2015.

MICHALOWSKI, C. B. *et al.* Oral treatment of spontaneously hypertensive rats with captopril-surface functionalized furosemide-loaded multi-wall lipid-core nanocapsules. **Pharmaceutics** v. 12, n. 80, p. 1-23, 2020.

MOASSER, M. M. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. **Oncogene**, v. 26, n. 45, p. 6469–6487, 2007.

MOCCIA, C., HAASE, K. Engineering Breast Cancer On-chip — Moving Toward Subtype Specific Models. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 2021, n. 9, p. 1–20, 2021.

NAHTA, R., ESTEVA, F. J. Review HER2 therapy Molecular mechanisms of trastuzumab resistance Trastuzumab: mechanisms of antitumor effects. **Breast Cancer Research**, v. 8, n. 215, p. 1–8, 2006.

NELSON, E. L. HER2/neu: an increasingly important therapeutic target. Part 1: basic biology & therapeutic armamentarium. **Clinical Investigation**, v. 4, n. 7, p. 649-671, 2014a.

NELSON, E. L. HER2/neu: An Increasingly Important Therapeutic Target: Part 2 Distribution of HER2/neu Overexpression and Gene Amplification by Organ, Tumor Site and Histology. **Clinical Investigation**, v. 4, n. 7, 2014b.

NIZA, E. *et al.* Trastuzumab-Targeted Biodegradable Nanoparticles for Enhanced Delivery of Dasatinib in HER2 + Metastatic Breast Cancer. **Nanomaterials**, v. 9, n. 12, 1–14, 2019.

OLIVEIRA, C. P. *et al.* Enhanced and selective antiproliferative activity of methotrexate-functionalized-nanocapsules to human breast cancer cells (MCF-7). **Nanomaterials**, v. 8, n. 24, p. 1-19, 2018.

OH, D., BANG, Y. HER2-targeted therapies — a role beyond breast cancer. **Nature Reviews. Clinical. Oncology**, v. 17, n. 1, p. 33-48, 2020.

POHLMANN, P. R.; MAYER, I. A.; MERNAUGH, R. Resistance to trastuzumab in breast cancer. **Clinical cancer research**, v. 15, n. 24, p. 7479-7491, 2009.

PUBCHEM. Lapatinib. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lapatinib>>. Acesso em: 16 mar. de 2022.

RODRIGUES, S. F. *et al.* Lipid-core nanocapsules act as a drug shuttle through the blood brain barrier and reduce glioblastoma after intravenous or oral administration. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 12, n. 5, p. 986–1000, 2016.

SÁ, M. F. S. de. Pink October and Breast Cancer in Brazil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 43, p. 725-727, 2021.

SARDESAI, S. D.; STORNILO, A. M. Lapatinib: an oral dual tyrosine kinase inhibitor for HER-2-positive breast cancer. **Women's Health**, v. 11, n. 3, p. 281-294, 2015.

SAREMI, S. S. *et al.* Development of a stable and high loaded liposomal formulation of lapatinib with enhanced therapeutic effects for breast cancer in combination with Caelyx®: In vitro and in vivo evaluations. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** v. 207, n. 112012, p. 1-11, 2021.

SAWYERS, C.L., SHEPARD, H. M., SLAMON, D. J. BenchMarks Herceptin : A First Assault on Oncogenes that Launched a Revolution. **Cell** 179, 8–12, 2019.

SCALTRITI, M. *et al.* Lapatinib, a HER2 tyrosine kinase inhibitor , induces stabilization and accumulation of HER2 and potentiates trastuzumab-dependent cell cytotoxicity. **Oncogene**, v. 28, p. 803–814, 2009.

SCHLAM, I; SWAIN, S. M. HER2-positive breast cancer and tyrosine kinase inhibitors: The time is now. **NPJ Breast Cancer**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2021.

SNIPSTAD, S. *et al.*, Contact-mediated intracellular delivery of hydrophobic drugs from polymeric nanoparticles. **Cancer Nanotechnology**. v. 5, n. 8, p. 1-18, 2014.

STEIN, R. A.; STAROS, J. V. Insights into the evolution of the ErbB receptor family and their ligands from sequence analysis. **BMC Evolutionary Biology**, v. 6, n. 1, p. 1-17, 2006.

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

TAI, W.; MAHATO, R.; CHENG, K. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 146, n. 3, p. 264-275, 2010.

TAURIN, S., ALKHALIFA, H. Breast cancers, mammary stem cells, and cancer stem cells, characteristics, and hypotheses, 1, 2. **Neoplasia**, v 22, n. 12, p. 663–678, 2020.

TSANG, J. Y. S., TSE, G. M. Molecular Classification of Breast Cancer. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 27, n.1, p. 27-35., 2020.

VIDAL, T. J. *et al.* Demandas judiciais por medicamentos antineoplásicos: a ponta de um iceberg? **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 22, n. 8, 2017.

WALLER, C. F. Intravenous and subcutaneous formulations of trastuzumab, and trastuzumab biosimilars : implications for clinical practice. **British Journal of Cancer**, v. 124, p. 1346-1352, 2021.

WAN, X. *et al.* Incorporation of lapatinib into human serum albumin nanoparticles with enhanced anti-tumor effects in HER2-positive breast cancer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 817-827, 2015.

WHITE, B. E. *et al.* Nanotechnology approaches to addressing HER2 - positive breast cancer. **Cancer Nanotechnology**, v. 11, n. 12, 1–26, 2020.

WHO, World Health Organization, Breast cancer. Disponível em: <<https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>>. Acesso em: 22 de fev. de 2019.

WU, S. *et al.* Evolution and functional divergence of the ERBB receptor family. **Pharmacogenomics**, v. 22, p. 473–484, 2021.

WYNN, C. S.; TANG, S-C. Anti-HER2 therapy in metastatic breast cancer: many choices and future directions. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 41, n. 1, p. 193-209, 2022.

XIA, W. *et al.* Combining lapatinib (GW572016), a small molecule inhibitor of ErbB1 and ErbB2 tyrosine kinases, with therapeutic anti-ErbB2 antibodies enhances apoptosis of ErbB2-overexpressing breast cancer cells. **Oncogene**, v. 24, n. 41, p. 6213-6221, 2005.

XU, Z. *et al.* Efficacy and safety of lapatinib and trastuzumab for HER2-positive breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **BMJ open**, v. 7, n. 3, p. e013053, 2017.

YANG, X., WANG, H., JIAO, B. Mammary gland stem cells and their application in breast cancer. **Oncotarget**, v. 8, p. 10675–10691, 2017.

YARDEN, Y., SLIWKOWSKI, M. X., Untangling the erbb signalling network. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, p. 127-137, 2001.

ZACZEK, A., BRANDT, B., BIELAWSKI, K. P. The diverse signaling network of EGFR, HER2, HER3 and HER4 tyrosine kinase receptors. **Histology and Histopathology**, v. 20, n. 3, p. 1005-1015, 2005.

ZHANG, S. *et al.* A pH-sensitive T7 peptide-decorated liposome system for HER2 inhibitor extracellular delivery: an application for the efficient suppression of HER2+ breast cancer. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2021, n. 9, p. 8768-8778, 2021.

ZHAO, J. *et al.* Trastuzumab Blocks the Receiver Function of HER2 Leading to the Population Shifts of HER2-Containing Homodimers and Heterodimers. **Antibodies**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2021.

ZUBAIR, M., WANG, S., ALI, N. Advanced Approaches to Breast Cancer Classification and Diagnosis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. 632079, p. 1–24, 2021.

Apêndice 1: Artigo publicado

Parte dos dados que compõem o artigo: *Dallemole, D. R.; Terroso, T.; Alves, A. d. C. S.; Scholl, J. N.; Onzi, G. R.; Cé, R.; Paese, K.; Battastini, A. M. O.; Guterres, S. S.; Figueiró, F.; Polhmann, A. R. Nanoformulation Shows Cytotoxicity against Glioblastoma Cell Lines and Antiangiogenic Activity in Chicken Chorioallantoic Membrane. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 862 p. 1-20.. <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/6/862>” foram obtidos durante período de vigência do doutorado (2019-2021).*