

## CAPÍTULO VII

### ESTUDO COMPARATIVO DA VETORIZAÇÃO ENTRE A DOXORRUBICINA LIVRE E EM NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PH SENSÍVEIS PARA CÉLULAS MCF-7: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

**Mylene Teles de Lima<sup>1</sup>;**

<http://lattes.cnpq.br/6496835772307638>

**Brenda da Silva Vilar Freitas<sup>2</sup>;**

<http://lattes.cnpq.br/0295093637376026>

**Carlos Renan Batista Tomaz<sup>3</sup>;**

<http://lattes.cnpq.br/4375048938398331>

**Daniel Sampaio Alves<sup>4</sup>;**

<https://orcid.org/0009-0003-5307-5049>

**Iasminy Macedo<sup>5</sup>;**

<https://orcid.org/0000-0003-3216-2330>

**Israele Fernandes Rodrigues<sup>6</sup>;**

<http://lattes.cnpq.br/0536093345520906>

**Jade Oliveira Brito Peixoto<sup>7</sup>;**

<https://orcid.org/0009-0003-2231-1985>

**José Mateus de Jesus Castro<sup>8</sup>;**

<http://lattes.cnpq.br/5612054429200606>

**Júlio César Silva<sup>9</sup>;**

<https://orcid.org/0000-0003-3602-3776>

**Luís Pereira-de-Morais<sup>10</sup>;**

<https://orcid.org/0000-0001-6659-2502>

**Maria Gabriely de Lima Silva<sup>11</sup>;**

<https://orcid.org/0000-0002-2835-2521>

**Olivia Caroline Maia de Moura<sup>12</sup>;**

<http://lattes.cnpq.br/3026050474109876>

**Patrícia Pereira Tavares de Alcântara<sup>13</sup>;**

<https://orcid.org/0000-0003-3337-4845>

**Priscilla Ramos Freitas<sup>14</sup>;**

<https://orcid.org/0000-0003-4047-4836>

**Rakel Olinda Macedo da Silva<sup>15</sup>;**

<http://lattes.cnpq.br/0146961314135080>

**Romário Matheus Conceição de Oliveira<sup>16</sup>;**

<https://orcid.org/0009-0008-3547-1810>

**Thaís Pereira Lopes<sup>17</sup>;**

<https://orcid.org/0000-0002-1757-6685>

**Vinícius Bezerra de Freitas Pereira<sup>18</sup>.**

<http://lattes.cnpq.br/1452926939953353>

**RESUMO:** Introdução: A neoplasia mamária é uma das principais causas de óbito por câncer em mulheres, ocupando o segundo lugar no ranking mundial, sendo mais prevalente em mulheres acima de 55 anos. O tratamento convencional, não direcionado exclusivamente às células tumorais, resulta em efeitos colaterais como cardiotoxicidade e citotoxicidade de células saudáveis, dificultando a adesão e a eficácia da quimioterapia. Objetivo: Comparar estudos *in vitro* sobre a eficiência da doxorubicina livre em relação ao nanopartículas poliméricas pH sensíveis no direcionamento do fármaco para a linhagem celular MCF-7. Método: Foi realizada uma revisão de artigos experimentais encontrados nas bases de dados MEDLINE e PubMed, além de periódicos da Elsevier, Springer e Taylor & Francis. Os descritores utilizados foram “nanoparticle”, “polymer”, “breast cancer”, “doxorubicin” e “pH”, combinados por operadores booleanos. Resultados: Foram incluídos 12 artigos de estudo experimental para o comparativo. Os estudos apontaram redução significativa da viabilidade da linhagem MCF-7 mediada pela entrega direcionada das nanopartículas poliméricas pH sensíveis, quando comparado com a doxorubicina na sua forma livre. Conclusão: As nanopartículas poliméricas pH sensíveis, demonstraram biocompatibilidade e vetorização eficaz e capaz de evitar que tecidos e células saudáveis sejam afetadas, com base na liberação da doxorubicina apenas em pH específico (6,6) presente no microambiente tumoral, dessa forma evidenciando que o polímero na sua constituição e a sensibilidade ao pH melhoraram significativamente a atividade antitumoral *in vitro* da linhagem MCF-7, tornando objeto notável de estudos *in vivo* para confirmação dos resultados de ensaios *in vitro*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Nanopartículas. Polímeros. Doxorubicina. Câncer de mama.

## COMPARATIVE STUDY OF VECTORIZATION BETWEEN FREE DOXORUBICIN AND PH-SENSITIVE POLYMERIC NANOPARTICLES FOR MCF-7 CELLS: A SYSTEMATIC REVIEW

**ABSTRACT:** Introduction: Breast cancer is one of the main causes of death from cancer in women, ranking second in the world, and is more prevalent in women over 55. Conventional treatment, which does not exclusively target tumor cells, results in side effects such as cardiotoxicity and cytotoxicity of healthy cells, hindering adherence and the effectiveness of chemotherapy. Objective: To compare in vitro studies on the efficiency of free doxorubicin versus pH-sensitive polymeric nanoparticles in targeting the drug to the MCF-7 cell line. Method: A review was carried out of experimental articles found in the MEDLINE and PubMed databases, as well as journals from Elsevier, Springer and Taylor & Francis. The descriptors used were “nanoparticle”, “polymer”, “breast cancer”, “doxorubicin” and “pH”, combined by Boolean operators. Results: 12 experimental articles were included for comparison. The studies showed a significant reduction in the viability of the MCF-7 lineage mediated by the targeted delivery of pH-sensitive polymeric nanoparticles, when compared to doxorubicin in its free form. Conclusion: The pH-sensitive polymeric nanoparticles demonstrated biocompatibility and effective vectorization capable of preventing healthy tissues and cells from being affected, based on the release of doxorubicin only at a specific pH (6.6) present in the tumor microenvironment, thus showing that the polymer in its constitution and pH sensitivity significantly improved the in vitro antitumor activity of the MCF-7 lineage, making it a remarkable object of in vivo studies to confirm the results of in vitro tests.

**KEY-WORDS:** Nanoparticles. Polymers. Breast Cancer. Doxorubicin.

### INTRODUÇÃO

A neoplasia mamária é destaque na saúde pública no Brasil e ocupa o ranking mundial do tipo de câncer que mais causa o óbito, caracterizado pela proliferação de células cancerígenas, sendo um tipo de câncer de prevalência em mulheres na faixa etária a partir dos 50 anos<sup>1</sup>.

Essa proeminência decorre da incidência do câncer de mama (CM) em todo o mundo, que conforme a Global Cancer Observatory (Globocan), mediada pela International Agency for Research on Cancer (IARC) tem estimativa de 1,94 milhões de casos (taxa padronizada de 30 a 69 anos) para 2030<sup>2</sup>, e pelo índice de mortalidade elevada, como uma das causas, a resistência aos antineoplásicos convencionais<sup>3</sup>. No Brasil, a incidência para o triênio 2022 a 2025 é, com taxa ajustada, 41,89 casos novos a cada 100 mil mulheres<sup>4</sup>.

Muito comumente a maioria das neoplasias mamárias são diagnosticadas em mulheres a partir dos 55 anos, sendo essas neoplasias categorizadas em sete subtipos: o carcinoma lobular (*in situ* ou invasivo), ductal (*in situ* ou invasivo), triplo negativo, inflamatório,

doença de paget da mama, angiossarcoma e tumor filoides <sup>5,6</sup>.

Dentre os principais sintomas se se destacam: nódulo geralmente indolor (presente em 90% dos casos), pele da mama avermelhada, que também pode apresentar excreção de líquido anormal pelas mamas, bem como a presença de nódulos, podendo ser localizados nas axilas ou no pescoço<sup>7</sup>.

A neoplasia mamária se origina de células cancerígenas que se multiplicam de forma disseminada<sup>8</sup>, podendo surgir impulsionada por fatores de risco como, estilismo, exposição a hormônios (estrogênio e andrógenos), tabagismo e outros que podem facilitar o surgimento do câncer de mama, bem como alterações nos genes BRCA 1 e 2, que são supressores do tumor, manifestados por meio do histórico familiar<sup>9</sup>.

O tratamento convencional é mediado por quimioterápicos, radioterapia, terapia hormonal e/ou cirurgia. As substâncias frequentemente usadas, reduzem a qualidade de vida das pacientes, resultando em problemas como a cardiotoxicidade e citotoxicidade de células, como na doxorubicina, uma antraciclinas frequentemente usada na quimioterapia<sup>10</sup>.

A doxorubicina (DOX), é um quimioterápico da classe das antraciclinas, seu mecanismo é baseado na inibição do DNA e RNA, bem como estresse oxidativo e morte celular. A inibição na síntese do DNA é promovida pela atuação do ativo na função da topoisomerase II, evitando que a fita de DNA seja formada com o material genético dessas células cancerígenas<sup>11</sup>; o estresse oxidativo, é caracterizado pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO), promovendo o vazamento de cálcio e danos ao DNA. A morte celular pelo uso da DOX, possui três vias: apoptose, piroptose e ferroptose, atuando em genes e complexos relacionados com a morte celular<sup>12</sup>.

Esses mecanismos não são direcionados apenas para células cancerígenas, ocasionando os efeitos adversos que facilitam o surgimento de doenças secundárias como as supracitadas, dessa forma, visando a redução desses efeitos, a nanotecnologia tem sido uma aliada na formulação de nanopartículas que promove o direcionamento do ativo para as células cancerígenas, cumulativamente, além da liberação controlada<sup>13</sup>.

As nanopartículas são carregadas por nanocarreadores, que possibilitam a penetração da substância nas células cancerígenas por meio de endocitose<sup>14</sup>. Os nanocarreadores são divididos em: (1) portadores vesiculares, (2) transportadores de micelas e (3) portadores de fase sólida, todos garantem que o ativo pelo qual são carreadores, seja protegido e direcionado para as células cancerígenas, evitando que problemas secundários apresentados pelo tratamento convencional, surjam<sup>15</sup>.

Dentre as nanopartículas (NPs) estudadas para desenvolvimento, se destacam as NPs poliméricas que fazem parte de grande interesse no âmbito da pesquisa de inovação de novos medicamentos antineoplásicos, visto que os polímeros são substâncias orgânicas, de baixo custo, biocompatível e não tóxica<sup>16</sup>, que garantem a entrega do medicamento assegurando a integridade do ativo para ser liberado no tecido tumoral. Essa liberação

do medicamento pode ocorrer por meio do sistema responsivo a estímulos<sup>17</sup>, como, por exemplo, a resposta das nanopartículas poliméricas pH sensíveis ao microambiente tumoral levemente ácido (pH 6,5 a 7,2) em comparação com o tecido saudável<sup>16</sup>.

Existem linhagens celulares alvo de pesquisas acerca de novos tratamentos para cada tipo de câncer. A MCF-7 é a denominação de uma linhagem celular criada a partir do adenocarcinoma mamário, geralmente cultivada e incubada para a pesquisa de novos tratamentos de neoplasias com origem hormonal (estrogênio e progesterona)<sup>18</sup>.

Dessa forma, o presente trabalho objetiva comparar os estudos *in vitro* com doxorrubicina livre e em nanopartículas poliméricas pH sensíveis na vetorização do fármaco para a linhagem celular MCF-7

## MÉTODOS

Trata-se de uma pesquisa de revisão sistemática, com viés descritivo e de abordagem de cunho quantitativo. A coleta dos dados bibliográficos foi realizada no período de setembro e outubro de 2024, nas bases de dados Medline, Pubmed e nos periódicos Elsevier, Springer e Taylor e Francis. Na busca dos artigos, foi utilizada combinadamente os termos conforme a disponibilidade de busca a partir dos termos presentes no MeSH ou em seus correspondentes no DeCS: “nanoparticle”, “polymer”, “breast cancer”, “doxorubicin” e “pH”, relacionados entre si pelo operador booleano AND. As referências foram analisadas segundo os critérios de inclusão e exclusão.

As referências de textos completos de acesso livre ou limitado, no idioma inglês, publicados nos últimos 10 anos e que abordavam o tipo de estudo experimental foram incluídas na amostra. Estudos que abordaram a temática por outra óptica, textos incompletos, duplicados nas bases e anteriores aos últimos 10 anos, foram excluídos da seleção da literatura. O recorte temporal de 10 anos se tornou um critério com base em que os estudos com nanopartículas poliméricas pH Sensíveis, são relativamente novos porém com grandes avanços na última década.

## RESULTADOS

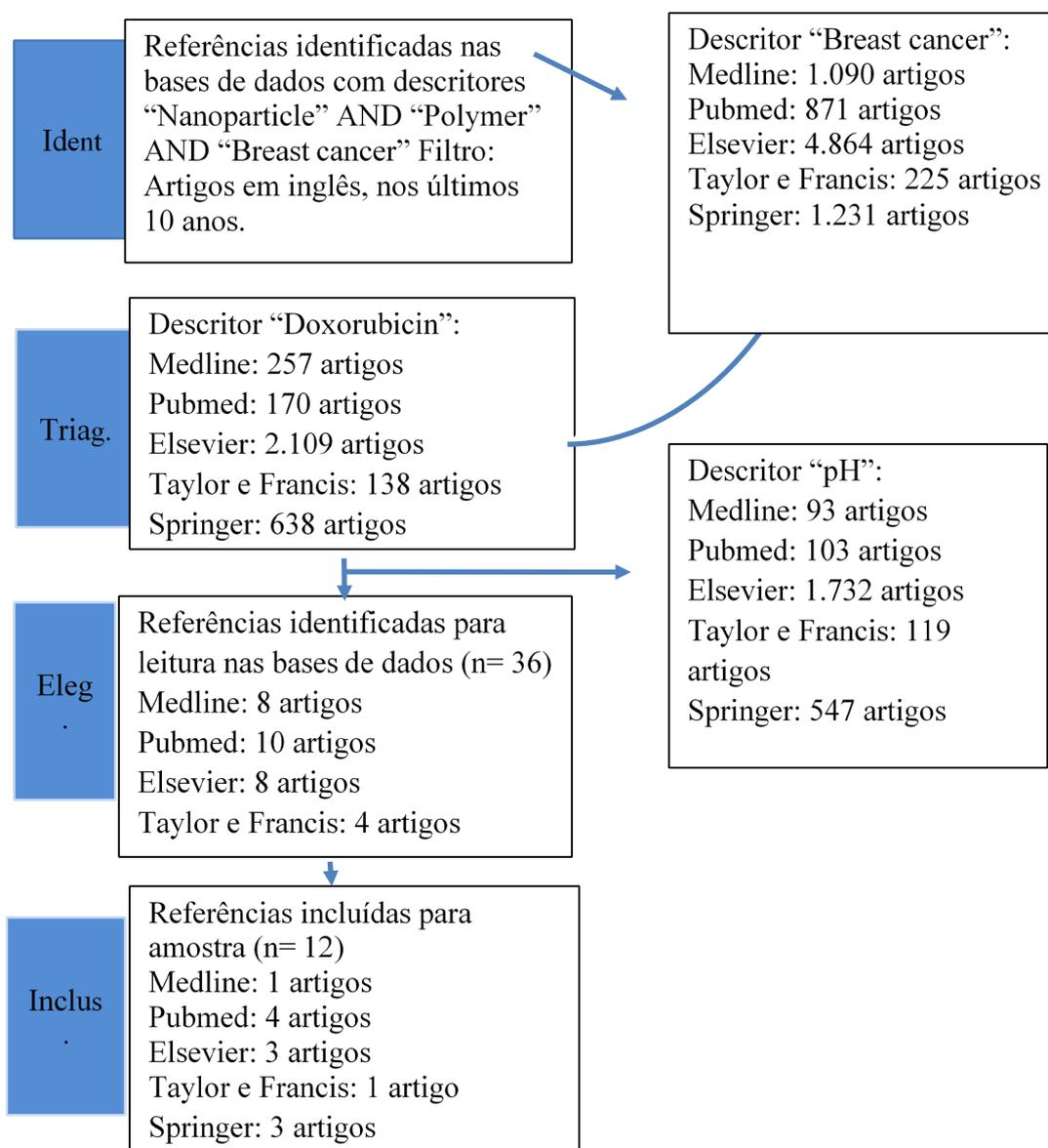
Nas bases de dados foram encontrados 8.281 artigos, após relacionar os descritores pelo operador booleano AND, foram encontrados 93 artigos na base MEDLINE, 103 na Pubmed, nos periódicos Elsevier, Taylor e Francis e Springer, respectivamente, 1.732, 119 e 547 artigos, respectivamente. Após a leitura das temáticas e resumos, foram selecionados 23 artigos para a análise dos resultados, 8 da MEDLINE, 10 do Pubmed, 8 da Elsevier, 4 do periódico Taylor e Francis e 6 do periódico Springer. Em seguida, após análise minuciosa, foram selecionados 12 artigos que seguiam os critérios de inclusão e exclusão como demonstrado na tabela 1, a seguir, e que abordaram a temática para o referencial teórico como exposto na tabela 2.

**Tabela 1.** Critérios de inclusão e exclusão para referencial teórico.

Inclusão	Exclusão
Acesso livre ou limitado	Temática abordada por outra óptica
Idioma inglês	Textos incompletos
Publicados nos últimos 10 anos	Duplicados nas bases de dados
Estudo experimental	Outros tipos de estudo
Estudos <i>in vitro</i>	Anteriores aos últimos 10 anos

Fonte: Próprio autor, 2024.

**Tabela 2.** Fluxograma das referências para amostra.



Fonte: Próprio autor, 2024.

**Tabela 3.** Características gerais dos artigos.

TÍTULO	AUTOR/ANO	TIPO DE ESTUDO	OBJETIVOS	PRINCIPAIS RESULTADOS
Doxorubicin-loaded polymeric nanoparticles containing ketoester-based block and cholesterol moiety as specific vehicles to fight estrogen-dependent breast cancer	Paweł Misiaik; Katarzyna Niemirówicz-Laskowska; Karolina H. Markiewicz et al (2023)	Estudo experimental	Apresentar a citotoxicidade, biocompatibilidade de NPs poliméricas carregadas com doxorubicina e consistindo colesterol na sua nanoestrutura, bem como seus efeitos direcionados para a linhagem MCF-7 dependente ou independente de estrogênio.	A linhagem MCF-7 estudada pelos autores, foi focado na neoplasia mamária dependente de estrogênio, dessa forma, as nanopartículas poliméricas carregadas com o fármaco (DOX), puderam causar a depleção das células em até 5%, mesmo que houvesse alterações químicas entre as NPs. A redução da viabilidade foi 16 vezes maior do que nas células tratadas com a doxorubicina livre.
Biodegradable PEG-PCL Nanoparticles for Co-delivery of MUC1 Inhibitor and Doxorubicin for the Confinement of Triple-Negative Breast Cancer	Akanksha Behl; Subhash Solanki; Shrawan K. Paswan et al (2022)	Estudo experimental	A pesquisa relata a abordagem sinérgica de aprisionamento combinado do quimioterápico (DOX) e um peptídeo anticâncer (inibidor de MUC1) encapsulado em um copolímero de PEG-PCL dibloco, direcionado para o modelo de células do câncer triplo negativo (MDA-MB-231) e MCF-7.	O sinergismo da doxorubicina com o peptídeo anticâncer, em nanopartículas, foi responsável pelo melhor resultado de redução de viabilidade, para aproximadamente 20% da cultura. A liberação da DOX no microambiente tumoral além de direcionada, foi sustentada baseado nos seus resultados, apresentando uma liberação por até 60 dias, atividade mediada pelo copolímero PEG-PCL.
Multifunctional PLGA nanoparticles combining transferrin-targetability and pH-stimuli sensitivity enhanced doxorubicin intracellular delivery and <i>in vitro</i> anti-neoplastic activity in MDR tumor cells.	Laís E. Schreen; Daniele Rubert Nogueira-Librelotto; Daniela Mathes et al (2021)	Estudo experimental	Demonstrar o estudo de NPs conjugadas com Tf não direcionadas e ao fármaco livre, com o objetivo de evidenciar o papel substancial do encapsulamento de DOX no poloxâmero modificada sensível ao pH, em células NCI/ADR-RES e em comparação com MCF-7.	A pesquisa dos efeitos de NPs poliméricas (PLGA) conjugadas com transferrina, e carregada de doxorubicina, resultou em uma redução satisfatória da viabilidade das linhagens estudadas pelos pesquisadores; na linhagem MCF-7 a redução da viabilidade foi de 100% para aproximadamente 25% da colônia no meio de cultura.

Targeted doxorubicin delivery and release within breast cancer environment using PEGylated chitosan nanoparticles labeled with monoclonal antibodies	Omar Helmi; Fatma Elshishiny; Wael Mamdouh (2021)	Estudo experimental	O estudo realizou experimentos para aplicar um nanocarreador de quitosana PEGilada polimérica com funcionalização de mAbs, como um novo sistema terapêutico para liberação seletiva da DOX aprisionada.	As nanopartículas em pH 7,4, liberaram cerca de 14% do fármaco, favorecendo a interpretação de que em pH sanguíneo normal, a estabilidade do nanossistema é compatível, reduzindo nesse caso o encaminhamento do fármaco para células saudáveis e aos eritrócitos, garantindo a hemocompatibilidade das NPs.
pH-responsive high stability polymeric nanoparticles for targeted delivery of anticancer therapeutics	L. Palanikumar; Sumaya Al-Hosani; Mona Kalmouni (2020)	Estudo experimental	Os experimentos foram realizados com NPs híbridos que consistem em um núcleo de ácido polilático-co-glicólico (PLGA) 'envolto' numa casca de albumina de soro bovino, reticulada funcionalizada com o peptídeo de membrana racional acionado por acidez, na linhagem MCF-7.	O estudo gerou dados com relação a estabilidade da NPs no que confere a adsorção de proteínas séricas, que quando instável, forma uma coroa protetiva, sendo característico e causando agregação. As nanopartículas contendo a camada BSA previne a formação dessa coroa, o que é um resultado satisfatório referente a estabilidade.
Chitosan-Raloxifene nanoparticle containing doxorubicin as a new double-effect targeting vehicle for breast cancer therapy	Zohreh Mohammadi; Fatemeh Yazdi Samadi; Soheila Rahmani et al (2020)	Estudo experimental	Evidenciar o melhor direcionamento de medicamentos anticancerígenos, mediados por nanopartículas de quitosana conjugada com raloxifeno, carregado de DOX em células da linhagem MCF-7	Apesar das nanopartículas serem, na literatura, um futuro tratamento promissor, nesse estudo a DOX livre obteve melhores resultados de redução de viabilidade de MCF-7, do que NPs de quitosana conjugado com raloxifeno e carregado de DOX.
CD-340 functionalized doxorubicin-loaded nanoparticle induces apoptosis and reduces tumor volume along with drug-related cardiotoxicity in mice	Laboni Mondal; Biswajit Mukherjee; Kaushik Das (2019)	Estudo experimental	Com o objetivo de projetar NPs de PLGA, conjugadas com o anticorpo CD-340 e carregado com doxorubicina, para a administração em células do câncer de mama.	Dados relevantes foram apurados nos experimentos, a DOX livre conseguiu inibir 50% das células MCF-7 incubadas, na dose de 0.065 µg/ml, sendo a dose mais alta para IC50. A fim de comparação a DOX em NP inibiu o crescimento de 50% na dose de 0.04 µg/ml, seguido de 0.031 µg/ml de dose de NP DOX Ab.

<p>Co-delivery of DOX and PDTC by pH-sensitive nanoparticles to overcome multi-drug resistance in breast cancer</p>	<p>Xu Cheng 1, Dapeng Li 1, Min Sun 1 et al (2019)</p>	<p>Estudo experimental</p>	<p>Evidenciar a utilização <i>in vitro</i> de nanopartículas poliméricas pH sensíveis com o copolímero de poli, na co-entrega de DOX e o quimiossensibilizador PCTD, visando a inibição do crescimento celular e a acumulação de DOX no microambiente tumoral.</p>	<p>Os cientistas obtiveram dados satisfatórios com relação ao efeito inibitório, de nanopartículas contendo o quimiossensibilizador PCTD, resultando em inibição maior do que as NPs-DOX e DOX livre, justificando a escolha da síntese de nanopartículas contendo o quimiossensibilizador.</p>
<p>pH-sensitive polymeric nanoparticles of mPEG-PLGA-PGlu with hybrid core for simultaneous encapsulation of curcumin and doxorubicin to kill the heterogeneous tumour cells in breast cancer</p>	<p>Jian-Dong Yuan; De-Li ZhuGe; Meng-Qi Tong et al (2018)</p>	<p>Estudo experimental</p>	<p>O estudo visa desenvolver uma nanopartícula dupla carregada com fármaco sensível ao pH, usando o polímero mPEG-PLGA-PGlu, direcionada para células do câncer de mama e outras células tumorais diferenciadas.</p>	<p>A sensibilidade ao pH das NPs-DOX-(curcumina) CUR, favoreceram a liberação de 85% de doxorubicina e 80% de curcumina, após 6 horas em pH 5,0, que possui uma diferença no pH 7,4, apresentando um perfil de liberação mais lenta, resultando em 22% para DOX e 50% de CUR.</p>
<p>Chitosan-Dextran sulfate coated doxorubicin loaded PLGA-PVA-nanoparticles caused apoptosis in doxorubicin resistance breast cancer cells through induction of DNA damage</p>	<p>Sumit Sidharth 1, Anamada Nayak 1, Deepika Nayak 1, et al (2017)</p>	<p>Estudo experimental</p>	<p>Analisar a eficácia, a resistência e a toxicidade da DOX encapsulada em nanopartículas de quitosana-dextrana sulfato e PLGA-PVA.</p>	<p>Os autores evidenciaram as NPs de PLGA-PVA carregada com DOX e as que são revestidas com CS-DS, com potencial efeito de redução da viabilidade de células cancerígenas das linhagens MCF-7 e MDA-MB 231 e a MCF-7 resistente a DOX. Tanto na viabilidade, no superenrolamento da topoisomerase e na migração de células, as NPs PLGA-PVA carregadas com DOX e revestida com CS-DS, obtiveram melhores e maiores resultados nos parâmetros investigados.</p>

<p>Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles functionalized with a pH-responsive amphiphile improved the <i>in vitro</i> antineoplastic effects of doxorubicin</p>	<p>Daniele R. Nogueira-Librelo<sup>a,b,*</sup>, Laís E. Scheerena<sup>a,b</sup>, M. Pilar Vinar-del c et al (2016)</p>	<p>Estudo experimental</p>	<p>Avaliar a atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> de drogas encapsuladas e não encapsuladas, além da viabilidade do uso de NPs de quitosana sensível a acidez tumoral em modelos de células tumorais MCF-7 e HeLa.</p>	<p>Conforme os dados obtidos pelos estudos de nanopartículas de quitosana com doxorubicina (CS-NPs-DOX) encapsulada, NPs peguadas ou com poloxâmero no modelo da linhagem celular MCF-7, as CS-NPs-DOX apresentaram maior atividade antiproliferativa, do que as POLO-X-NPs-DOX e PEG-NPs-DOX. Conforme as concentrações aumentaram para 10yg/ml, a viabilidade celular foi reduzida sistematicamente no período de incubação de 24h.</p>
<p>Multifunctional ATRP based pH Responsive Polymeric Nanoparticles for Improved Doxorubicin Chemotherapy in Breast Cancer by Proton Sponge Effect/Endo-Lysosomal Escape</p>	<p>Shantanu V. Lale, a,b Arun Kumar, a,b Farhat Naz et al. (2015)</p>	<p>Estudo experimental</p>	<p>Evidenciar a partir dos experimentos, a utilização de um nanossistema polimérico contendo múltiplas cadeias de polietileno-glicol, carregada com doxorubicina e pH sensíveis, na linhagem MCF-7 e L929</p>	<p>A liberação da DOX foi maior em células encubadas em pH ácido, imitando a acidez dos endossomos (5,0), do que em pH extracelular (7,4), tendo como resultado após 72 horas de incubação, a liberação de 77% da doxorubicina de NPs poliméricas conjugadas, sendo significativamente superior ao resultado de 25% de liberação do fármaco em pH 7,4.</p>

## DISCUSSÃO

A neoplasia mamária, é um problema mundial de saúde pública no Brasil e no mundo, acometendo principalmente mulheres a partir dos 50 anos (OPAS)<sup>1</sup>. Os antineoplásicos convencionais utilizados na quimioterapia, geram bastantes efeitos adversos, dificultando o tratamento, podendo resultar em células cancerígenas resistentes aos antitumorais (Eralp et al)<sup>10</sup>. Nesse sentido, estudos estão sendo realizados, de novas formas de medicamentos visando a otimização do tratamento, avaliando sistemas como nanopartículas sensíveis ao pH, podendo ser desenvolvidas com base em polímeros de origem natural, sintéticos, dentre outras formas de constituição.

Partindo desse pressuposto, estudiosos (Nogueira et al)<sup>16</sup> evidenciaram o potencial de nanopartículas de quitosana-tripolifosfato pH sensíveis, no efeito antineoplásico *in vitro* da doxorubicina na linhagem MCF-7. Apesar de promissor, desafios são encontrados no desenvolvimento dessas nanopartículas, considerando as cargas dos seus constituintes,

em questão a DOX e o polímero quitosana, os quais são catiônicos, ou seja, apresentam cargas positivas, dessa forma, para alcançar a estabilidade desse sistema coloidal, os pesquisadores utilizaram a substância tripolifosfato poliânion pentassódico (TPP), para formar complexação iônica. O TPP atua como um sequestrador de íons que estabelece as NPs por meio de interações eletrostáticas

Em contrapartida, Siddharth et al<sup>19</sup> em outro estudo a fim de alcançar o equilíbrio entre duas cargas catiônicas em nanopartículas poliméricas de Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)-Poli (álcool vinílico) (PLGA-PVA), carregado de doxorubicina e revestida de quitosana-dextrana (CS-DS), utilizou na nanoformulação o sulfato de dextrana para mascarar a carga positiva do fármaco e do polímero CS nas NPs.

A estabilidade é um dos maiores desafios no desenvolvimento de produtos em escala nanométrica, a própria adsorção, ou seja impregnação de moléculas ativas no desenvolvimento, pode originar uma instabilidade de um sistema coloidal. Os dados de estabilidade (avaliados em potencial zeta, sendo a medida de carga elétrica das partículas em um sistema coloidal) adquiridos por Nogueira et al<sup>16</sup> das experiências com nanopartículas de quitosana carregadas com DOX, peguilhadas com polietilenoglicol (PEG) e as que acompanham um poloxâmero, obtiveram resultados insatisfatórios de potencial zeta (ZP), com valores negativos (-3,3 a -6,3 mV e -3,57 a -6,76) estabelecido através do tempo inicial a 24°C e 37°C. As nanopartículas se agregaram muito rapidamente, assim que dispersas no meio de cultura apresentaram uma redução da repulsão entre elas tornando indicativo da instabilidade do nanossistema, isso podendo ser associado ao ZP próximo da neutralidade que caracteriza uma NP com baixa carga superficial.

Nos estudos desenvolvidos por Siddharth et al<sup>19</sup>, os testes de estabilidade de nanopartículas de PLGA-PVA carregadas com DOX e revestidas de CS-DS, foram satisfatórios com relação ao ZP, apresentando ZP= +2,98 ±0,32 mV. Dessa forma, as NPs desenvolvidas neste estudo, obtiveram alto grau de estabilidade, não ocorrendo nenhuma agregação ou precipitação, sendo as NPs carregadas de DOX e revestidas de quitosana-dextrana as mais estáveis, mesmo após 120 dias de armazenamento.

Portanto, dentre as nanopartículas resultantes dos experimentos, o sistema coloidal PLGA-PVA carregadas com DOX e revestidas de CS-DS desenvolvido por Siddharth et al<sup>19</sup>, apresentou maior estabilidade do que as DOX-CS-NPs, PEG-DOX-CS-NPs e Polox-DOX-CS-NPs preparadas em outro estudo experimental por Nogueira et al<sup>16</sup>, isso pode ser resultado como mencionado, da diferença do potencial zeta das nanopartículas de cada experimento, quanto mais próximo da neutralidade for o ZP, menor carga superficial a NP apresenta, favorecendo a atração do nanossistema com os constituintes do meio.

O IC50 é um parâmetro importante para detectar quanto de uma substância consegue inibir 50% do crescimento de células, bactérias ou do que está sendo pesquisado, dessa forma, quanto menor o IC50, melhor a substância é. Nos estudos de Mondal et al<sup>21</sup> demonstraram que o IC50 menor foi alcançado com a NP carregada de DOX e que continha

o anticorpo Anti-HER2 (Ab), na concentração de 0.031 µg/ml de dose, seguida de 0.04 µg/ml para DOX em NP, e de 0.065 µg/ml para DOX livre, ocupando o lugar de dose mais alta para o IC50.

As concentrações inibitórias de 50% das células MCF-7 mediadas pela DOX livre seguida dos nanossistemas DOX + Pirrolidini-neditiocarbamato (PDTC), DOX-NPs e DOX-PDTC-NPs por Cheng et al<sup>20</sup> e DOX-CS-NPs, PEG-DOX-CS-NPs e Polox-DOX-CS-NPs por Nogueira et al<sup>16</sup> com sistemas responsivos ao pH estão descritas na tabela 4.

**Tabela 4.** Valores de IC50 de sistemas responsivos ao pH para a linhagem MCF-7.

Valores de IC50	
Responsivas ao pH	IC50 (µg/ml)
DOX livre	11,57 ± 2,51
DOX-CS-NPs	1,61 ± 3,47
PEG-DOX-CS-NPs	1,79 ± 2,56
Polox-DOX-CS-NPs	1,87 ± 1,25
DOX livre	4,03 ± 0,01
DOX + PDTC	3,9 ± 0,03
DOX-NPs	5,99 ± 0,02
DOX-PDTC-NPs	5,65 ± 0,01

Fonte: Próprio autor, 2024.

De fato, o estudo de Cheng et al<sup>20</sup> demonstrou um índice inibitório de 50% do crescimento celular menor do que no nanossistema em nanopartículas, isso ocorre pois no seu estudo foi utilizado a linhagem celular MCF-7 muito sensível a doxorrubicina livre e a linhagem MCF-7-ADR resistente a doxorrubicina, obtendo melhores valores pela DOX livre.

As nanopartículas pH sensíveis apresentadas por Nogueira et al<sup>16</sup> e Cheng et al<sup>20</sup>, diferente da DOX nano formulada e das NPs PLGA-PVA sem um agente sensível ao pH apresentada em outro experimento por Siddharth et al<sup>19</sup>, são mais promissoras no que se refere ao efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR), de acumulação no microambiente tumoral, com relação ao pH, concentração e o tempo de incubação. Sendo que, concentrações menores do fármaco carregado por nanocarreadores modificados são eficientes para inibir a viabilidade das células da linhagem MCF-7 no meio de cultura para 50%.

Os experimentos realizados em outra avaliação por Palanikumar et al<sup>22</sup>, demonstraram os efeitos das NPs em células tumorais MCF-7, sob efeito de ATRAM um peptídeo de membrana responsivo ao estímulo pH, favorecendo a citotoxicidade e indução de apoptose. Cerca de 74 ± 2% das células, sofreram apoptose precoce em condições de pH 6,5, numa concentração de 0,5 µg/mL de doxor-ubicina-trifenilfosfina (DOX-TTP), por um período de 12h, com nanopartículas contendo ATRAM-BSA-PLGA na sua estrutura. A efeito

comparativo, as NPs sintetizadas sem o ATRAM não foram tóxicas para a linhagem MCF-7, sendo indicativo que a presença do sensibilizador, como também utilizado por outros autores, é uma alternativa a ser aprofundada para direcionamento e liberação apenas no microambiente tumoral.

A sensibilidade ao estímulo pH ácido de nanopartículas, resulta em liberação do fármaco exponencialmente quando comparado ao pH 7,4, da mesma forma que foi evidenciado a apoptose de células MCF-7 mediada pela liberação de DOX-TPP por Palanikumar et al<sup>22</sup>, em outro estudo por Yuan et al<sup>23</sup>, a doxorubicina foi conjugada com a curcumina (DOX-CUR), para avaliar a capacidade de liberação da DOX e CUR com relação ao pH. A liberação da DOX em pH que imita o fisiológico (7,4), foi de 22% e 50% para CUR, em torno de 6 horas, em pH 5,0 a doxorubicina e curcumina foram liberadas eficazmente, alcançando 85% e 80% nas células, respectivamente, relacionando mais uma vez as nanopartículas poliméricas pH sensíveis com a efetividade de entrega e liberação responsiva ao estímulo pH.

Lale et al<sup>24</sup> demonstrou a liberação de doxorubicina com relação ao pH, muito semelhante aos resultados de Yuan et al<sup>23</sup>, o conjugado de polímero-doxorubicina com a ligação de hidrazona que torna a nanopartícula sensível ao pH, apresentou uma liberação de 89% em resposta ao ácido e 29% em pH fisiológico. Essas porcentagens evidenciam que muito pouco da doxorubicina se direciona para tecidos, eritrócitos ou células saudáveis quando em nanopartículas.

As NPs responsivas a estímulos, como ao pH, foi responsável pela maior porcentagem de liberação da DOX, confirmando que NPs poliméricas pH sensíveis, melhora a internalização do fármaco na linhagem MCF-7, e seus componentes auxiliam no direcionamento do fármaco para o microambiente tumoral, protege o sistema da ação da bomba de efluxo, podendo ainda ser um redutor em estudos *in vivo*, dos efeitos conhecidos pelo tratamento com o antineoplásico doxorubicina.

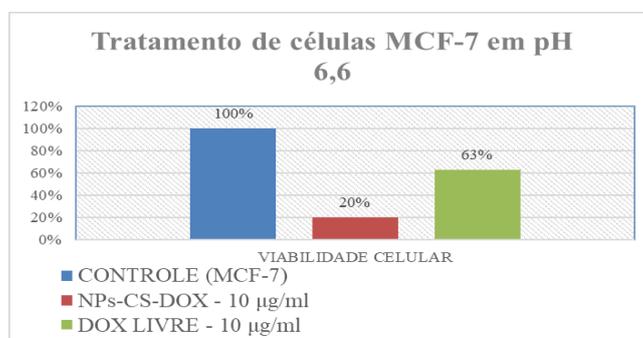
Em outro estudo, Cheng et al<sup>20</sup> evidenciou que nanopartículas poliméricas pH sensíveis, além de reduzir a viabilidade celular para um número menor em comparação com as não modificadas, ainda demonstrou de que forma o pH interfere na liberação do fármaco em um ensaio *in vitro* com a acidez esperada de um microambiente tumoral. As NPs adicionadas em meio ácido (pH 5,0) obtiveram melhores e rápidos resultados de liberação do fármaco, chegando a 73,19% para NPs de DOX e 69,6% para NPs de PDTC no período de 24h. O sistema coloidal se torna desfeito a partir da chegada ao pH levemente ácido, promovido pela hidrólise de ligações orto éster (presente no agente que promove a sensibilização das NPs), resultando na degradação e rápida liberação do fármaco.

Além da liberação da DOX, outro parâmetro foi investigado por Schreen et al<sup>25</sup> a retenção intracelular nos experimentos com as NPs-PLGA sem fármaco, DOX-PLGA-NPs e Tf-DOX-PLGA-NPs, todas sensíveis ao pH. A retenção intracelular foi maior na nanopartícula que continha na sua nanoformulação a proteína transferrina (Tf), esse resultado se dá

pelo fato de que células em fase de divisão como as células tumorais, possuem uma alta expressão de receptores de transferrina (TfR), dessa forma, a NP contendo Tf, mais facilmente tem acesso às células cancerígenas da linhagem MCF-7, gerando uma alta retenção devido à afinidade do conjugado Tf com o seu receptor.

Nos estudos de Nogueira et al<sup>16</sup>, a viabilidade celular em pH fisiológico 7,4, teve a sua redução com relação ao tempo e concentração das NPs no meio de cultura, sendo as diluições 0,1 µg/ml, 1µg/ml, 2,5µg/ml e 10µg/ml. A redução da viabilidade celular foi maior na concentração de 10µg/ml em 24h no pH 6,6 (gráfico 1), obtendo o melhor resultado com as NPS-CS-DOX. Tanto em 24 horas de incubação e 48h, as nanopartículas de quitosana carregadas com doxorubicina apresentou a maior redução das células MCF-7 em meio de cultura.

**Gráfico 1.** Atividade antiproliferativa NP-CS-DOX pH sensível e DOX livre em 24 horas.



**Fonte:** Próprio autor, 2024.

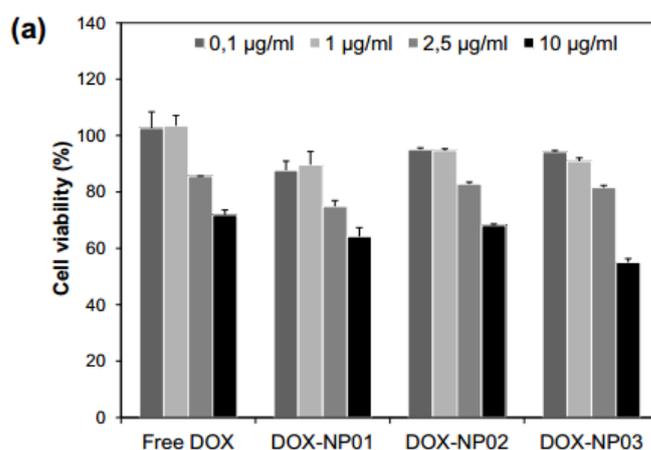
A atividade antiproliferativa foi testada por alguns autores em modelos de linhagem celular não tumoral como 3T3 (fibroblastos albinos suíços murinos) por Nogueira et al<sup>16</sup>, Siddharth et al<sup>19</sup> em células MCF-10A (células epiteliais mamárias normais) e Lale et al<sup>24</sup> e Helmi et al<sup>26</sup> em células L929 (linhagem celular de fibroblasto de camundongo não cancerosa) para analisar se as NPs poliméricas atuariam reduzindo a viabilidade de células saudáveis, sendo seletivo para células tumorais.

Segundo os resultados dos experimentos de Nogueira et al<sup>16</sup>, a linhagem celular 3T3, manteve a sua viabilidade acima de 60% no meio contendo as NPs carregadas com doxorubicina (figura 1), ensaio feito a partir da técnica MTT, usada para avaliar. Por outro lado, nos estudos de Siddharth et al<sup>19</sup>, com outro modelo de células normais as NPs de PLGA-PVA carregado com DOX e revestido de CS-DS, afetaram minimamente o modelo de células não cancerosas utilizadas, MCF-10A. Outro ensaio utilizando de uma linhagem diferente por Lale et al<sup>24</sup>, também não cancerosa, apresentou a biocompatibilidade com células normais no modelo da linhagem L929, onde as nanopartículas de polímero pentablock mantiveram a viabilidade acima de 90% numa concentração máxima de 2mg/ml.

Resultados satisfatórios foram demonstrados por Helmi et al<sup>26</sup> com relação à seletividade nas células L929, obtendo menor efeito citotóxico das nanopartículas contendo anticorpo monoclonal, isso se explica pela ausência de receptores como o HER2 nas células normais, presente apenas nas células tumorais. O modelo de células normais L929 do estudo de Lale et al<sup>24</sup> não captaram as NPs pelo mesmo motivo do que foi demonstrado por Helmi et al<sup>26</sup>, marcado pela ausência de receptor HER2 e ainda o receptor de folato, mantendo a seletividade da apoptose em células apenas cancerígenas.

Dessa forma, as NPs e seus constituintes para a entrega de doxorubicina, são de suma importância na entrega do fármaco seletivamente para as células tumorais, comprovado pelos autores.

**Figura 1.** Citotoxicidade de concentrações variadas de CS-NPs e droga livre: droga livre e CS-NPs carregados com DOX em células 3T3 por ensaio MTT.



Fonte: Nogueira et al, 2016

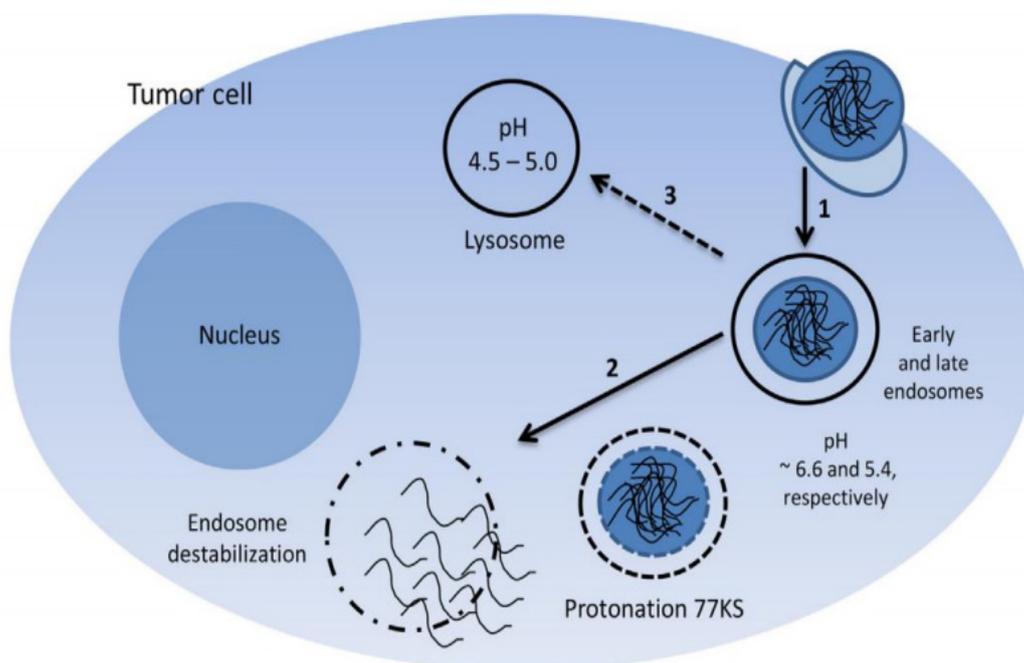
A característica de NPs pH sensíveis, apenas é possível ao ser adicionada uma substância que as torne sensível, como por exemplo, o surfactante a base de lisina (77KS) nas nanoformulações por Nogueira et al<sup>16</sup> ou o copolímero poli (orto éster amidas) utilizado no experimento por Cheng et al<sup>20</sup>, no desenvolvimento de NPs que são sensíveis ao pH, além da adição de um agente quimiossensibilizador o PDTC. A viabilidade celular foi reduzida para apenas 80% nas culturas em que foram adicionados a DOX livre ou NPs carregadas apenas de doxorubicina, já as que tinham na sua estrutura o quimiossensibilizador PDTC e o copolímero pH sensível, resultaram numa redução da viabilidade para 31,88% e 40,8% para DOX+PDTC e NPS-DOX-PDTC, respectivamente, concluindo então que um sistema coloidal que contém o PDTC, é mais citotóxico do que o fármaco livre ou em nanopartícula, apresentando um sinergismo no efeito antineoplásico.

Em outros experimentos com NPs, a adição de um surfactante é necessária para torná-las sensíveis ao estímulo pH, enquanto Behl et al<sup>27</sup>, utilizou da própria natureza do

copolímero PEG-PCL foi utilizada para realizar a liberação do fármaco (DOX) juntamente com o peptídeo anticancerígeno, da qual ao adentrar um ambiente ácido, como o microambiente tumoral (pH 5,5), o copolímero PEG-PCL sofre o processo de hidrólise das ligações ésteres, dessa forma, conforme o pH fica mais ácido (até um limite), a liberação dos seus componentes se torna melhor.

Para quantificar a atividade lítica das NPs nos ensaios de Nogueira et al<sup>16</sup>, na ausência e na presença do surfactante, utilizou do método comparativo da desestabilização das NPs (Figura 2) no ensaio contendo o pH do meio extracelular (pH 7.4) e pH do microambiente tumoral (5,4 e 6,6).

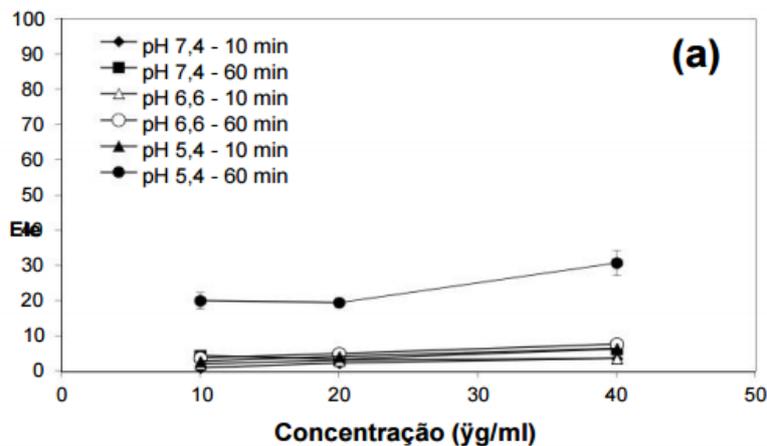
**Figura 2.** Representação esquemática de um mecanismo proposto para a captação celular e liberação de drogas de CS-NPs responsivos ao pH.



Fonte: Nogueira et al, 2019.

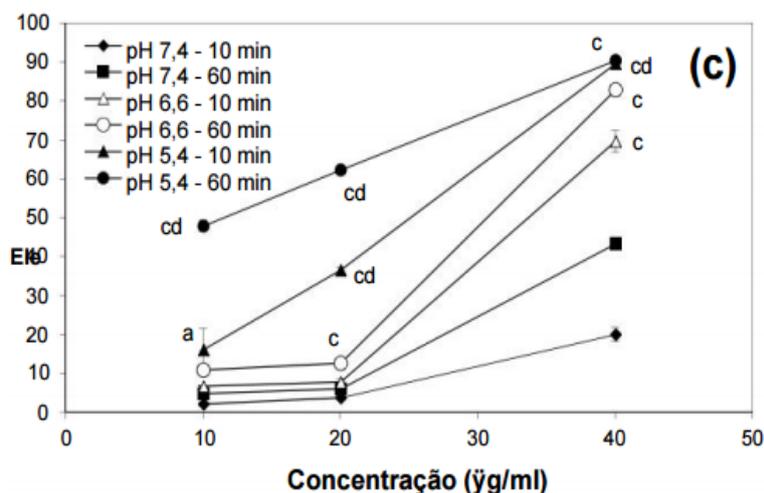
No pH endossômico, imitando o microambiente tumoral (5,4 e 6,6), foram obtidos por Nogueira et al<sup>16</sup> resultados baixos de hemólise no ensaio ausente do surfactante 77KS (figura 3) e por outro lado o sistema com PEG-DOX-CS-NPs com um alto índice de hemólise, apresentado na figura 4, com o máximo de hemólise em pH 5,4 em 60 minutos na concentração de 40µg/ml. Esse teste pôde especificar a eficácia de nanopartículas contendo o surfactante 77KS independentemente de serem carregados ou não com o fármaco, de causar hemólise em pH ácido, favorecendo a interpretação do potencial dos nanossistemas de serem liberados apenas no meio intracelular de células tumorais.

**Figura 3.** Comportamento membranolítico responsivo ao pH de DOX-CS-NPs sem 77KS



Fonte: Nogueira et al, 2019.

**Figura 4.** Comportamento membranolítico responsivo ao pH de PEG-DOX-CS-NPs com 77KS



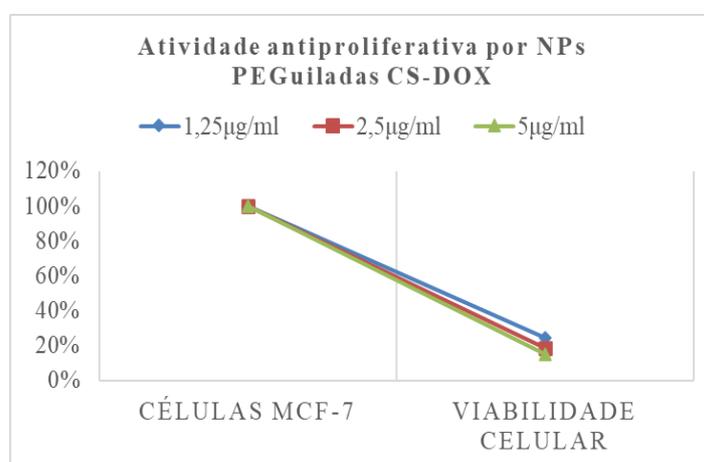
Fonte: Nogueira et al, 2019.

Os estudos com nanopartículas poliméricas pH sensíveis, apontaram uma alta segurança no que se confere a hemocompatibilidade, os testes realizados se basearam em analisar a liberação ou o rompimento da matriz polimérica, mediado pela diferença do pH do microambiente tumoral. Em um estudo experimental de Helmi et al<sup>26</sup>, foi apurado que 14% da doxorubicina foi liberado em pH 7,4, imitando as condições fisiológicas normais, já em pH 6,6, a liberação do fármaco totalizou 45% em cerca de 3h, favorecendo a compreensão de que os nanossistemas sensíveis ao pH, garantem uma alta hemocompatibilidade, eficácia na entrega, bem como a durabilidade no tempo de liberação, contendo um polímero na nanoestrutura.

Certamente, apesar das concordâncias e discordâncias, todos os autores estudados possuem em comum o objetivo de alternativas para reduzir efeitos maléficos da DOX relacionado com a dose. A doxorubicina se trata de um antineoplásico que age de forma inespecífica, gerando efeitos adversos nas portadoras de neoplasias mamárias. Em um estudo de direcionamento desse fármaco mediado por nanopartículas poliméricas, Misiak et al<sup>28</sup> apurou resultados satisfatórios ao comparar a redução da viabilidade de células da linhagem MCF-7 dependente de estrogênio, de forma que em todas as nanopartículas desenvolvidas e carregadas com o fármaco, as células obtiveram depleção de até 5%, que segundo o autor, é 16 vezes maior do que a capacidade da doxorubicina incubada de forma livre.

Resultados semelhantes foram evidenciados por Helmi et al<sup>26</sup>, demonstrando taxas de viabilidade baixas na linhagem MCF-7 nas células incubadas com nanopartículas PEGuiladas CS-DOX (gráfico 2) e com relação a DOX livre, a concentração de 5µg/ml conseguiu reduzir pouco mais de 30% da linhagem, já com o fármaco carregado pela nanopartícula, reduziu a viabilidade para aproximadamente 15%, sendo o melhor resultado também na concentração de 5µg/ml, sugerindo dessa forma, que a entrega do fármaco às células por meio de um nanossistema característico, melhora a cinética do fármaco e direcionamento para as células tumorais.

**Gráfico 2.** Atividade antiproliferativa por NPs PEGuiladas CS-DOX



Fonte: Próprio autor, 2024

Curiosamente, Mohammadi et al<sup>29</sup>, obteve resultados diferentes do esperado com testes de NPs poliméricas carregado de DOX, ao contrário dos resultados de um estudo similar de Nogueira et al<sup>16</sup>, nestes experimentos os autores evidenciaram que os efeitos da doxorubicina livre sob a viabilidade celular de MCF-7 foi muito reduzida na aplicação com DOX livre quando comparado com a DOX em NPs Raloxifeno/Quitossana (RC). Segundo os autores, essa discrepância significativa, se dá pela interação química do raloxifeno com

o polímero quitosana, causando a indisponibilidade das partes bioativas da doxorrubicina, que dessa forma diminui os seus efeitos.

Na tabela (5) está exposto os resultados mais significativos com relação a redução da viabilidade mediada pela doxorrubicina livre e por nanopartículas poliméricas pH sensíveis conjugados com constituintes diferentes, resultando em uma variação do parâmetro, sendo um marco as NPs de CS-DOX-Anti HER2 desenvolvidas por Helmi et al<sup>26</sup>, pela presença de anti-HER2 nas suas nanoformulações, visto que as células tumorais apresentam o receptor HER2, assim mantendo a seletividade da entrega para células MCF-7.

**Tabela 5.** Potencial redução da viabilidade em pH levemente ácido.

Autores	Atividade antiproliferativa	Concentração - h	Nanossistemas/DOX livre
Helmi (2021)	Viabilidade reduzida para aprox. 1,80%	5µg/ml - 24h	CS-NP-DOX-Anti HER2
Helmi (2021)	Viabilidade reduzida para aprox. 30%	5µg/ml - 24h	DOX livre
Schreen (2021)	Viabilidade reduzida para aprox. 12%	50µg/ml - 72h	NP Tf-DOX-PLGA
Schreen (2021)	Viabilidade reduzida para aprox. 25%	50µg/ml - 72h	DOX livre
Palanikumar (2020)	Viabilidade reduzida para aprox. 15%	2µg/ml - 24h	NPs BSA-PLGA-DOX-TPP
Palanikumar (2020)	Viabilidade reduzida para aprox. 29%	2µg/ml - 24h	DOX livre
Nogueira (2016)	Viabilidade reduzida para 20%	10µg/ml - 24h	CS-NPs-DOX
Nogueira (2016)	Viabilidade reduzida para aprox. 63%	10µg/ml - 24h	DOX livre
Cheng (2019)	Viabilidade reduzida para 24,65%	16µg/ml (DOX) 0,8µg/ml (PDTTC) - 24h	NP DOX-PDTC
Cheng (2019)	Viabilidade reduzida para 25,83%	16µg/ml - 24h	DOX livre

Fonte: Próprio autor, 2024.

## CONCLUSÃO

Os antineoplásicos utilizados convencionalmente, de fato, acarretam efeitos adversos nas portadoras, tornando a quimioterapia mais árdua pelo surgimento de novos problemas, o que tem induzido cientistas no desenvolvimento de novas formas de administração desses quimioterápicos. As nanopartículas poliméricas pH sensíveis, demonstraram uma biocompatibilidade e vetorização eficaz e capaz de evitar que tecidos e células saudáveis

sejam afetadas, com base na liberação da doxorubicina apenas em pH específico (6,6) presente nas células tumorais. Esse comportamento potencializa a atividade antitumoral e minimiza os efeitos adversos, tornando essas nanopartículas uma ferramenta eficaz para o direcionamento de fármacos em células MCF-7.

Diante disso, as NPs contendo polímero na sua constituição e sensíveis ao pH melhoraram a atividade antitumoral *in vitro* da linhagem MCF-7, destacam-se como uma alternativa viável para superar as limitações dos tratamentos tradicionais. Contudo, estudos *in vivo* são indispensáveis para validar a segurança e a eficácia desses sistemas antes de sua aplicação clínica.

## REFERÊNCIAS

1. Organização Pan-Americana da Saúde [Internet]. (OPAS/OMS), 2020. CÂNCER. [acesso em: 8 de março de 2024]. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>.
2. International Agency for Research on Cancer e Global Cancer Observatory [Internet]. (IARC e GCO), 2020. Cancer Today. [acesso em: 8 de março de 2024]. Disponível em: [https://gco.iarc.who.int/today/en/dataviz/tables?mode=population&group\\_populations=0&sexes=2&cancers=20&age\\_start=6&age\\_end=14](https://gco.iarc.who.int/today/en/dataviz/tables?mode=population&group_populations=0&sexes=2&cancers=20&age_start=6&age_end=14).
3. Jonaid Ahmad Malik, Jeba Ajar Ansari, Ahmed S, Khan A, Nafees Ahemad, Anwar S. Nano-drug delivery system: a promising approach against breast cancer. *Therapeutic delivery* [Internet]. 2023 May 1;14(5):357–81. <https://doi.org/10.4155/tde-2023-0020>
4. Instituto Nacional do Câncer [Internet]. (INCA), 2022. Incidência. [acesso em: 10 de março de 2024]. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-de-mama/dados-e-numeros/incidencia>
5. American Cancer Society [Internet]. 2021. Fatores de risco do câncer de mama que você não pode mudar. [acesso em: 10 de outubro de 2024]. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/risk-and-prevention/breast-cancer-risk-factors-you-cannot-change.html>
6. American Cancer Society [Internet]. 2021. Tipos de câncer de mama. [acesso em: 10 de outubro de 2024]. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/about/types-of-breast-cancer.html>
7. Instituto Nacional do Câncer [Internet]. (INCA), 2022. Alterações nas mamas podem ser descobertas pelo autoexame. [acesso em: 10 de março de 2024]. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/noticias/saude-e-vigilancia-sanitaria/2022/10/alteracoes-nas-mamas-podem-ser-descobertas-pelo-autoexame>
8. Barzaman K, Karami J, Zarei Z, Hosseinzadeh A, Kazemi MH, Moradi-Kalbolandi S, et al. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *International Immunopharmacology*

[Internet]. 2020 Jul;84(106535):106535. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106535>.

9. Eras N, Ferah Tuncel, Zuhai Altintas, Sema Erden. Clinicopathological characteristics and BRCA1/BRCA2 pathogenic variants of patients with breast cancer. Polish Journal of Pathology [Internet]. 2024 Jan 1;75(1):1–7. <https://doi.org/10.5114/pjp.2024.135703>

10. Tugce Nur Eralp, Akin Sevinc, Banu Mansuroglu. Combination therapy application of Abemaciclib with Doxorubicin in triple negative breast cancer cell line MDA-MB-231. Cellular and Molecular Biology [Internet]. 2024 Feb 29;70(2):169–77. <https://doi.org/10.14715/cmb/2024.70.2.24>.

11. James. Rang & Dale Farmacologia. 2020.

12. Kong CY, Guo Z, Song P, Zhang X, Yuan YP, Teng T, et al. Underlying the Mechanisms of Doxorubicin-Induced Acute Cardiotoxicity: Oxidative Stress and Cell Death. International Journal of Biological Sciences [Internet]. 2022;18(2):760–70. <https://doi.org/10.7150/ijbs.65258>

13. Liu Z, Lu T, Qian R, Wang Z, Qi R, Zhang Z. Exploiting Nanotechnology for Drug Delivery: Advancing the Anti-Cancer Effects of Autophagy-Modulating Compounds in Traditional Chinese Medicine. International journal of nanomedicine [Internet]. 2024 Mar 1;Volume 19:2507–28. <https://doi.org/10.2147/IJN.S455407>

14. Safarkhani M, Moghaddam SS, Taghavimandi F, Bagherzadeh M, Fatahi Y, Park U, et al. Bioengineered Smart Nanocarriers for Breast Cancer Treatment: Adorned Carbon-Based Nanocomposites with Silver and Palladium Complexes for Efficient Drug Delivery. ACS omega [Internet]. 2024 Jan 9 [citado 2024 Abr 20];9(1):1183–95. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38222665/>

15. Murphy EC, Schaffter SW, Friedman AJ. Nanotechnology for Psoriasis Therapy. Current Dermatology Reports [Internet]. 2019 Jan 30;8(1):14–25. <https://doi.org/10.1007/s13671-019-0248-y>

16. Nogueira-Librelotto DR, Scheeren LE, M. Pilar Vinardell, Montserrat Mitjans, Rolim CMB. Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles functionalized with a pH-responsive amphiphile improved the *in vitro* antineoplastic effects of doxorubicin. Colloids and Surfaces B Biointerfaces [Internet]. 2016 Ago 13;147:326–35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.08.014>

17. AG. Targeting Cancer using Polymeric Nanoparticle mediated Combination Chemotherapy. International Journal of Nanomedicine and Nanosurgery [Internet]. 2016 [citado 2024 Out 10];2(3). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5193385/>

18. CLS Cell Lines Service GmbH [Internet]. Cytion. 2024 [acesso em 23 de 2024]. Disponível em: <https://www.cytion.com/pt/Centro-de-conhecimento/Conhecimentos-sobre-linhas-celulares/Linha-celular-MCF-7-Uma-pedra-angular-na-investigacao-do-cancro-da>

mama-e-no-ensaio-de-medicamentos/

19. Siddharth S, Nayak A, Nayak D, Bindhani BK, Kundu CN. Chitosan-Dextran sulfate coated doxorubicin loaded PLGA-PVA-nanoparticles caused apoptosis in doxorubicin resistance breast cancer cells through induction of DNA damage. *Scientific Reports* [Internet]. 2017 May 19;7 (1) <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02134-z>

20. Cheng X, Li D, Sun M, He L, Zheng Y, Wang X, et al. Co-delivery of DOX and PDTC by pH-sensitive nanoparticles to overcome multidrug resistance in breast cancer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [Internet]. 2019 Sep;181:185–97. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.05.042>

21. Mondal L, Mukherjee B, Das K, Bhattacharya S, Dutta D, Chakraborty S, et al. CD-340 functionalized doxorubicin-loaded nanoparticle induces apoptosis and reduces tumor volume