

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 10/12/2021.



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE LIPOSSOMAS FUNCIONALIZADOS COM
TRANSFERRINA PARA VEICULAÇÃO DE DOCETAXEL PARA O
TRATAMENTO DO CÂNCER DE PRÓSTATA**

Mestranda: Mariza Aires Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara - SP

2019



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE LIPOSSOMAS FUNCIONALIZADOS COM
TRANSFERRINA PARA VEICULAÇÃO DE DOCETAXEL PARA O
TRATAMENTO DO CÂNCER DE PRÓSTATA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Mestranda: Mariza Aires Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Araraquara-SP

2019

F363a Fernandes, Mariza Aires.
Avaliação do potencial de lipossomas funcionalizados com transferrina para veiculação de docetaxel para o tratamento do câncer de próstata / Mariza Aires Fernandes. – Araraquara: [S.n.], 2019. 108 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Marlus Chorilli.

1. Lipossomas. 2. Funcionalização. 3. Docetaxel. 4. Câncer de Próstata. I. Chorilli, Marlus, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

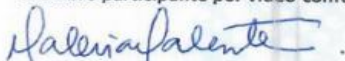
ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MARIZA AIRES FERNANDES, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DO CÂMPUS DE ARARAQUARA-UNESP.

Aos 10 dias do mês de dezembro do ano de 2019, às 14:00 horas, no(a) Sala de Vídeo-conferência do Prédio da Administração da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara UNESP, reuniu-se as Comissões Examinadoras da Defesa Pública, composta pelos seguintes Professores Doutores: MARLUS CHORILLI (Orientador) do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, Prof. Dr. JOSIMAR DE OLIVEIRA ELOY do(a) Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem / Universidade Federal do Ceará, Profa. Dra. VALERIA VALENTE do(a) Departamento de Análise Clínicas do Câmpus de Araraquara da UNESP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MARIZA AIRES FERNANDES, intitulado "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE LIPOSSOMAS FUNCIONALIZADOS COM TRANSFERRINA PARA VEICULAÇÃO DE DOCETAXEL PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER DE PRÓSTATA". O Professor Doutor JOSIMAR DE OLIVEIRA ELOY participou da defesa por meio de vídeo-conferência. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora presentes e virtualmente pelo Professor JOSIMAR DE OLIVEIRA ELOY, tendo recebido o conceito final: Aprovado.

Registre-se, que nesta ata, não constará a assinatura do membro da Comissão Examinadora participante por meio de vídeo-conferência. Será anexado a esta ata, parecer circunstanciado do membro participante por vídeo-conferência, enviado por e-mail. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora presentes.


MARLUS CHORILLI (Orientador)

JOSIMAR DE OLIVEIRA ELOY (parecer anexo)
Membro participante por vídeo-conferência


VALERIA VALENTE



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araraquara



**DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA.**

DISCENTE: MARIZA AIRES FERNANDES

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE LIPOSSOMAS FUNCIONALIZADOS COM
TRANSFERRINA PARA VEICULAÇÃO DE DOCETAXEL PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER DE PRÓSTATA

DATA: 10 de Dezembro de 2019 às 14:00

LOCAL: Sala de Vídeo-conferência do Prédio da Administração da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas do Campus de Araraquara - UNESP

(X) APROVADO

() REPROVADO

PARECER A SER EMITIDO NO MOMENTO DA DEFESA :

Araraquara, 10 de Dezembro de 2019.

Prof. Dr. JOSIMAR DE OLIVEIRA ELOY

Membro Titular participante por meio de vídeo-conferência

*Dedico este trabalho a minha família, especialmente a minha mãe, **M^a Nadilza Aires Galvão**, e a minha amada **Lays Rodrigues Moura** por todo amor, carinho, conselhos, ajuda, paciência, confiança e incentivos que recebi.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por acreditar que nossa existência pressupõe outra infinitamente superior. Agradeço a ti pelos obstáculos enfrentados, pois através deles pude amadurecer; pela ausência das pessoas que amo, pois através dela pude ver o quanto são importantes na minha vida.

A minha amada mãe, Maria Nadilza Aires Galvão, que faz de tudo pela minha felicidade, realizando os meus maiores sonhos e sempre me motivando a buscar sempre mais, tanto no âmbito emocional quanto profissional. Só tenho a agradecer a Deus todos os dias por tudo que faz por mim. Obrigada pela compreensão em suportar pacientemente uma filha distante da vida familiar durante anos e especialmente a senhora ofereço esta conquista.

À Lays pelo companheirismo, por me motivar a seguir meus sonhos sempre, pela paciência, por ir me ajudar na realização dos experimentos até mesmo aos finais de semana e por me acalmar quando algo não dava certo. Te agradeço de todo meu coração pelo amor, cuidado e atenção.

Ao meu irmão Mário Elder Aires Fernandes, aos meus amigos Luiza Dezem Ambrósio, Rodolfo Paganelli, Luana Galvão, Mariana Pimenta, Alexandre Fernandes, Cássia Suellen Ferreira e aos amigos que fiz na graduação Cristina Almeida da Silva, Lamuel Estevam e Ismael Pinheiro, obrigada pelo companheirismo e carinho.

Aos colegas do laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Especialmente Andressa Pironi, Paula Scanavez, Francesca Victorelli, Eliete Von Zuben, Lucas Noboru, Gilmar Hanck, Franciele Baveloni, Mauricio Palmeira, Renata Carolina Alves, Leidiana Reis, Fernanda Boni, Camila Rodero e Mariana Rillo Sato amigos que fiz durante essa etapa, muito obrigada, por todo o apoio e por contribuírem para meu crescimento. Estou certa de que, sem vocês seria mais difícil.

Minha gratidão especial ao Prof. Dr. Marlus Chorilli, meu orientador, pela pessoa e profissional que é, sempre muito cuidadoso com todos seus alunos e colaboradores. Obrigada por sua dedicação, que até mesmo aos finais de semana e férias deixa de lado seus momentos de descanso para orientar. E principalmente, muito obrigada por ter acreditado e depositado sua

confiança em mim para realização deste trabalho. Sem sua orientação, apoio, confiança e amizade, não somente neste trabalho, mas em todo caminho percorrido até aqui, nada disso seria possível.

À Professora Dra. Maria Palmira Daflon Gremião por disponibilizar o espaço, os equipamentos e compartilhar do seu conhecimento durante o período de desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. Josimar de Oliveira Eloy, primeiramente por contribuir na participação da banca de qualificação desse trabalho e por todo auxílio durante o desenvolvimento deste projeto.

Agradeço à Natalia, técnica do laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica por todo o auxílio. E aos funcionários da Seção Técnica de Pós-Graduação que sempre foram muito atenciosos, pacientes e prestativos.

À Profa. Dra. Maria José Santos-Martinez pela oportunidade e supervisão do trabalho no exterior, colaborando nos experimentos de viabilidade celular e interação receptor - proteína *in vitro através da Microbalança de Cristal de Quartzo com Dissipação (QCM-D)*. Aos alunos do grupo —Platelets pelo acolhimento e ensinamentos valiosos, e à Msc. Laura Rodriguez de la Fuente, que me auxiliou e foi muito importante para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas da Trinity College Dublin (TBSI), por aceitar me receber como aluna visitante e disponibilizar o espaço e os equipamentos para o desenvolvimento do trabalho. Em especial ao —Instituto Panoz, técnico responsável Brian Talbot e ao doutorando Ricardo Cruz.

Aos amigos que fiz em Dublin, conhecer pessoas tão especiais e tão diferentes de mim, foi o melhor que poderia ter acontecido. Me lembrarei sempre de todos vocês com muito carinho.

Ao CMAF-FCFAR pela disponibilidade de utilização do rotaevaporador, sob coordenação da Profa. Dra. Leila Aparecida Chiavacci Favorin.

Ao Laboratório de Biologia Molecular - FCFAR, em especial ao Prof. Dr. Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli e a doutoranda Angélica Hollunder Klippel pelo auxílio nas análises de SDS-PAGE.

Ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, em especial a doutoranda Marcela Tavares pelo auxílio nas análises de citotoxicidade e *uptake* celular.

Ao Laboratório de Laboratório de Bioquímica e Biofísica de Proteínas - USP, São Carlos, em especial ao Prof. Dr. Júlio César Borges e seu aluno Sérgio Luiz Ramos Junior pelo auxílio nas análises de Dicroísmo circular e Espectroscopia de fluorescência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), código de financiamento 001 pelos meses de auxílio financeiro e por atuar na expansão e consolidação da pós-graduação *stricto sensu* em todos os estados do país.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processos nº 2017/25190-8 e 2018/26422-2, pelas bolsas de mestrado e estágio no exterior, como apoio financeiro

À todos aqueles que por um momento de distração deixei de mencionar os nomes, mas de uma maneira ou de outra, colaboraram para que este trabalho se concretizasse, contribuindo de modo efetivo para a sua realização, agradeço de coração.

“A gratidão individual é uma nota harmônica a contribuir para a sinfonia universal, ampliando- se e tornando-se um sentimento coletivo que proporciona o equilíbrio social e espiritual da humanidade”

“Psicologia da Gratidão” - Joanna de Ângelis, Psicografia de Divaldo Franco

RESUMO

O câncer de próstata (CP) é a neoplasia maligna urológica mais comum e a segunda principal causa de mortalidade de homens associada ao câncer no mundo. O tratamento é iniciado por meio de intervenções cirúrgicas que abrangem a prostatectomia radical, tratamentos radioterápicos, terapias envolvendo privação androgênica e as imunoterapias. A quimioterapia também é bastante utilizada e recentes estudos demonstraram um controle notável do crescimento do CP utilizando docetaxel (DTX). No entanto, o DTX apresenta efeitos colaterais associados à toxicidade, tanto do fármaco como da formulação, Taxotere[®]. Em consequência disso, o desenvolvimento de sistemas nanotecnológicos de liberação de fármacos, como lipossomas, tem sido promissor para o tratamento do CP, em virtude das múltiplas características favoráveis desses nanossistemas, como biocompatibilidade e biodegradabilidade. Uma abordagem atrativa é a modificação superficial dos lipossomas com ligantes específicos dos receptores regulados nas superfícies de células tumorais, como os receptores de transferrina, que podem ser superexpressos em células tumorais de próstata. O atual trabalho visou desenvolver, caracterizar e avaliar a citotoxicidade *in vitro* de lipossomas funcionalizados com transferrina para veiculação do DTX no tratamento do CP. Os lipossomas foram obtidos por meio da técnica clássica da hidratação do filme lipídico e foram constituídos pela mistura de fosfatidilcolina de soja (SPC): colesterol (Col) : DSPE-PEG (2000)-Maleimida e SPC:Col:DSPE-PEG (2000)-Maleimida:DTX, nas proporções molares 10:2:0.78 e 10:2:0.78:0.52, respectivamente. As caracterizações foram realizadas a partir das formulações vazias e com DTX antes e após o processo de funcionalização. Foram realizadas análises do diâmetro médio da partícula, índice de polidispersidade (IPD) e potencial zeta (PZ) empregando o equipamento *Dinamic Light Scattering* (DLS) e análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os valores do diâmetro médio obtidos se mantiveram menores que 100nm, o IPD em 0,400 e o PZ entre -23,06 a -21,2mV. Por meio da MET foi possível comprovar a morfologia esférica da vesícula, corroborando o tamanho obtido pela técnica de DLS. Foram realizadas análises da concentração por Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA). O processo de funcionalização foi obtido com sucesso e as estruturas primárias, secundárias e terciárias da transferrina avaliadas por SDS-PAGE, dicróismo circular e por espectroscopia de fluorescência confirmaram que o processo não alterou a sua integridade. A eficiência de funcionalização foi de 31% avaliada pelo ensaio BCA. Para avaliar a eficiência de encapsulação e a liberação do DTX a metodologia analítica foi validada por cromatografia líquida de alta eficiência. Verificou-se que 69 e 37% de DTX estava encapsulado nos lipossomas sem e com funcionalização, respectivamente. O ensaio de liberação foi realizado em PBS pH 7,4 com 1,25% de lauril sulfato de sódio utilizando membranas de diálise de celulose de peso molecular 12-14kDa para o fármaco livre, sistemas funcionalizados (B) e não funcionalizados (D) contendo docetaxel. A difusão do fármaco livre através da membrana foi superior a 60% após 72 horas de estudo, demonstrando que a liberação do DTX não foi limitada pela membrana de diálise. No caso dos lipossomas, a liberação de DTX foi de 51,70% e 31,97% para os lipossomas não funcionalizados e funcionalizados, respectivamente. Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* e *uptake celular* em linhagens PC-3 e PNT2 sugerem que os lipossomas vazios e vazios funcionalizados não são tóxicos às linhagens testadas; no entanto, os lipossomas carregados com DTX apresentaram elevada toxicidade em ambas as linhagens. Através do ensaio de microscopia confocal e citometria de fluxo foi possível comprovar que os lipossomas funcionalizados apresentaram *uptake* pronunciado em linhagem PC3. Pode-se comprovar também a interação desses sistemas com os TfR's superexpressos na superfície celular através da QCM-D. Os resultados obtidos evidenciam que os lipossomas funcionalizados com transferrina são uma estratégia promissora para entrega de docetaxel, porém estudos adicionais em modelo celular tridimensional e *in vivo* são necessários.

Palavras-chave: Lipossomas; Funcionalização; Docetaxel; Câncer de Próstata.

ABSTRACT

Prostate cancer (PC) is the most common urological malignancy and the second leading cause of cancer-related mortality in men worldwide. Treatment is initiated through surgical interventions that include radical prostatectomy, radiotherapy treatments, androgen deprivation therapies and immunotherapies. Chemotherapy is also widely used and recent studies have shown remarkable control of CP growth using docetaxel (DTX). However, DTX has side effects associated with the toxicity of both the drug and the formulation Taxotere®. As a result, the development of nanotechnological drug delivery systems, such as liposomes, has been promising for the treatment of CP, due to the multiple favorable characteristics of these nanosystems, such as biocompatibility and biodegradability. An attractive approach is the superficial modification of liposomes with receptor-specific ligands regulated on tumor cell surfaces, such as transferrin receptors, which can be overexpressed in prostate tumor cells. The present work aimed to develop, characterize and evaluate the in vitro cytotoxicity of transferrin-functionalized liposomes for DTX delivery in the treatment of CP. The liposomes were obtained by the classical technique of hydration of the lipid film and consisted of soybean phosphatidylcholine (SPC): cholesterol (Col): DSPE-PEG (2000) -Maleimide and SPC: Col: DSPE-PEG (2000) mixture.) -Maleimide: DTX, in the molar ratios 10: 2: 0.78 and 10: 2: 0.78: 0.52, respectively. The characterizations were performed from the empty formulations and with DTX before and after the functionalization process. Particle average diameter, polydispersity index (IPD) and zeta potential (PZ) analyzes were performed using the Dinamic Light Scattering (DLS) and morphological analysis by transmission electron microscopy (MET). The average diameter values obtained remained below 100nm, the IPD at 0.400 and the PZ between -23.06 to -21.2mV. Through MET it was possible to prove the spherical morphology of the gall bladder, corroborating the size obtained by the DLS technique. Concentration analyzes were performed by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). The functionalization process was successfully obtained and the primary, secondary and tertiary transferrin structures evaluated by SDS-PAGE, circular dichroism and fluorescence spectroscopy confirmed that the process did not alter its integrity. Functionalization efficiency was 31% evaluated by the BCA assay. To evaluate the encapsulation efficiency and DTX release the analytical methodology was validated by high performance liquid chromatography. 69 and 37% of DTX were found to be encapsulated in liposomes without and with functionalization, respectively. The release assay was performed in PBS pH 7.4 with 1.25% sodium lauryl sulfate using 12-14kDa molecular weight cellulose dialysis membranes for free drug, functionalized (B) and non-functionalized (D) systems. containing docetaxel. Free drug diffusion across the membrane was greater than 60% after 72 hours of study, demonstrating that DTX release was not limited by the dialysis membrane. In the case of liposomes, DTX release was 51.70% and 31.97% for non-functionalized and functionalized liposomes, respectively. In vitro cytotoxicity and cell uptake assays in PC-3 and PNT2 strains suggest that empty and functionalized empty liposomes are not toxic to the strains tested; however, DTX-loaded liposomes showed high toxicity in both strains. Through the confocal microscopy and flow cytometry assay it was possible to prove that the functionalized liposomes presented pronounced uptake in PC3 strain. The interaction of these systems with the overexpressed TfRs on the cell surface through QCM-D can also be proven. The results obtained show that transferrin-functionalized liposomes are a promising strategy for the delivery of docetaxel, however additional studies in three-dimensional and in vivo cell models are necessary.

Keywords: Liposomes; Functionalization; Docetaxel; Prostate cancer.

1.INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de próstata

O câncer de próstata é a neoplasia maligna urológica mais comum e a segunda principal causa de mortalidade de homens associada ao câncer no mundo (MORI et al., 2007; GUO et al., 2016). Na última estimativa mundial, foram registrados aproximadamente 1,3 milhão de novos casos por ano e 360 mil mortes para o câncer de próstata, sendo que países como Austrália, Nova Zelândia e países do Norte e Oeste Europeu, e América do Norte possuem as maiores taxas de incidência (IARC, 2018).

No Brasil, sua incidência está abaixo apenas do câncer de pele não-melanoma. Segundo o Instituto Nacional de Câncer no último ano, a estimativa de câncer de próstata seria de 68.220 mil novos casos entre 2018 e 2019 no Brasil. Além disso, vale ressaltar que as regiões do país com maiores índices são as regiões sul, sudeste e centro-oeste, sendo respectivamente 96,85; 69,83 e 66,75 a cada 100 mil homens (INCA, 2018)

1.1.1. Biologia do câncer de próstata

A próstata humana é uma glândula localizada entre a bexiga e o reto, originada de células epiteliais endodérmicas e mesodérmicas. O papel fundamental da próstata é produzir o líquido prostático, o qual protege os espermatozoides, possibilitando a reprodução e fecundação (INCA, 2018). O desenvolvimento e manutenção de suas funções são regulados por um sistema complexo envolvendo células, hormônios, receptores, genes e proteínas (CARRIÓN-SALIP et al., 2012).

Os hormônios androgênicos são os principais responsáveis pela homeostase da próstata normal ao regular a expressão de genes específicos, entretanto exercem função importante no processo inicial de formação e manutenção do tumor de próstata (RAMÍREZ-BALDERRAMA et al., 2013).

Neste sentido, o surgimento do câncer de próstata está relacionado a diversos fatores, o envelhecimento é apontado como principal fator de risco para o surgimento do câncer de próstata, pois à medida que o indivíduo atinge uma certa idade (~ 70 anos) ocorre aumento do tamanho da próstata. No entanto, homens na faixa dos 30 e 40 anos podem apresentar sintomas (MAITLAND, 2013). Os demais fatores de risco são a origem étnica e herança genética e fatores extrínsecos relacionados à dieta, consumo de álcool, tabagismo, exposição à radiação ultravioleta (UV) e doenças sexualmente transmissíveis (SIEGEL et al., 2015; KRIZHANOVSKY et al., 2008).

O câncer de próstata é uma doença heterogênea devido à complexidade de suas características biológicas, hormonais e moleculares, as quais possibilitam o processo de progressão tumoral (RUSSELL; KINGSLEY, 2003). Em fase inicial, a doença é assintomática ou os indivíduos apresentam alterações do volume e ritmo urinário relacionados à hiperplasia prostática benigna (LIU et al., 2017).

A acentuada incidência de morbidade e mortalidade associadas ao câncer de próstata estão relacionadas à sua alta possibilidade de metástase, o que enfatiza a importância de um diagnóstico preciso e precoce. Dentre os métodos de diagnóstico que possibilitam a descoberta da doença em estágio inicial incluem o exame de toque retal e o teste sanguíneo do antígeno prostático específico (PSA). No entanto, em caso de toque anormal e PSA elevado, o paciente deve ser submetido a uma ultrassonografia transretal com biópsia da próstata. Desta forma, o diagnóstico de confirmação do câncer é feito pelo estudo histopatológico do tecido obtido pela biópsia da próstata, permitindo a escolha da melhor estratégia terapêutica de acordo com idade do paciente e estágio da doença (SIEGEL et al., 2015; MORI et al., 2007; TANNOCK et al., 2004).

1.2. Tratamento Convencional

O tratamento é iniciado por meio de intervenções cirúrgicas que abrangem a prostatectomia radical, seguido de vigilância ativa a fim de monitorar os níveis de PSA e biópsias prostáticas. O tratamento convencional também envolve radioterapia e terapia envolvendo privação androgênica (PAUL; BREUL, 2000; INCA, 2018).

A terapia de privação androgênica (ADT, do inglês *androgen deprivation therapy*) é bastante utilizada principalmente em pacientes cujos tumores não são adequados para intervenção cirúrgica ou em associação a radioterapia. A ADT tem por objetivos reduzir os níveis de andrógenos (hormônios masculinos) ou impedir que eles entrem em células de câncer de próstata, as quais são descritas como dependentes de andrógenos para seu crescimento. Com a hormonioterapia, o tumor de próstata entra em período de remissão temporária, mas posteriormente o câncer pode se tornar resistente a ADT (LOCKE et al., 2008). O tratamento, além de não curar o câncer de próstata, provoca efeitos adversos como desenvolvimento de osteoporose, disfunção sexual, ginecomastia, anemia e alterações na composição corporal, dentre outros (ZHOU et al., 2015; ROLIM et al., 2014; CHOU et al., 2011).

O câncer de próstata pode também ser tratado com a quimioterapia, a qual pode melhorar os resultados globais dos pacientes que apresentam a doença em fase de metástase.

São encontrados na literatura estudos que demonstraram um controle notável do crescimento do câncer de próstata utilizando docetaxel (DTX) (LIU et al., 2012; WANG et al., 2017).

1.3. Docetaxel

O DTX, cuja estrutura química está representada na figura 1, pertence à classe dos anticancerígenos taxanos, obtido de forma semi – sintética através do composto natural 10-desacetilbacatina III, um componente não citotóxico obtido das folhas da planta *Taxus baccata*, pode ser encontrado na forma de pó cristalino a esbranquiçado e massa molecular 807, 89 g/mol.

As características físico-químicas do DTX confirmam seu caráter lipofílico, pois apresenta 10, 96 de pKa, log P 2,4 e solubilidade em água 0,0127 mg/mL. Neste contexto, a alta lipofilicidade e insolubilidade em água prejudica seu perfil farmacocinético, no entanto, em comparação com seu análogo paclitaxel (PTX), o DTX apresenta rápida absorção, menor toxicidade e solubilidade em água em consequência de pequenas diferenças na estrutura química em duas posições o grupo tert-butoxi C-13 em vez do grupo fenil benzamida. e o grupo hidroxila C-10 substituindo o grupo acetila (SILVA et al., 2018; PUBCHEM, 2019).

O mecanismo de ação do DTX envolve inibição da proliferação celular a partir do bloqueio mitótico sustentado durante a metáfase/anáfase do ciclo celular, o que promove a polimerização de microtúbulos estáveis e impede a divisão celular (PEREIRA et al., 2016).

O DTX foi aprovado em 2004 pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e pela Agência Europeia de Medicina para representar o tratamento de primeira linha para câncer de próstata avançado (LIU et al., 2012). Também é utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer, como de mama localmente avançado ou metastático, pulmão, gástrico, entre outros (ENGELS et al., 2007).

A formulação comercial do DTX apresenta o tensoativo não iônico Tween® 80 (polisorbato 80) e 13% de etanol. Berthold e colaboradores (2008) e Abdel-Rahman (2019) descreveram em seu estudo que o uso de docetaxel em pacientes com câncer de próstata com resistência hormonal não foi positivo, pois uma parcela significativa dos pacientes apresentou efeitos colaterais envolvendo neutropenia, toxicidade musculoesquelética e reações de hipersensibilidade (BERTHOLD et al., 2008; ABDEL-RAHMAN, 2019). Em consequência das reações adversas relacionadas ao tensoativo presente na formulação comercial do DTX seu clínico se tornou limitado. Neste sentido, o desenvolvimento de nanoformulações, como por exemplo nanopartículas poliméricas ou lipídicas, micelas, dendrímeros, nanoemulsões e

lipossomas para transportar o DTX de forma eficiente até as células tumorais tem sido bastante estimulado (LIU et al., 2012; ELOY et al., 2014; TAN et al., 2012; MANJAPPA et al., 2013).

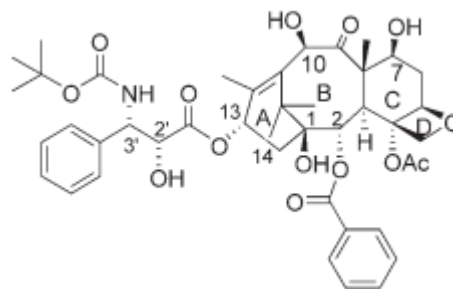


Figura 1: Estrutura química do DTX (GALLETI et al., 2007).

1.4. Nanotecnologia Farmacêutica

A incorporação do DTX em sistemas de liberação nanoestruturados de fármacos tem por objetivo principal melhorar suas aplicações clínicas. Isto porque esses sistemas melhoram a farmacocinética e biodisponibilidade, o que possibilita o acúmulo passivo no tumor pelo aumento do efeito de permeabilidade e retenção (EPR). Além disso, os nanossistemas podem ter a superfície modificada com ligantes que tem como alvo receptores de células cancerígenas, o que permite o direcionamento do fármaco ao alvo, com potencial melhora da eficácia terapêutica (ELOY et al., 2014).

A nanotecnologia é uma estratégia que possibilitou diversas mudanças no desenvolvimento de terapias, solucionando problemas como redução da toxicidade e aumento da eficácia de dosagens convencionalmente utilizadas, além disso podem proteger o princípio encapsulado de degradação (AHMAD et al., 2012).

Com o uso da nanotecnologia farmacêutica se tornou possível o desenvolvimento de sistemas de entrega que auxiliam na liberação de fármacos lipofílicos sem alterar a estrutura da molécula (NOBLE et al., 2014). Por sua vez, as diferentes estruturas em escala nanométrica atualmente desenvolvidas demonstraram ser superiores aos sistemas de administração convencionais, como por exemplo lipossomas, nanoemulsão, nanocápsulas, nanopartículas lipídicas sólidas, dentre outras (CHEN et al., 2011).

1.5. Lipossomas

Os lipossomas foram descobertos por Alec Bangham na década de 1960, o qual observou que fosfolipídeos em soluções aquosas podem formar estruturas fechadas em bicamadas lipídicas concêntricas simples ou múltiplas que encapsulam um compartimento aquoso. Após uma investigação envolvendo difusão de íons através de membranas lipídicas

artificiais que Bangham e colaboradores (1965) difundiram a respeito dos sistemas mais tarde caracterizados como lipossomas (BOZZUTO et al., 2015; BATISTA; CARVALHO; MAGALHAES, 2007; GIBIS et al., 2013; BANGHAM; WATKINS; STANDISH, 1965).

Os lipossomas são vesículas lipídicas que pode variar de alguns nanômetros a vários micrômetros e possuem a capacidade de veicular tanto agentes lipofílicos (membrana lipídica) quanto hidrofílicos (núcleo aquoso) (Figura 2) (TAN et al., 2012). Estes sistemas podem ser obtidos por diferentes técnicas e são classificados de acordo com seu tamanho, são formadas vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequenas (SUV) e vesículas unilamelares grandes (LUV), as quais podem apresentar tamanho de até 5 μm , de 20 a 100 nm e 100-250 nm, respectivamente (PANDEY; RANI; AGARWAL, 2016).

Neste contexto, os lipossomas são divididos nas seguintes categorias: convencional, polimórficos, de circulação prolongada e sítio-específicos (BATISTA; CARVALHO; MAGALHAES, 2007). Vários métodos estão descritos na literatura para obtenção dos mais diversos tipos de lipossomas, envolvendo processos mecânicos e químicos, os quais definem o tamanho de partícula (ÇAĞDAŞ et al., 2014).

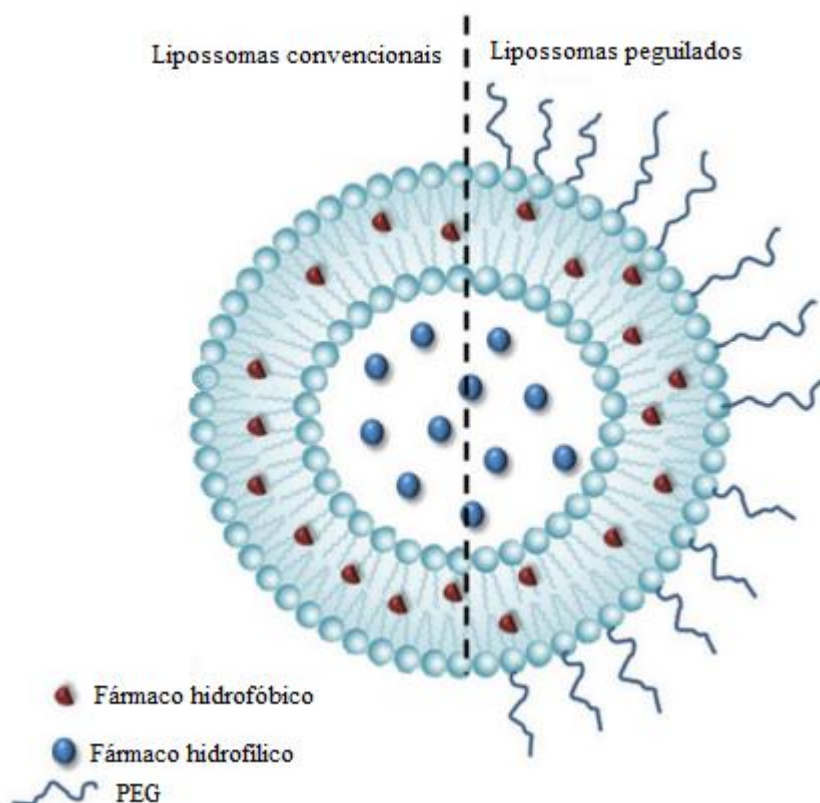


Figura 2. Estrutura do lipossoma convencional (esquerda) e peguillado (direita). Fonte: Adaptado de Ahmed et al., (2016).

1.5.1. Características físico – químicas e constituição

A composição predominante dos lipossomas são fosfolipídios e colesterol, e as características químicas que estes lipídeos apresentam determinarão o desempenho desses sistemas (GARG; RATH; GOYAL, 2015). A fosfatidilcolina é o fosfolipídio habitualmente utilizado na obtenção dos lipossomas, podendo ser natural (proveniente de ovos ou soja) e sintética. No entanto, Jin Li e colaboradores (2015) descrevem em seu trabalho que a fosfatidilcolina natural é menos estável em comparação com as sintéticas, resultado da presença de ácidos graxos poliinsaturados (JIN LI et al., 2015)

A fosfatidilcolina estruturalmente apresenta em sua composição um grupo fosfato polar e por cadeias de hidrocarbonetos (parte hidrofóbica), os quais formam a parte exterior e interior dos lipossomas, respectivamente. Alternativamente, um grupo funcional na porção polar da fosfatidilcolina, como por exemplo 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), pode ser adicionado para possibilitar a ligação de polímeros como o PEG (polietilenoglicol) (MARQUES-GALLEGO; KROON 2014; JING LI et al. 2015).

Neste contexto, os lipossomas peguizados apresentam maior estabilidade e tempo de circulação em relação aos lipossomas convencionais (CUI et al., 2015). A escolha do fosfolipídio adequado é realizada através da avaliação da sua temperatura de transição de fase (T_c), este importante parâmetro define qual temperatura necessária para que o lipídeo se converta em fase de gel em cristalina líquida desordenada. Diante disso, os fosfolipídios que possuem T_c mais altas conferem maior grau de estabilidade as bicamadas (ELOY et al., 2014).

A temperatura de transição de fase (T_c) dos fosfolipídios também é um critério importante para a escolha de fosfolipídios para a preparação de lipossomos (LAOUINI et al., 2012; BOZZUTO & MOLINARI, 2015; JING LI et al., 2015). O colesterol pode ser acrescentado na formulação lipossomal. Sua inserção confere menor fluidez e deformação da membrana, diante disso possibilita a redução do extravasamento do fármaco encapsulado e permeabilidade, resultando na elevação da T_c e o aumento da estabilidade (BATISTA; CARVALHO; MAGALHAES, 2007).

Portanto, esses sistemas apresentam múltiplas características favoráveis, como biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de elevada variabilidade de carga superficial e fluidez da membrana, o desenvolvimento de lipossomas encapsulando fármacos antitumorais tem atraído atenção das indústrias farmacêuticas, principalmente quando apresentam tamanho na faixa de 100 nm para aplicação em modelos sofisticados de sistemas de liberação de fármacos, pois reduzem o reconhecimento das opsoninas e aumentam o tempo de tempo de

circulação e liberação prolongada (PATIL et al., 2014; BATISTA; CARVALHO; MAGALHAES, 2007).

Neste sentido, existe disponível no mercado uma formulação lipossômica peguilada de doxorubicina (Doxil®), apresenta estabilidade comprovada superior a 18 meses em solução aquosa, aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e disponível comercialmente desde 1995, representa uma alternativa terapêutica para diversos tipos de cânceres em humanos (LI et al., 2015; CUI et al., 2015; BARENHOLZ, 2012; ÇAĞDAŞ et al., 2014).

De acordo com Pereira e colaboradores (2016) a utilização de lipossomas para veiculação do DTX pode ser uma estratégia viável para o tratamento do câncer de próstata, pois avaliaram seu efeito em esferoides da linhagem de câncer de próstata (PC-3) em comparação com a formulação comercial do DTX. O grupo desenvolveu lipossomas contendo o fosfatidilcolina, colesterol e PEG, observou-se que a taxa morte celular nas células tratadas com DTX encapsulado em lipossomas foi superior ao DTX livre (PEREIRA et al., 2016). Kobayashi et al. (2013) também desenvolveram lipossomas catiônicos carregados com docetaxel e induziram tumor de próstata em modelo animal, como resultado observaram que houve a supressão de proliferação celular e destruição óssea (KOBAYASHI et al., 2013).

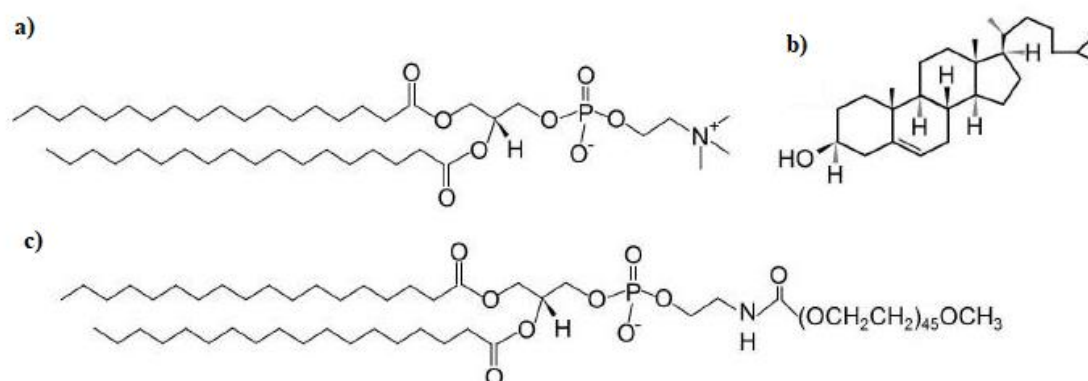


Figure 3. Estruturas químicas dos lipídeos que constituem os lipossomas. a) fosfatidilcolina, b) colesterol e c) 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-polietilenoglicol (DSPE -PEG). Fonte: Adaptado de Pandey et al., (2016).

1.6. Transferrina

Na literatura, os receptores de transferrina (TfR) são bem estudados na terapia do câncer, pois são superexpressos por células tumorais principalmente por sua função da homeostase de ferro e na proliferação celular. Segundo Shen e colaboradores (2018), as células tumorais de próstata apresentaram elevados níveis de expressão de TfR (SHEN et al., 2018).

As transferrinas são uma classe de proteínas compostas por uma única cadeia de polipeptídios em torno de 670 a 700 aminoácidos e peso molecular 80kDa (LI; QIAN, 2002).

Sua estrutura possui dois lobos denominados N e C (Figura 4), pois apresentam amino e carboxil terminal, respectivamente (CHENG et al., 2004; BAKER; LINDLEY, 1992; VICENT; LOVE (2012).

Esta proteína é responsável por transportar o ferro para o interior celular. O processo se inicia com a ligação do ferro (Fe^{3+}) em cada um dos lobos formando a holo-transferrina (holo-Tf), em seguida o processo de entrega a célula ocorre pelo receptor expresso na superfície celular por endocitose (BARNUM-HUCKINS; ADRIAN, 2000; TORTORELLA; KARAGIANNIS, 2014; DEGREGORIO-ROCASOLANO et al., 2017). Finalmente, o ferro é liberado dentro da célula e a conformação das proteínas se altera para apo-transferrina (apo-Tf), os subdomínios de cada lobo se fechando ou abrindo com uma forte torção até que a transferrina chegue na superfície celular e circule até encontrar uma nova molécula de ferro livre para que o processo reinicie (CHENG et al., 2005; ANDREWS, 2000).

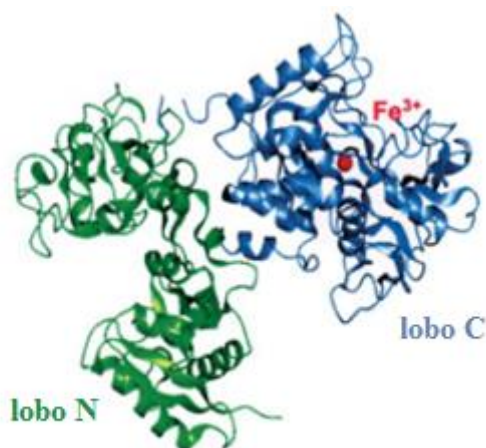


Figura 4. Estrutura da transferrina. O lobo C (azul) contém Fe^{3+} (HoloTf) e lobo N (verde) (apoTf). Fonte: Li & Qian, (2002).

Diante disso, estudos demonstram que existe potencial para utilização da transferrina tanto no diagnóstico como na terapia de doenças em virtude da sua capacidade de ligação a íons metálicos além do ferro e ainda assim ser reconhecido pelo receptor da transferrina (LI; QIAN, 2002; WALLY et al., 2007). Esta característica das células biologicamente mais agressivas apresentarem altos níveis de expressão de TfR tornou este receptor como alvo para os sistemas de administração de drogas na terapia antitumoral (ZHAI et al., 2010; YANG et al., 2015).

1.7. Processo de funcionalização de lipossomas com transferrina

Os lipossomas, além das diversas vantagens apresentadas, podem ser modificados com ligantes para entrega a locais específicos, como membranas celulares cancerígenas, receptores

citoplasmáticos ou nucleares. Uma abordagem atrativa para liberação dos fármacos celular e intracelular é a modificação superficial dos lipossomas (Figura 5 e 6) com ligantes específicos dos receptores regulados nas superfícies de células tumorais, tais como integrinas, receptores de fator de crescimento, transportadores de glicose, receptores de folato, receptores de transferrina, entre outros (SRIRAMAN et al., 2016). Portanto, uma das principais vantagens da funcionalização seria o aumento dos efeitos terapêuticos e diminuição dos efeitos colaterais (GUO et al., 2016; YANG et al., 2015; DANIELS et al., 2012).

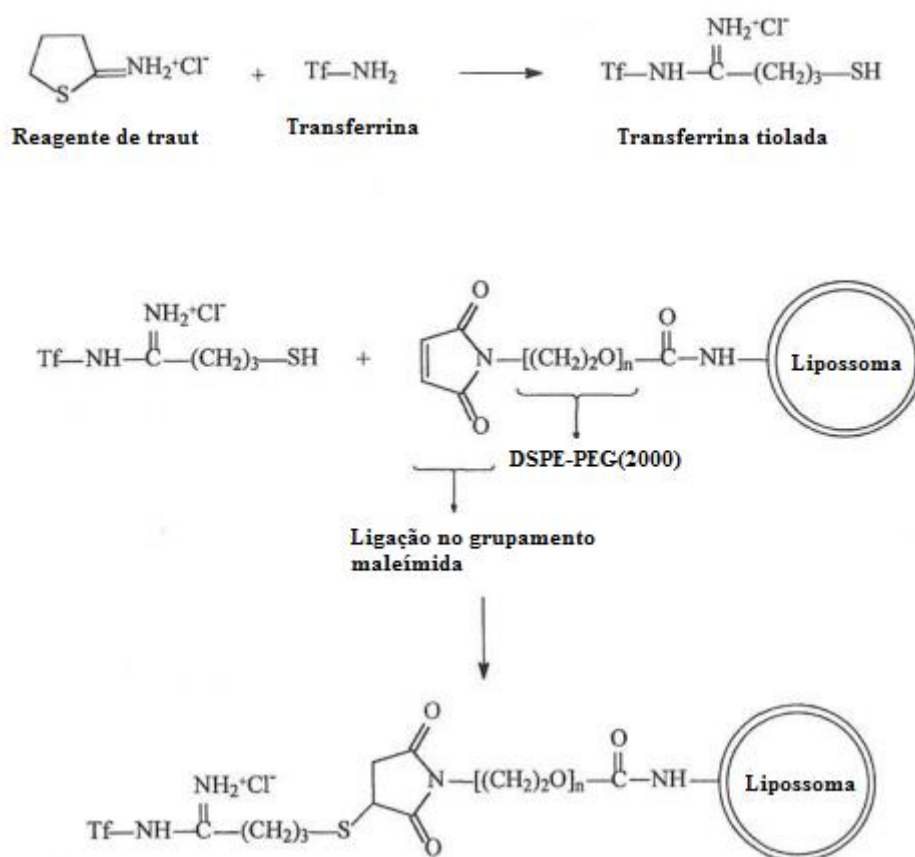


Figura 5: Esquema representando o processo de tiolação da transferrina, conjugação transferrina tiolada com lipossomas contendo DSPE-PEG (2000) – maleímida. Fonte: Derycke; Witte (2002).

Resultados positivos são encontrados em pesquisas envolvendo sistemas de liberação e transferrina para o tratamento de diversos tipos de câncer, ressaltando estudos clínicos em fase 2 em desenvolvimento com pacientes com adenocarcinoma gástrico e esofágico utilizando lipossomas funcionalizados com transferrina para veiculação dos fármacos *5-fluorouracil*, leucovorin e oxaliplatina (DANIELS et al., 2012; SHEN et al., 2018; YANG et al., 2015; SENZER et al., 2009).

Zhai e colaboradores (2010) demonstraram que a associação de lipossomas funcionalizados com transferrina e carregados com DTX para o tratamento do câncer epitelial foram satisfatórios, em destaque para a absorção celular em células TfR positivo. Além disso, o estudo farmacocinético indicou liberação prolongada do fármaco a partir da formulação em modelo animal (ZHAI et al., 2010).

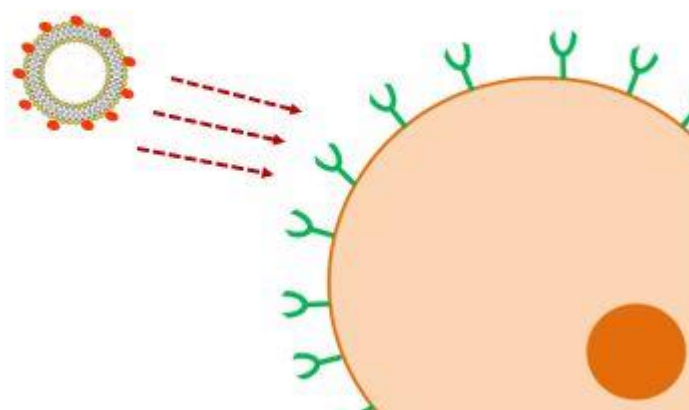


Figura 6: Processo de direcionamento ativo de lipossomas. Fonte: Adaptado de Eloy et al., 2014.

Existem relatos na literatura que a estratégia de funcionalização de lipossomas com transferrina aumenta a citotoxicidade do DTX em células de câncer cerebral (U-87 MG), que são células que superexpressam o receptor de transferrina (JHAVERI et al., 2018). Outro alvo potencial para o direcionamento da transferrina são as células tumorais hepáticas. De fato, Li e colaboradores (2009) demonstraram em seu trabalho que o uso de lipossomas funcionalizados com transferrina para a entrega de doxorubicina aumentou a captação celular e a citotoxicidade *in vitro* usando uma linhagem celular de carcinoma hepático humano (HepG2) (LI et al., 2009).

No presente trabalho, um dos principais objetivos foi confirmar a hipótese de que a funcionalização de lipossomas com transferrina e carregados com DTX poderia resultar em uma captação celular mais seletiva e uma citotoxicidade aumentada na linhagem de células do câncer de próstata que superexpressa o TfR (PC3). Embora os lipossomas carregados com DTX tenham sido testados em esferoides de PC3 e induzam citotoxicidade mais alta do que os grupos tratados com DTX livre (PEREIRA et al., 2016), ao nosso conhecimento, esta é a primeira vez

que lipossomas funcionalizados com transferrina e carregados com DTX são investigados para câncer de próstata. Para mostrar o efeito da formulação nas células normais (baixa expressão de TfR) foi utilizada a linhagem celular epitelial de próstata não maligna (PNT2).

6. Conclusões

Lipossomas carregados com docetaxel funcionalizados com transferrina foram obtidos com sucesso através da técnica clássica da hidratação filme lipídico. A eficiência de encapsulação do DTX foi de aproximadamente 69 e 37% para os lipossomas com e sem funcionalização, respectivamente, e a eficiência de funcionalização utilizando a transferrina foi de 31%.

Os resultados demonstraram que os sistemas obtidos apresentaram tamanho nanométrico. As análises de diâmetro médio de partícula, índice de polidispersividade, potencial zeta e NTA demonstraram que a presença de docetaxel contribuiu para a redução do tamanho da vesícula e estabilidade do sistema. Foi possível comprovar a morfologia esférica da vesícula, corroborando com o tamanho obtido pela técnica de dispersão de luz dinâmica por meio da microscopia eletrônica de transmissão.

O método de validação proposto para o DTX demonstrou ser linear, preciso, exato, robusto e adequado. Através deste método foi possível determinar o perfil de liberação *in vitro* do DTX.

Além disso, a técnica de funcionalização utilizada foi adequada e através dos ensaios de SDS-PAGE, dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência comprovou-se a integridade e estabilidade da transferrina após o processo de conjugação com os lipossomas.

Adicionalmente, os estudos em cultura celular demonstraram os lipossomas funcionalizados são menos tóxicos à célula normal do que os lipossomas não funcionalizados no tempo de 48 horas. Além disso, foi possível visualizar o *uptake* através das técnicas de microscopia confocal e citometria de fluxo. Pode-se comprovar a interação desses sistemas com os receptores superexpressos na superfície da célula tumoral através da QCM-D.

Diante disso, conclui-se que os sistemas aqui desenvolvidos apresentaram características promissoras para entrega do docetaxel, porém estudos adicionais em modelo celular tridimensional e *in vivo* são necessários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAHMAN, O. Efficacy and toxicity outcomes of elderly castrate-resistant prostate cancer patients treated with docetaxel—A pooled analysis of 3 randomized studies. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, 2019. doi: 10.1016/j.urolonc.2019.09.004.
- ABOUELMAGD, S.A.; SUN, B.S.; CHANG, A.C.; KU, Y.J.; YEO, Y. Release Kinetics Study of Poorly Water-Soluble Drugs from Nanoparticles: Are We Doing It Right? **Mol Pharm.** v. 12(3), p. 997–1003, 2015. doi:10.1021/mp500817h.
- AHMAD, M. U.; ALI, S. M.; AHMAD, I. Applications of nanotechnology in pharmaceutical development. **Lipids in Nanotechnology**, p.171–190, 2012. doi:10.1016/b978-0-9818936-7-9.50010-x
- AHMED, S. E.; MOUSSA, H. G.; MARTINS, A. M.; AL-SAYAH, M. H.; HUSSEINI, G. A. Effect of pH, ultrasound frequency and power density on the release of calcein from stealth liposomes. **European Journal of Nanomedicine**, v.8, p. 1, 2016. doi:10.1515/ejnm-2015-0046
- ANDREWS, N. C. Iron homeostasis: Insights from genetics and animal models. **Nature Reviews Genetics**, v. 1, n.3, p., 208–217, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1038/35042073>
- BAKER, E. N., & LINDLEY, P. F. New perspectives on the structure and function of transferrins. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 47(1), 147–160, 1992 [https://doi.org/10.1016/0162-0134\(92\)84061-Q](https://doi.org/10.1016/0162-0134(92)84061-Q)
- BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, p.238-52, 1965.
- BARENHOLZ, Y. Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. **Journal of Controlled Release**. v. 160, p. 117-134, 2012.
- BARNUM-HUCKINS, K.; ADRIAN, G. S. Iron regulation of transferrin synthesis in the human hepatoma cell line HepG2. **Cell Biology International**, v. 24, n. 2, p. 71–77, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1006/cbir.1999.0456>
- BATISTA, C.M.; CARVALHO, C.M.B.; MAGALHAES, N.S.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, p. 167-179, 2007.
- BERTHOLD, D. R.; POND, G. R.; SOBAN, F.; WIT, R.; EISENBERGER, M.; TANNOCK, I. F. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer: updated survival in the TAX 327 study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, p. 242–45, 2008.
- BITOUNIS, D.; FANCIULLINO, R.; ILIADIS, A.; CICCOLINI, J. Optimizing Druggability through Liposomal Formulations: New Approaches to an Old Concept. **ISRN Pharm.** v. 2012, Article ID: 738432, 11 p. <https://doi.org/10.5402/2012/738432>.
- BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**. v.10, p. 975-999, 2015.

BOYD, R. D.; PICHAIMUTHU, S. K.; CUENAT, A. New approach to inter-technique comparisons for nanoparticle size measurements; using atomic force microscopy, nanoparticle tracking analysis and dynamic light scattering. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.387, n. 1-3, p.35–42, 2011. doi:10.1016/j.colsurfa.2011.07.020.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017. **Guia para validação de métodos analíticos**. Diário Oficial da União, 2017.

CADINOIU, A.N.; RATA, D. M.; ATANASE, L. I.; DARABA, O. M.; GHERGHEL, D.; VOCHITA, G.; POPA, M. Aptamer-Functionalized Liposomes as a Potential Treatment for Basal Cell Carcinoma. **Polymers**, v. 11, p. 1515. doi:10.3390/polym11091515, 2019.

ÇAĞDAŞ, M.; SEZER, A. D.; BUCAK, S. Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery. In: SEZER, A. D. (Ed). **Application of Nanotechnology in Drug Delivery**. London: IntechOpen, 2014. *E-Book*. Charpt 1. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/58459>.

CARRIÓN-SALIP, D.; PANOSA, C.; MENENDEZ, J. A.; PUIG, T.; OLIVERAS, G.; PANDIELLA, A. et al. Androgen-independent prostate cancer cells circumvent EGFR inhibition by overexpression of alternative HER receptors and ligands. **International Journal of Oncology**, v.41, n. 3, p.1128–1138, 2012. doi:10.3892/ijo.2012.1509

CHEN, C.-W.; LU, D.-W.; YEH, M.-K.; SHIAU, C.-Y.; CHIANG, C.-H. Novel RGD-lipid conjugate-modified liposomes for enhancing siRNA delivery in human retinal pigment epithelial cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 2567-2580, 2011. doi:10.2147/ijn.s24447 .

CHENG, Y.; ZAK, O.; AISEN, P.; HARRISON, S. C.; WALZ, T. Single particle reconstruction of the human apo-transferrin-transferrin receptor complex. **Journal of Structural Biology**, v. 152, n. 3, p. 204–210, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.10.006>

CHENG, Y.; ZAK, O.; AISEN, P.; HARRISON, S. C.; WALZ, T. Structure of the Human Transferrin Receptor-Transferrin Complex. **Cell**, v. 116, n.4, p. 565–576, 2004. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00130-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00130-8).

CHIU, R.Y.T.; TSUJI, T.; WANG, S.J.; WANG, J.T.; LIU, C.T.; KAMEI, D.T. Improving the systemic drug delivery efficacy of nanoparticles using a transferrin variant for targeting. **Journal of Controlled Release**. v. 180, p.33-41, 2014.

CHOU, R.; DANA, T.; BOUGATSOS, C.; FU, R.; BLAZINA, I.; GLEITSMANN, K.; RUGGE, J.B. Treatments for Localized Prostate Cancer: Systematic Review to Update the 2002 U.S. Preventive Services Task Force Recommendation. **Agency for Healthcare Research and Quality (US)**, n.91, 2011.

CUI, M.; WUA, W.; HOYGAARDB, L.; LUA, Y.; CHENC, D.; QI, J. Liposomes containing cholesterol analogues of botanical origin as drug delivery systems to enhance the oral absorption of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 489, p. 277–284, 2015.

DANIELS, T.R.; BERNABEU, E.; RODRIGUEZ, J.A.; PATEL, S.; KOZMAN, M.; CHIAPPET, D.A.; HOLLER, E.; LJUBIMOVA, J.Y.; HELGUERA, G.; PENICHET, M.L.

Transferrin receptors and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**. v. 1820, p. 291-317, 2012.

DEGREGORIO-ROCASOLANO, N.; MARTÍ-SISTAC, O.; PONCE, J.; CASTELLÓ-RUIZ, M.; MILLÁN, M.; GUIRAO, V.; GASULL, T. Iron-loaded transferrin (Tf) is detrimental whereas iron-free Tf confers protection against brain ischemia by modifying blood Tf saturation and subsequent neuronal damage. **Redox Biology**, p. 143–158, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.11.026>.

DERYCKE, A.S.; WITTE, P.A.M. Transferrin-mediated targeting of hypericin embedded in sterically stabilized PEG-liposomes. **International Journal of Oncology**. v. 20, p. 181-187, 2002.

DERYCKE, A.S.L.; KAMUHABWA, A.; GIJSENS, A.; ROSKAMS, T.; DE VOS, D.; KASRAN, A.; HUWYLER, J.; MISSIAEN, L.; WITTE, P.A.M. Transferrin-Conjugated Liposome Targeting of Photosensitizer ALPcS to Rat Bladder Carcinoma Cells. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 96, n. 21, p. 1620–1630, November 3, 2004.

DRUMMOND, D.C.; NOBLE, C.O.; HAYES, M.E.; PARK, J.W.; KIRPOTIN, D.B. Pharmacokinetics and In Vivo Drug Release Rates in Liposomal Nanocarrier Development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 11, p. 4696-4740, November, 2008.

DUCA, G.; ANGHEL, L.; ERHAN, R.V. Structural aspects of lactoferrin and serum transferrin observed by FTIR spectroscopy. **Chemistry Journal of Moldova. General, Industrial and Ecological Chemistry**. v. 13, n.1, p. 111-116, 2018.

ELOY, J. O., CLARO, S. M.; PETRILLI, R.; BARCELLOS, J. P. A.; LEE, R. J.; MARCHETTI, J. M. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123, p. 345–363, 2014.

ELOY, J. O.; PETRILLI, R.; BRUEGGEMEIER, R.W.; MARCHETTI, J. M.; LEE, R. J. Rapamycin-loaded immunoliposomes functionalized with trastuzumab: a strategy to enhance cytotoxicity to HER2-positive breast cancer cells. **Anticancer Agents in Medical Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 48-56, 2016.

ELOY, J.O.; PETRILLI, R.; CHESCA, D.L.; SAGGIORO, F.P.; LEE, R.J.; MARCHETTI, J.M. Anti-HER2 immunoliposomes for co-delivery of paclitaxel and rapamycin for breast cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.115, p.159-167, 2017.

ENGELS, F.K.; MATHOTB, R.A.A.; VERWEIJ, J.; Alternative drug formulations of docetaxel: a review. **Lippincott Williams & Wilkins**. v.18, p.95-103,2007.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 7th. ed. **Docetaxel trihydrate**. Strasbourg: Council of Europe: European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, 2011. p. 1881-1883.

FELIPE, V.; HAWE, A.; JISKOOT, W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n.5, p. 796–810, 2010. DOI: 10.1007/s11095-010-0073-2.

GALLETI, E.; MAGNANI, M.; RENZULLI, M.L.; BOTTA, M. Paclitaxel and docetaxel resistance: molecular mechanisms and development of new generation taxanes. **ChemMedChem**. v. 2, p. 920 – 942, 2007.

GANDHI, R.; KHATRI, N.; BARADIA, D.; VHORA, I.; MISRA, A. Surface-modified Epirubicin-HCl liposomes and its invitro assessment in breast cancer cell-line: MCF-7. **Drug Delivery**, v. 23:4, p. 1152-1162, 2016. DOI: 10.3109/10717544.2014.999960.

GARG, T.; RATH, G.; GOYAL, A. K.; Colloidal Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 32, n. 2, p. 89–147, 2015.

GASPAR, M. M.; RADOMSKA, A.; GOBBO, O. L.; BAKOWSKY, U.; RADOMSKI, M. W.; & EHRHARDT, C. Targeted Delivery of Transferrin-Conjugated Liposomes to an Orthotopic Model of Lung Cancer in Nude Rats. **Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery**, v. 25, n. 6, p. 310–318, 2012. doi:10.1089/jamp.2011.0928.

GIBIS, M.; RAHN, N.; WEIS, J. Physical and Oxidative Stability of Uncoated and Chitosan-Coated Liposomes Containing Grape Seed Extract. **Pharmaceutics**. v.5, p.421-433, 2013.

GOMME, P. T.; MCCANN, K. B. Transferrin: Structure, function and potential therapeutic actions. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 4, p. 267–273, 2005. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03333-1](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03333-1).

GUO, J.; O'DRISCOLL, C.M.; HOLMES, J.D.; RAHME, K. Bioconjugated gold nanoparticles enhance cellular uptake: A proof of concept study for siRNA delivery in prostate cancer cells. **International Journal of Pharmaceutics**. v.509, p. 16–27, 2016.

HANSON, R.; HEANEY, J. A Primer on Automating the Vertical Diffusion Cell (VDC). Hanson Research Corp., Chatsworth, CA, USA, 2013. Disponível em: <http://www.dissolutiontech.com/DTresour/201305Articles/DT201305_A05.pdf>. Acesso em janeiro de 2019.

HATAKEYAMA, H.; AKITA, H.; MARUYAMA, K.; SUHARA, T.; HARASHIMA, H. Factors governing the in vivo tissue uptake of transferrin-coupled polyethylene glycol liposomes in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**. v.281, p. 25–33, 2004.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 255-264, 2013.

HOSNY, K.M. Optimization of gatifloxacin liposomal hydrogel for enhanced transcorneal permeation. **Journal of liposome research**, v. 20, n. 1, p. 31 -37, 2010.

ICH. International Conference on Harmonization. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)**. Geneva, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA), Brasil. Ministério da Saúde. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2018.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC), France. World Health Organization (WHO). GLOBOCAN 2018: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2018. Lyon: IARC, 2018.

JHAVERI, A.; DESHPANDE, P.; PATTNI, B.; & TORCHILIN, V. Transferrin-targeted, resveratrol-loaded liposomes for the treatment of glioblastoma. **Journal of Controlled Release**, v.277, p.89–101, 2018. doi:10.1016/j.jconrel.2018.03.006

JING, L.; XULING, WANG, T. Z.; CHUNLING, W.; ZHENJUN, H.; XIANG, L. et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 10, p. 81-98, 2015.

JOHNSON, I. R. D.; PARKINSON-LAWRENCE, E. J.; SHANDALA, T.; WEIGERT, R.; BUTLER, L. M.; BROOKS, D. A.. Altered Endosome Biogenesis in Prostate Cancer Has Biomarker Potential. **Molecular Cancer Research**. v. 12, n. 12, p. 1851-1862, 2014. DOI:10.1158/1541-7786.mcr-14-0074.

JUNG, C. Insight into protein structure and protein–ligand recognition by Fourier transform infrared spectroscopy. **Journal of Molecular Recognition**.v.13, p. 325–351, 2000.

KEER, H. N.; KOZLOWSKI, J. M.; TSAI, Y. C.; LEE, C.; MCEWAN, R. N.; GRAYHACK, J. T. Elevated transferrin receptor content in human prostate cancer cell lines assessed in vitro and in vivo. **Journal of Urology**, v. 143, n. 2, p. 381–385, 1990. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)39970-6](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)39970-6).

KEER, H.N.; KOZLOWSKI, J.M.; TSAI, Y.C.; LEE, C.;MCEWAN, R.N.; GRAYHACK, J.T. Elevated Transferrin Receptor Content in Human Prostate Cancer Cell Lines Assessed in Vitro and in Vivo. **The Journal of Urology**. v.144, p. 381-385, 1990.

KOBAYASHI, D.; KAWAI, N.; SATO, S.; NAIKI, T.; YAMADA, K.; YASUI, T. et al. Thermo-therapy using magnetic cationic liposomes powerfully suppresses prostate cancer bone metastasis in a novel rat model. **The Prostate**, v. 73, n. 9, p. 913–922, 2013. doi:10.1002/pros.22637

KOOPAEI, M.N.; DINARVAND, R.; AMINI, M.; RABBANI, H.; EMANI, S.; OSTAD, S.N.; ATYABI, F. Docetaxel immunonanocarriers as targeted delivery systems for her2-positive tumor cells: preparation, characterization, and cytotoxicity studies. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 1903–1912, 2011.

KOWALCZYK, A.; BRYNDA-MATYSIAK, E.; BYSTRZEJEWSKI, M.; SUTHERLAND, D.S.; STOJEK, Z.; NOWICKA, A.M. Conformational control of human transferrin covalently anchored to carbon-coated iron nanoparticles in presence of a magnetic field. **Acta Biomaterialia**, v. 45, p. 367-374, 2016.

KRIZHANOVSKY, V.; XUE, W.; ZENDER, L.; YON, M.; HERNANDO, E.; LOWE, S.W. Implications of cellular senescence in tissue damage response, tumor suppression, and stem cell biology. **Methods in Molecular Medicine**, v. 81, p. 21-39, 2008.

LAKOWICS, J.R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3rd. ed. Baltimore, MD: Springer-Verlag, 2006. Cap. 16, p. 529-575.

LAOUINI, A.; JAAFAR-MAALEJ, C.; LIMAYEM-BLOUZA, I.; SFAR, S.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. **Journal of Colloid Science and Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 147–168, 2012. doi:10.1166/jcsb.2012.1020

LAPENDA, T.L.; MORAIS, W.A.; ALMEIDA, F.J.; FERRAZ, M.S.; LIRA, M.C.; SANTOS, N.P.; MACIEL, M.A.; SANTOS-MAGALHAES, N.S. Encapsulation of Trans-Dehydrocrotonin in Liposomes: An Enhancement of the Antitumor Activity. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, n. 3, p. 499-510, 2013.

LI, H.; QIAN, Z. M. Transferrin/transferrin receptor-mediated drug delivery. **Medicinal Research Reviews**, v.22, n. 3, p.225–250, 2002. <https://doi.org/10.1002/med.10008>.

LI, J.; WANG, X.; ZHANG, T.; WANG, C.; HUANG, Z.; LUO, X.; DENG, Y. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 10, p. 81-98, 2015.

LI, X.; DING, L.; XU, Y.; WANG, Y.; PING, Q. Targeted delivery of doxorubicin using stealth liposomes modified with transferrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 373, p. 116–123, 2009.

LIANG, Z.; YANG, N.; JIANG, Y.; HOU, C.; ZHENG, J.; SHI, J.; ZHANG, R.; LI, D.; LIU, Y.; ZUO, P. Targeting docetaxel-PLA nanoparticles simultaneously inhibit tumor growth and liver metastases of small cell lung cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 494, p. 337-345, 2015.

LIM, S. M.; PANG, Z. W.; TAN, H. Y.; SHAIKH, M.; ADINARAYANA, G.; & GARG, S. Enhancement of docetaxel solubility using binary and ternary solid dispersion systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 41, n. 11, p. 1847-1855, 2015. doi:10.3109/03639045.2015.1014818.

LIU, J.; KOPECKOVA, P.; PAN, H.; SIMA, M.; BUHLER, P.; WOLF, P.; ELSA BEILE, U.; KOPECEK, J. Prostate-Cancer-Targeted N-(2 Hydroxypropyl) methacrylamide Copolymer/Docetaxel Conjugates. **Macromolecular Bioscience**. v. 12, p. 412-422, 2012.

LIU, S.; LI, Y.; WANG, X.; MA, J.; ZHANG, L.; XI, G. Preparation, Characterization, and Antitumor Activities of Miriplatin-Loaded Liposomes. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 1, p. 78-87, 2015.

LIU, W.; YIN, B.; WANG, X.; YU, P.; DUAN, X.; LIU, C.; WANG, B.; TAO, Z. Circulating tumor cells in prostate cancer: Precision diagnosis and therapy (Review). **Oncology Letters**. v. 14, p. 1223-1232, 2017.

LOCKE, J.A.; GUNS, E.S.; LUBIK, A.A.; ADOMAT, H.H.; HENDY, S.C.; WOOD, C.A.; ETTINGER, S.L.; GLEAVE, M.E.; NELSON, C.C. Androgen levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer. **Cancer Res**. v.68, p. 6407-6415, 2008.

LOKERSE, W.J.; KNEEPKENS, E.C.M.; HAGEN, T.K.T.; EGGERMONT, A.M.M.; GRULL, H.; KONING, G.A. In depth study on thermosensitive liposomes: Optimizing

formulations for tumor specific therapy and in vitro to in vivo relations. **Biomaterials**, v. 82, p. 138-150, 2016.

MAITLAND N.J. Stem Cells in the Normal and Malignant Prostate. In: TINDALL D. J. (eds) **Prostate Cancer**. Biochemistry, Molecular Biology and Genetics: Protein Reviews, New York, NY: Springer, 2013. v. 16, p. 3-41.

MAKKY, A.; DAGHILDJIAN, K.; MICHEL, J.P.; MAILLARD, P.; ROSILIO, V. Assessment of the relevance of supported planar bilayers for modeling specific interactions between glycodendrimeric porphyrins and retinoblastoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1818, p. 2831-2838, 2012.

MANJAPPA, A.S.; GOEL, P.N.; VEKATARAJU, M.P.; RAJESH, K.S.; MAKWANA, K.; UKAWALA, M.; NIKAM, Y.; GUDE, R.P.; MURTHY, R.S.R. Is an Alternative Drug Delivery System Needed for Docetaxel? The Role of Controlling Epimerization in Formulations and Beyond. **Pharmaceutical Research**. v.10, p:2675-93, 2013.

MARANGONI, V.S. **Estudo e desenvolvimento de nanocompósitos contendo nanopartículas de ouro conjugadas com biomoléculas: síntese e aplicações em nanomedicina**. Dissertação (Mestrado) Instituto de Física – Universidade de São Paulo, 2012.

MARQUES-GALLEGO, P.; DE KROON, A. I. P.M. Ligation strategies for targeting liposomal nanocarriers. **Biomedical Research International**. v. 2014, Article ID 129458, 12 p. doi: 10.1155/2014/129458.

MIRCIOIU, C.; VOICU, V.; ANUTA, V.; TUDOSE, A.; CELIA, C.; PAOLINO, D.; FRESTA, M.; SANDULOVICI, R.; MIRCIOIU, I. Mathematical Modeling of Release Kinetics from Supramolecular Drug Delivery Systems. **Pharmaceutics**, v.11, p. 140, 2019. doi:10.3390/pharmaceutics11030140.

MORAES, C.M.; PAULA, E.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Physicochemical stability of poly(lactide-co-glycolide) nanocapsules containing the local anesthetic bupivacaine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 995–1000, 2010.

MORI, K.; GOFF, B.L.; CHARRIER, C.; BATTAGLIA, S.; HEYMANN, D.; REDINI, F. DU145 human prostate cancer cells express functional receptor activator of NFκB: New insights in the prostate cancer bone metastasis process. **Bone**. v.40, p. 981–990,2007.

MORTENSEN, J. H.; JEPPESEN, M.; PILGAARD, L.; AGGER, R.; DUROUX, M.; ZACHAR, V.; MOOS, T. Targeted antiepidermal growth factor receptor (cetuximab) immunoliposomes enhance cellular uptake in vitro and exhibit increased accumulation in an intracranial model of glioblastoma multiforme. **Journal Drug Delivery**. v. 2013, Article ID 209205, 13 p. DOI: [http://dx. doi.org/10.1155/2013/209205](http://dx.doi.org/10.1155/2013/209205).

MURAKAMI, L.M.Z.; RULLER, R. **Uso da técnica de Dicroísmo Circular para avaliação de proteínas com aplicações biotecnológicas**. Campinas, SP: CNPEM, 2016. (Memorando Técnico).

PANDEY, H.; RANI, R.; AGARWAL, V. Liposome and Their Applications in Cancer Therapy. **Brazilian Archives Biology Technology**, v. 59, e16150477, January-December, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2016150477>

PANWAR, P.; PANDEY, LAKHERA, P.C.; SINGH, K.P. Preparation, characterization, and in vitro release study of albendazole-encapsulated nanosized liposomes. **International Journal of Nanomedicine**. v.5, p. 101–108, 2010.

PAPADOPOULOU, V.; KOSMIDIS, K.; VLACHOU, M.; MACHERAS, P. On the use of the Weibul function for the discernment of drug release mechanisms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, p.44–50, 2006, doi:10.1016/j.ijpharm.2005.10.044.

PATIL, Y.P.; JADHAV, S. Novel methods for liposome preparation. **Chemistry and Physics of Lipids**. v. 177, p. 8– 18, 2014.

PAUL, R.; BREUL, J. Antiandrogen withdrawal syndrome associated with prostate cancer therapies: Incidence and clinical significance. **Drug Safety**. v. 23, p. 381–390, 2000.

PEREIRA, S.; EGBU, R.; JANNATI, G.; AL-JAMAL, W.T. Docetaxel-loaded liposomes: The effect of lipid composition and purification on drug encapsulation and in vitro toxicity. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 514, p. 150-159, 2016.

PETRILLI, R.; ELOY, J. O.; SAGGIORO, F. P.; CHESCA, D. L.; DE SOUZA, M. C.; DIAS, M. V. S. et al. Skin cancer treatment effectiveness is improved by iontophoresis of EGFR-targeted liposomes containing 5-FU compared with subcutaneous injection. **Journal of Controlled Release**, v. 283, p. 151–162, 2018. doi:10.1016/j.jconrel.2018.05.038.

PUBCHEM. Docetaxel. National Center for Biotechnology Information. CID=148124, Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Docetaxel>>. Acesso em 21 de outubro de 2019.

QIN, L.; WANG, C.Z.; FAN, H.J.; ZHANG, C.J.; ZHANG, H.W.; LV, M.H.; CUI, S. A dual-targeting liposome conjugated with transferrin and arginine-glycine-aspartic acid peptide for glioma-targeting therapy. **Oncology Letters**. v. 8, p. 2000-2006, 2014.

RAMÍREZ-BALDERRAMA, L.; LÓPEZ-BRIONES, S.; DAZA-BENÍTEZ, L.; MACÍAS, M. H.; LÓPEZ-GAYTÁN, T.; PÉREZ-VÁZQUEZ, V. Diferenciación neuroendocrina en adenocarcinoma de próstata. **Gaceta Médica de México**. v.149, p. 639-45, 2013.

RIBEIRO, L. N. DE M.; COUTO, V. M.; FRACETO, L. F.; & DE PAULA, E. Use of nanoparticle concentration as a tool to understand the structural properties of colloids. **Scientific Reports**, v. 8, Article 982, 2018. doi:10.1038/s41598-017-18573-7.

ROLIM, N.; LOPES, F.; RODRIGUES, T.; SANTOS, J.C.; MOTA, R.; COVITA, A.; SOARES, M.J.; MONTEIRO, P.; CANHOTO, A.; NOGUEIRA, R.; MONTEIRO, H.; Complicações da terapêutica de privação androgênica no cancro da próstata / uma revisão. **Acta Urológica Portuguesa**. v.31, p.82-87, 2014.

RUSSEL, P.J.; KINGSLEY, E.A. Human Prostate Cancer Cell Lines. **Methods in Molecular Medicine**, v. 81, p. 21-39, 2003.

SALAMANCA, C.H.; BARRERA-OCAMPO, A.; LASSO, J.C.; CAMACHO, N.; YARCE, C.J. Franz Diffusion Cell Approach for Pre-Formulation Characterization of Ketoprofen Semi-Solid Dosage Forms. **Pharmaceutics**. v.10, n. 3, ID 148, 10 p. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030148>.

SANTOS-MARTINEZ, M.J.; INKIELEWICZ –STEPNIAK, I.; MEDINA, C.; RAHME, K.; D'ARCY, D.M.; FOX, D.; HOLMES, J.D; ZHANG, M. W.R. The use of quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) for studying nanoparticle-induced platelet aggregation. **International Journal of Nanomedicine**. v. 7, p. 243–255, 2012.

SENZER, N. N.; MATSUNO, K.; YAMAGATA, N.; FUJISAWA, T.; WASSERMAN, E.; SUTHERLAND, W.; SHARMA, S.; PHAN, A. MBP-426, a novel liposome-encapsulated oxaliplatin, in combination with 5-FU/leucovorin (LV) – Phase I results of a Phase I/II study in gastro-esophageal adenocarcinoma, with pharmacokinetics. **Molecular Cancer Therapeutics** v. 8, n. 12, Suppl.1, C36, 2009.

SHEN, Y.; LI, X.; DONG, D.; ZHANG, B.; XUE, Y.; SHANG, P. Transferrin receptor 1 in cancer: a new sight for cancer therapy. **American Journal Cancer Research**, v. 8, n. 6, p. 916-931, 2018.

SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A.J. Cancer Statistics, 2015. **Cancer Journal Clinicians**, v.65, p. 5 – 29, 2015.

SILVA, G. H.; FERNANDES, M. A.; TREVIZAN, L. N. F. ; LIMA, F. T. ; ELOY, J. O. ; CHORILLI, M. . A Critical Review of Properties and Analytical Methods for the Determination of Docetaxel in Biological and Pharmaceutical Matrices. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**. v. 48, p. 517-527, 2018. DOI: 10.1080/10408347.2018.1456315.

ŚLIWIŃSKA-HILL, U. Interaction of imatinib mesylate with human serum transferrin: The comparative spectroscopic studies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v. 173, p. 468 –475, 2017.

SRIRAMAN, S.K.; SALZANO, G.; SARISOZEN, C.; TORCHILIN, V. Anti-Cancer Activity of Doxorubicin-Loaded Liposomes CoModified with Transferrin and Folic Acid. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.105, p. 40-49, 2016.

SONI, V.; KOHLI, D. V.; JAIN, S. K. Transferrin-conjugated liposomal system for improved delivery of 5-fluorouracil to brain. **Journal of Drug Targeting**, v. 16, n. 1, p. 73–78, 2008.

TAN, Q.; LIU, X.; FU, X.; LI, Q.; DOU, J.; ZHAI, G. Current development in nanoformulations of docetaxel. **Expert Opinion Drug Delivery**, v. 9, p. 975-990, 2012.

TANNOCK, I. F.; WIT, R.; BERRY, W. R.; HORTI, J.; PLUZANSKA, A.; CHI, K. N.; OUDARD, S.; THÉODORE, C.; JAMES, N. D.; TURESSON, I.; ROSENTHAL, M. A.; EISENBERGER, M. A. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. **The New England Journal of Medicine**. v. 351, p. 1502–1512, 2004.

TAYMOURI, S.; VARSHOSAZ, J.; JAVANMARD, S.H.; HASSANZADEH, F. Development of a Rapid and Precise Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography Method for Analysis of Docetaxel in Rat Plasma: Application in Single-dose Pharmacokinetic Studies of Folate-targeted Micelles Containing Docetaxel. **Advanced Biomedical Research**, v. 7, p. 1-5, 2018. DOI: https://dx.doi.org/10.4103%2Fabr.abr_251_16.

THEVIS, M.; LOO, R.R.O.; LOO, J.A. Mass Spectrometric Characterization of Transferrins and Their Fragments Derived by Reduction of Disulfide Bonds. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**. v. 14, p.635–647, 2003.

TORTORELLA, S.; KARAGIANNIS, T. C. Transferrin receptor-mediated endocytosis: A useful target for cancer therapy. **Journal of Membrane Biology**, v.247, n. 4, p.291–307, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00232-014-9637-0>.

ULBRICH, K.; HEKMATARA, T.; HERBERT, E.; KREUTER, J. Transferrin- and transferrin-receptor-antibody-modified nanoparticles enable drug delivery across the blood–brain barrier (BBB). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 251–256, 2009.

VARSHOSAZ, J.; DAVOUDI, M.A.; RASOUL-AMINI, R. Docetaxel loaded nanostructured lipid carriers functionalized with Trastuzumab (Herceptin) for HER2-positive breast cancer cells. **Journal of Liposome Research**, v.28, n. 4, p. 285-295, 2018. DOI: 10.1080/08982104.2017.1370471.

VINCENT, J. B.; LOVE, S. The binding and transport of alternative metals by transferrin. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1820, n. 3, p. 362–378, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.07.003>.

WALLACE, S.J.; LI, J.; NATION, R.L.; BOYD, B.J. Drug release from nanomedicines: Selection of appropriate encapsulation and release methodology. **Drug Delivery Translational Research**. v. 2, n. 4, p. 284–292, 2012. doi:10.1007/s13346-012-0064-4.

WALLY, J.; HALBROOKS, P. J.; VONRHEIN, C.; ROULD, M. A.; STEPHEN, J.; MASON, A. B.; BUCHANAN, S. K. The Crystal Structure of Iron-free Human Serum Transferrin Provides Insight into Inter-lobe Communication and Receptor Binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 34, p. 24934–24944, 2007. <https://dx.doi.org/10.1074/jbc.M604592200>.

WANG, Q.; ALSHAKER, H.; BOHLER, T.; SRIVATS,S.; CHAO, Y.; COOPER, C.; PCHEJETSKI, D. Core shell lipid-polymer hybrid nanoparticles with combined docetaxel and molecular targeted therapy for the treatment of metastatic prostate cancer. **Nature**. v.7 p.1-8, 2017.

WEBER, C.; VOIGT, M.; SIMON, J.; DANNER, A.K.; FREY, H.; MAILANDER, V.; HELM, M.; MORSBACH, S.; LANDFESTER, K. Functionalization of Liposomes with Hydrophilic Polymers Results in Macrophage Uptake Independent of the Protein Corona. **Biomacromolecules**. v.20, p. 2989–2999, 2019. DOI: 10.1021/acs.biomac.9b00539.

YANG, T.; CHOI, M.; CUI, F.; SUN, J. Preparation and evaluation of paclitaxel-loaded PEGylated immunoliposome. **Journal of Controlled Release**, v. 120, p. 169–177, 2007. doi:10.1016/j.jconrel.2007.05.01.

YANG, X.; YANG, S.; CHAI, H.; YANG, Z.; LEE, R. J.; LIAO, W.; TENG, L. A novel isoquinoline derivative anticancer agent and its targeted delivery to tumor cells using transferrin-conjugated liposomes. **PLoS ONE**, v. 10, 8, p. 1–12, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136649>.

YEFIMOVA, S.K.; KURILCHENKO, I. Y.; TKACHEVA, T. N.; ROZHKOV, V. A.; SOROKIN, A. V.; LUKIANOVA, N. Y.; BEZDENEZHNYKH, N. A.; MALYUKIN, Y. V.;

CHEKHUN, V. F. Comparative study of dye-loaded liposome accumulation in sensitive and resistant human breast cancer cells. **Expental Oncology**, v.34, n. 2, p. 101-106, 2012.

YOUSEFI, A.; ESMAEILI, F.; RAHIMIAN, S.; ATYABI, F.; DINARVAND, R. Preparation and In Vitro Evaluation of a Pegylated Nano-Liposomal Formulation Containing Docetaxel. **Scientia Pharmaceutica**. v.77, p.453–464, 2009.

YUAN, M.; ZHU, F.; LOU, J.; YUAN, W.; FU, L.; LIU, S. et al. The Anti-tumoral Efficacy of a Docetaxel-loaded Liposomal Drug Delivery System Modified with Transferrin for Ovarian Cancer. **Drug Research**, v. 64, n. 4, p.195–202, 2013. doi:10.1055/s-0033-1355335.

ZHAI, G.; WU, J.; YU, B.; GUO, C.; YANG, X.; LEE, R.J. A Transferrin Receptor-Targeted Liposomal Formulation for Docetaxel. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. v. 10, p. 5129–5136, 2010.

ZHENG-HONG W.; QI-NENG P.; YI W.; JIA-MING L. Hypoglycemic efficacy of chitosan coated insulin liposomes after oral administration in mice. **Acta Pharmacologica Sinica.**, v.25, n.7, p. 966-972, 2004.

ZHOU, Y.; YANG, J.; ZHANG, R.; KOPECEK, J. Combination therapy of prostate cancer with HPMa copolymer conjugates containing PI3K/mTOR inhibitor and docetaxel. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 89, p.107–115, 2015.