UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Aplicação tópica de lipossomas contendo cetuximabe: efeito do uso de métodos físicos de penetração cutânea no carcinoma celular escamoso de pele

Raquel Petrilli

Ribeirão Preto
2016

PETRILLI, R.	**Aplicação tópica de lipossomas contendo cetuximabe: efeito do uso de métodos físicos de penetração cutânea no carcinoma celular escamoso de pele**	Espaço de **2,5 cm** reservado para etiqueta de localização da biblioteca	DOUTORADO	FCFRPUSP	2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Aplicação tópica de lipossomas contendo cetuximabe: efeito do uso de métodos físicos de penetração cutânea no carcinoma celular escamoso de pele

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientada: Raquel Petrilli

Orientadora: Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez

Coorientador: Prof. Dr. Robert J. Lee

Ribeirão Preto
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Petrilli, Raquel
Aplicação tópica de lipossomas contendo cetuximabe: efeito do uso de métodos físicos de penetração cutânea no carcinoma celular escamoso de pele. Ribeirão Preto, 2016.
129 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.
Orientador: Lopez, Renata Fonseca Vianna

1. Cetuximabe. 2. Imunolipossomas. 3. Carcinoma celular escamoso.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Raquel Petrilli

Aplicação tópica de lipossomas contendo cetuximabe: efeito do uso de métodos físicos de penetração cutânea no carcinoma celular escamoso de pele

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração:
Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof.Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof.Dr. _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof.Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof.Dr. _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof.Dr. _____

Instituição:_____Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Em primeiro lugar, ao meu irmão Nando (*in memorian)*, que sempre me inspirou a ser forte e batalhar pelos meus sonhos. Infelizmente ele não teve tempo suficiente nesta vida para que pudesse defender seu doutorado, por isso dedico esta tese a ele que sempre batalhou por ser doutor;

À minha mãe Claudete, pelo apoio incondicional e por sempre me incentivar e me mostrar os melhores caminhos para a felicidade e realização;

Ao meu pai, por se esforçar sempre para que pudéssemos nos dedicar aos estudos, sempre incentivando também;

Ao meu marido Josimar, um parceiro de vida e de profissão, muito paciente e amoroso, que sempre me apoia em busca dos meus sonhos

A Deus, por me dar saúde e inspiração nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Claudete pelo apoio nestes anos todos de dedicação. Agradeço imensamente pela paciência e amor que teve e tem por mim, e por me incentivar a sempre prosseguir os estudos em busca dos meus sonhos;

Ao meu pai, Fernando, que sempre batalhou para que tivéssemos tudo em casa e pudéssemos nos dedicar integralmente aos nossos sonhos;

Ao meu marido Josi, por estar sempre presente e apoiar cada passo com palavras de incentivo e amor. Obrigada pela paciência quando eu estive atarefada e por todo o carinho, além das discussões frequentes sobre este trabalho, correções e ajuda experimental constante;

Ao meu irmão Nando (*in memorian)* que me incentivou e sempre foi um modelo de integridade e honestidade. Que esta tese possa de alguma forma homenagear todo seu esforço na tentativa de concluir seu doutorado;

A minha irmã Dani, meus sogros Irani e José, cunhados Juliano e Bruno e meus sobrinhos (as) lindos Yasmin, Ana Lívia, Beatriz e Miguel por admirarem meu trabalho e incentivarem. Agradeço aos meus sobrinhos pelo carinho e amor;

À minha orientadora, Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez, por estar sempre presente nas discussões deste trabalho, por apoiar e confiar no meu trabalho. Agradeço as inúmeras oportunidades que tive em seu laboratório, que certamente acrescentaram muito conhecimento. Obrigada por tudo.

Ao Prof. Dr. Robert J Lee, co-orientador deste trabalho da Ohio State University, pelos conhecimentos compartilhados comigo durante o meu estágio em seu laboratório e por estar sempre presente. Agradeço também as inúmeras oportunidades que me deu;

A todos os colegas de laboratório, no Brasil e no exterior pelo apoio e amizade;

Às funcionárias do laboratório Patrícia Sper e Marina Claro de Souza pela ajuda em alguns experimentos desta tese. Agradeço pela amizade, profissionalismo e paciência, principalmente com aqueles experimentos longos em que necessitei de dias de ajuda.

A funcionária Deise Chesca (FMRP) pela ajuda no preparo de lâminas histológicas e imunohistoquímica;

Ao funcionário Eduardo Tozzatto (FCFRP) pela ajuda nas análises por microscopia confocal;

A funcionária Fabiana (FCFRP) pela ajuda nas análises por citometria de fluxo;

Aos funcionários do biotério da FCFRP pelo cuidado com os animais empregados neste trabalho;

Ao Prof. Dr. Luciano Neder Serafini, da FMRP, por permitir o uso de suas instalações para o preparo das lâminas histológicas;

A Profa. Fernanda Maris Peria pela ajuda científica na elaboração do projeto;

Ao Prof. Dr. Yasuro Sugimoto, da Ohio State University, pelas discussões e ajuda;

Ao James Hospital (Columbus) e Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto pela doação de cetuximabe para a realização deste trabalho;

Ao Dr. Fabiano Saggioro, do HCRP, pela ajuda nas análises histológicas e imunohistoquímicas;

A FAPESP, por apoiar este trabalho com bolsa de doutorado no Brasil e no exterior (Processos n° 2012/23764-3 e 2013/15134-2, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e com projeto de auxílio (Projeto Temático 2014/22451-7).

Ao CNPq pelo apoio financeiro (Proc. 480962/2013-8).

RESUMO

PETRILLI, R. **Aplicação tópica de lipossomas contendo cetuximabe: efeito do uso de métodos físicos de penetração cutânea no carcinoma celular escamoso de pele.** 2016. 129f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O carcinoma de células escamosas (SCC) é um tumor maligno de origem epitelial no qual o receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR) está superexpresso e associado a malignização. O cetuximabe é um anticorpo monoclonal, capaz de se ligar seletivamente ao EGFR. A combinação de cetuximabe com o quimioterápico hidrofílico 5-fluorouracil (5-FU) é utilizada na clínica pela via intravenosa e é associada a efeitos colaterais. A administração tópica de 5-FU também é realizada a partir de cremes convencionais, porém sua eficácia é limitada a doenças pré-cancerosas e o carcinoma basocelular. Estima-se que a conjugação do cetuximabe à superfície de lipossomas, os quais podem ser administrados na pele em associação a um método físico, como a iontoforese, seja capaz de direcionar a liberação do 5-FU para as camadas da pele onde os tumores estão presentes, além de aumentar o *uptake* celular em linhagem EGFR positiva, viabilizando o tratamento tópico de SCC. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência do cetuximabe conjugado a um lipossoma (imunolipossoma) na penetração cutânea passiva e iontoforética do 5-FU e na regressão do SCC. Para tanto, um método analítico e um método bioanalítico foram desenvolvidos e validados para quantificação de 5-FU. Lipossomas convencionais foram preparados a partir de diferentes composições lipídicas, métodos de preparo e razão fármaco/lipídeo para selecionar aqueles que encapsulassem maior porcentagem de 5-FU. Lipossomas compostos por 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina e colesterol (DSPC:Chol, 55:45), preparados por hidratação do filme lipídico, na razão fármaco/ lipídeo 0,1, de aproximadamente 140 nm, foram escolhidos por encapsularem cerca de 50% de 5-FU. Para obtenção dos imunolipossomas, o cetuximabe foi primeiramente conjugado ao lipídeo DSPE acoplado ao ligante maleimida(polietilenoglicol)-2000 (DSPE-PEG-Mal), resultando em 94% de eficiência de conjugação. Os imunolipossomas foram então obtidos da mesma forma que os lipossomas e apresentaram tamanho e porcentagem de encapsulação do 5-FU semelhante a apresentada pelos lipossomas. Estudo *in vitro* em linhagem EGFR positiva (A431) mostrou sinergismo entre 5-FU e imunolipossoma, resultando em valores de IC50 cerca de 3 vezes menores do que o apresentado pelo 5-FU em solução. O *uptake* celular do imunolipossoma foi 3,5 vezes maior do que o do lipossoma. Nos estudos de penetração cutânea *in vitro* observou-se que, em relação a uma solução de 5-FU, lipossomas e imunolipossomas diminuíram a quantidade de 5-FU que atravessou a pele. A iontoforese aumentou a penetração do 5-FU a partir de todas as formulações. Neste caso, o acúmulo de 5-FU na epiderme viável, onde os tumores estão presentes, foi duas vezes maior quando este estava encapsulado no imunolipossoma em relação ao lipossoma. *In vivo*, as formulações foram administradas por via subcutânea ou tópica usando iontoforese em modelo xenográfico de SCC. O tratamento com os imunolipossomas diminuiu o crescimento tumoral em mais de 60% em relação ao controle e em torno de 50% em relação aos tratamentos com solução e lipossoma de 5-FU. A administração tópica por iontoforese apresentou maior redução tumoral do que a subcutânea quando os tumores foram tratados com solução de 5-FU e lipossomas, mas foi igualmente eficaz para os imunolipossomas. Análise imunohistológica revelou que o potencial de proliferação celular foi reduzido para os grupos tratados. Desta forma, a administração por iontoforese de imunolipossomas contendo 5-FU é uma estratégia promissora para o tratamento tópico de SCC.

Palavras-chave: lipossoma, imunolipossoma, cetuximabe, 5-fluorouracil, câncer de pele, carcinoma celular escamoso.

ABSTRACT

PETRILLI, R. **Topical application of liposomes containing cetuximab: effect of physical methods for skin penetration in skin squamous cell carcinoma**. 2016. 129f Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Squamous cell carcinoma (SCC) is a malignant tumor of epithelial origin in which the epidermal growth factor receptor (EGFR) is overexpressed and associated with malignization. Cetuximab is a monoclonal antibody, able to selectively bind EGFR. The combination of the chemotherapy with the hydrophilic drug 5-fluorouracil (5-FU) and cetuximab is applied in the clinic by intravenous injection and is associated with side effects. Cetuximab conjugation onto liposomal surface, which can be administered topically onto the skin using physical methods, such as iontophoresis, is able to direct 5-FU release to the skin layers where tumors are localized and to increase cellular uptake in EGFR positive cells, making possible the topical treatment of SCC. Thus, the objective of this work was to investigate the influence of cetuximab conjugation to liposomes (immunoliposomes) in the passive and iontophoresis skin penetration of 5-FU and SCC regression. For this purpose, an analytical and a bioanalytical method were developed and validated for 5-FU quantification. Then, conventional liposomes were prepared using different lipid compositions, preparation methods and drug to lipid ratios in order to select those able to load higher percentages of 5-FU. Liposomes composed by 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine and cholesterol (DSPC:Chol, 55:45) prepared by the thin lipid film hydration with drug/lipid ratio 0.1 with approximately 140 nm, were chosen because they encapsulated about 50% of 5-FU. For the obtainment of immunoliposomes, cetuximab was first coupled to the lipid DSPE linked to maleimide (polyethylene glycol)-2000 (DSPE-PEG-Mal) as an anchor for the antibody conjugation, resulting in 94% coupling efficiency. The immunoliposomes were obtained similarly to liposomes, with similar particle size and loading efficiency of 5-FU. *In vitro* studies using EGFR positive cells (A431) showed synergism for 5-FU and cetuximab, resulting in IC50 values about 3 times lower than 5-FU solution. Cellular uptake of immunoliposomes increased 3.5-fold compared to the liposomes. *In vitro* skin penetration studies revealed that, compared to the 5-FU solution, liposomes and immunoliposomes reduced the amount of 5-FU that passed through the skin. Iontophoresis increased the amount of 5-FU retained in viable epidermis for all formulations. In this case, the amount of 5-FU in viable epidermis, where tumors are localized, was 2 times higher when it was encapsulated in immunoliposomes compared to liposomes. *In vivo,* the formulations were administered subcutaneously or topically with iontophoresis in xenograft animal model of SCC. Treatment with immunoliposomes reduced tumor growth more than 60% compared to the negative control and about 50% compared to the treatments with 5-FU solution and liposomes. The topical administration using iontophoresis resulted in improved tumor reduction compared to the subcutaneous administration when tumors were treated with 5-FU solution and liposomes, but was equally effective for the immunoliposomes. The histological analysis showed the reduction of cellular proliferation for the treated groups. In conclusion, the administration of immunoliposomes containing 5-FU using iontophoresis is a promising strategy for the topical treatment of SCC.

Keywords: liposome, immunoliposome, cetuximab, 5-fluorouracil, skin cancer, squamous cell carcinoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. EGFR transmite sinais de sobrevivência e proliferação celular através de diferentes vias de sinalização (Adaptado de RATUSHNY *et. al.*, 2009). 06

Figura 2. Ilustração esquemática da estrutura do anticorpo quimérico cetuximabe, mostrando a região variável e a constante (Adaptado de https://www.neb.com, acesso em novembro/2016). 07

Figura 3. Estrutura do 5-fluorouracil. 09

Figura 4. Pele e suas camadas. A) Representação esquemática dos componentes do estrato córneo (Adaptado de HARDING, 2004) e B) camadas da pele (Adaptado de BEAR et al.,2002) 11

Figura 5. Esquema ilustrativo da acumulação de lipossomas e moléculas pequenas em tecidos normais e tumorais (efeito EPR) (Adaptado de MILLA et al, 2012). 13

Figura 6. Lipossomas. A) Lipossoma convencional. B) Lipossoma funcionalizado com anticorpo – imunolipossoma. C) Representação do *uptake* de imunolipossomas por células que contém receptores para o anticorpo (Adaptado de ELOY et al., 2014). 15

Figura 7. Representação esquemática de imunolipossomas. A figura mostra diferentes modos de conjugação do anticorpo ao lipossoma: no Tipo A o anticorpo é diretamente conjugado ao lipossoma, enquanto que no Tipo B o anticorpo é conjugado ao lipossoma usando um espaçador flexível (Adaptado de IYER et al., 2011). 15

Figura 8. Figura esquemática de um aparato para iontoforese com sistema de eletrodos Ag/AgCl. O ânodo possui um fármaco ionizável D^+ e seu contra íon A^- (GRATIERI et al., 2008). Para facilitar a passagem da corrente elétrica e as reações eletroquímicas, o sal Na^+Cl^- está presente nos dois compartimentos. 18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-fluorouracil
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	*American Type Culture Collection*
BCA	Ácido bicinconínico
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Col	Colesterol
CV	Coeficiente de variação
Dio	3,3′-Dioctadeciloxacarbocianina perclorato
DLS	Espalhamento dinâmico da luz
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
DPPC	1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DSPC	1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina
DSPE-PEG-2000	1,2-distearol-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenoglicol)-2000]
DSPE-PEG-Mal	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N[maleimida(polietileno glicol)-2000] (sal de amônio)
DSPE-PEG-NH_2	1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenenoglycol)-2000] (sal de amônio)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	Eficiência de encapsulação
EGFR	Receptor de fator de crescimento epidermal
EPR	Efeito permeabilidade e retenção aumentada
FBS	Soro bovino fetal
FDA	*Food and Drug Administration*
IC50	*Half maximum inhibitory concentration*
ICH	*International Conference on Harmonisation*
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
Mal	Maleimida

MTT	Brometo de (4,5-dimetilltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
PBS	Tampão fosfato
PEG	Polietilenoglicol
PEI	Polietilenimina
SCC	Carcinoma de células escamosas
SD	Desvio padrão
SDS-Page	Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
SPC	Fosfatidilcolina de óleo de soja
TBS	*Tris-buffered saline*
TEM	Microscopia eletrônica de trasmissão
Tr	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista de figuras iii
Lista de abreviaturas e siglas iv

1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO DE LITERATURA 4
2.1 Carcinoma de células escamosas..... 5
2.2 Tratamento 6
2.3 Vias de administração 9
2.4 Sistemas de Liberação 12
2.5 Métodos físicos de promoção da penetração cutânea de fármacos 17

6. CONCLUSÕES 20

7. REFERÊNCIAS..... 22

1. INTRODUÇÃO

O câncer de pele é a forma mais comum de todos os tumores. Destes, o carcinoma celular escamoso (SCC) ocupa a segunda posição em frequência e é biologicamente mais agressivo do que o carcinoma basocelular visto que em cerca de 12% dos casos ocorre metástase, especialmente para os linfonodos (URIBE, GONZALEZ 2011; ALAM, RATNER, 2001). De acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2016) estima-se que o câncer da pele do tipo não melanoma é o mais frequente no Brasil, correspondendo a 30% dos casos de tumores não malignos. Sendo assim, cerca de 175 mil novos casos são esperados para 2016.

A primeira escolha de tratamento do SCC é a cirurgia, seguida ou em associação à quimioterapia sistêmica. Considerando-se que o principal objetivo na cirurgia é a retirada completa do tumor e a manutenção da vida do paciente, nem sempre resultados adequados são alcançados do ponto de vista cosmético, visto que cicatrizes e áreas completas da face, por exemplo, podem ser perdidas. Outro aspecto a ser considerado é a necessidade de quimioterapia quando metástase é observada, principalmente no tratamento de pacientes idosos que possuem, muitas vezes, função renal e hepática prejudicadas (STRATIGOS et al., 2015). Sendo assim, sistemas de liberação capazes de direcionar a liberação dos fármacos e reduzir a exposição sistêmica são promissores

O tratamento de cânceres de pele pela via tópica é uma possibilidade, inclusive na clínica, na qual muitas vezes a terapia fotodinâmica com creme de ácido 5-aminolevulínico ou cremes convencionais de 5-FU são utilizados, principalmente para o tratamento de tumores cutâneos menos agressivos como o carcinoma basocelular. Estudos são necessários para uma maior utilização da via tópica para o tratamento de tumores mais agressivos como o SCC.

Neste trabalho, o objetivo principal é desenvolver um sistema de liberação capaz de veicular topicamente um quimioterápico convencional, o 5-fluorouracil (5-FU), que seja seletivo para as células de SCC, as quais possuem superexpressão do fator de crescimento epidermal (EGFR). Para tanto, o anticorpo monoclonal anti-EGFR, cetuximabe, será ligado covalentemente à superfície de lipossomas contendo 5-FU, gerando imunolipossomas. Devido à alta hidroficilidade e irritação cutânea do 5-FU, no entanto, ele não é capaz de penetrar, em concentrações adequadas, através do estrato córneo que compõe a superfície do SCC. Desta forma, ele carece de um carreador, como o lipossoma, para atravessar o estrato córneo e atingir as células tumorais. A ligação do cetuximabe ao sistema de liberação deve aumentar a captura

(*uptake*) dos lipossomas pelas células tumorais EGFR positivas, possibilitando uma maior concentração intratumoral do quimioterápico. Como o SCC cutâneo apresenta-se normalmente hiperqueratinizado, a associação de um método físico à dispersão de imunolipossoma para aumentar e direcionar a penetração cutânea do sistema de liberação para as células tumorais será também avaliado. A iontoforese é um método físico que se baseia no transporte de fármacos carregados ou não na/através da pele usando corrente elétrica de baixa intensidade, favorecendo a veiculação de fármacos encapsulados ou não principalmente através dos apêndices cutâneos. Desta forma, espera-se que este trabalho possa contribuir para a aplicação futura do tratamento tópico de SCC empregando sistemas de liberação e métodos físicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma de células escamosas

O SCC é um tumor maligno de origem epitelial, derivado principalmente de células escamosas. Como essas células representam a principal parte da epiderme, o SCC é a segunda forma mais frequente de tumores de pele não-melanoma, ficando atrás apenas do carcinoma basocelular. Este tipo de neoplasia responde por 20% das neoplasias malignas cutâneas (JOHNSON *et. al.*, 1992; SALEHI *et. al.*, 2007), e por 90% de todos os cânceres de cabeça e pescoço.

Sabe-se que a exposição à luz ultravioleta tem um papel importante como iniciador e promotor da carcinogênese, sendo que a incidência aumenta em pacientes imunocomprometidos, especialmente aqueles que apresentem concomitantemente a infecção do papiloma vírus. A radiação ultravioleta produz mutações no DNA que são usualmente reparadas pela formação de dímeros de timidina pelo gene supressor de tumor p53, cuja falha no mecanismo de reparo é capaz de resultar na formação de tumor. Outras doenças também geram predisposição ao desenvolvimento do SCC, tais como xeroderma pigmentoso, epidermólise bolhosa recessiva e disqueratose congênita (URIBE, GONZALEZ 2011).

Até o momento não se sabe o número exato de alterações genéticas ou epigenéticas necessárias para a malignização do SCC. Um dos modelos propõe que clones epidérmicos com p53 mutados sejam precursores da displasia escamosa, gerando SCC *in situ*, infiltração e culminando com a metástase. Assim como no melanoma, o SCC apresenta alterações na via de sinalização MAPK Erk, além de mutações em k-RAS (URIBE, GONZALEZ 2011). Ademais, o receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR) está associado ao prognóstico ruim e os tumores que o apresentam são mais agressivos (NUÑO-GONZÁLEZ *et. al.*, 2012).

O EGFR é um dos quatro membros da família ErbB-HER de receptores de fatores de crescimento transmembrana de tirosinas quinase. O reconhecimento dos ligantes extracelulares naturalmente presentes pelo domínio III do EGFR promove mudanças conformacionais que permitem a homodimerização com outro EGFR ou heterodimerização com outro membro da família HER. A formação dos dímeros e multímeros promove a autofosforilação da tirosina do domínio intracelular do EGFR, o que aumenta o acesso ao ATP e substrato e cria sítios de ligação para moléculas sinalizadoras, servindo como locais de ligação para a união de várias moléculas associadas a múltiplas vias de transdução mitogênicas, antiapoptóticas, angiogênicas

e pró-invasivas (RATUSHNY *et. al.*, 2009; URIBE, GONZALEZ 2011). No câncer, a atividade de EGFR está aumentada como resultado da hiper-regulação, amplificação, mutação ou expressão aumentada de ligantes e cofatores, gerando o efeito maligno dos cânceres, conforme ilustrado esquematicamente na Figura 1 (RATUSHNY *et. al.*, 2009).

Recentemente foi demonstrada a superexpressão de EGFR em SCC cutâneo de cabeça e pescoço com metástases locais, comparado aos casos cutâneos não metastáticos. Ch´ng e colaboradores (CH´NG *et. al.*, 2008) utilizaram imuno-histoquímica e hibridização fluorescente *in situ* para avaliar a expressão de EGFR em 3 grupos de lesões: lesões primárias sem metástase (P), lesões primárias com metástase (PM) e doença metastática (M). Os resultados indicaram superexpressão do EGFR para 36% dos casos de P, 79% dos casos de PM e 47% dos casos de M, revelando a importância deste receptor no prognóstico e tratamento deste tipo de carcinoma.

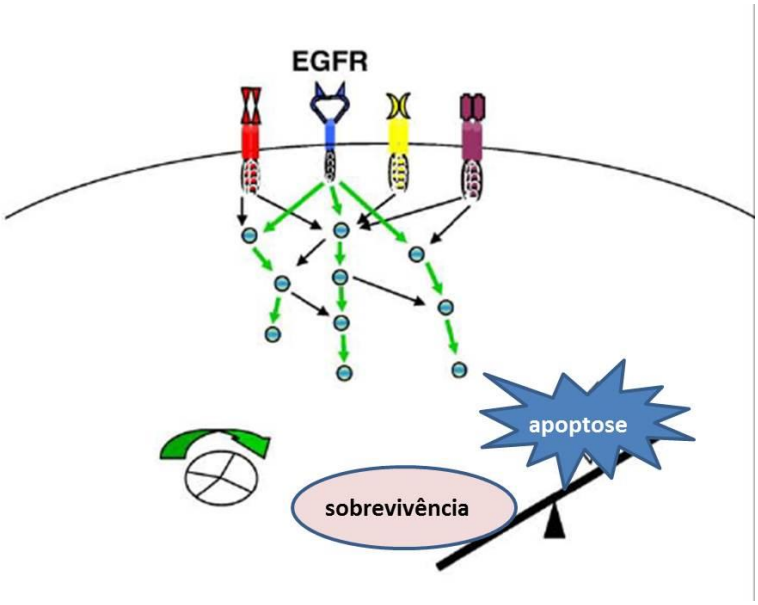

Figura 1. EGFR transmite sinais de sobrevivência e proliferação celular através de diferentes vias de sinalização (Adaptado de RATUSHNY et. al., 2009).

2.2 Tratamento

O tratamento convencional do SCC de pele é geralmente realizado através de cirurgias e/ou radioterapia, esta geralmente utilizada em casos onde a cirurgia não é possível ou em pacientes idosos. É necessário o acompanhamento do paciente a

cada 4 ou 6 meses, no entanto, há sempre a possibilidade do desenvolvimento regional ou distante de metástases (MAUBEC *et. al.*, 2005; NUÑO-GONZÁLEZ *et. al.*, 2012). O uso de cirurgia, eletrodissecação, curetagem ou criocirurgia são preferenciais para SCC de baixo risco. Para os casos mais avançados, é indicado o uso de quimioterápicos sistêmicos, como 5-fluorouracil (5-FU), cisplatina, bleomicina e doxorrubicina, imunoterápicos, como interferon, e agentes para alvos moleculares, como cetuximabe, gefitinibe e erlotinibe (CRANMER *et. al.*, 2010).

O cetuximabe (Figura 2) é indicado pelo FDA como primeira linha para o tratamento de SCC recorrente ou metastático de cabeça e pescoço. Ele é um anticorpo IgG1 recombinante quimérico que inibe competitivamente o fator EGFR através de ligação altamente específica, bloqueando a fosforilação induzida por outros ligantes (CUNNINGHAM 2004; BONNER *et. al.*, 2006; BAUMAN *et. al.*, 2007). Sua aplicação pode ser observada em diversos relatos na literatura (BAUMAN *et. al.,* 2007; SUE *et. al.,* 2007; GIACCHERO *et. al.,* 2011) e em pelo menos 74 ensaios clínicos em andamento (Clinical Trials, 2016). Contudo a administração intravenosa é a utilizada na clínica e nos estudos citados, o que implica na administração de altas concentrações relativas e em efeitos colaterais gerais.

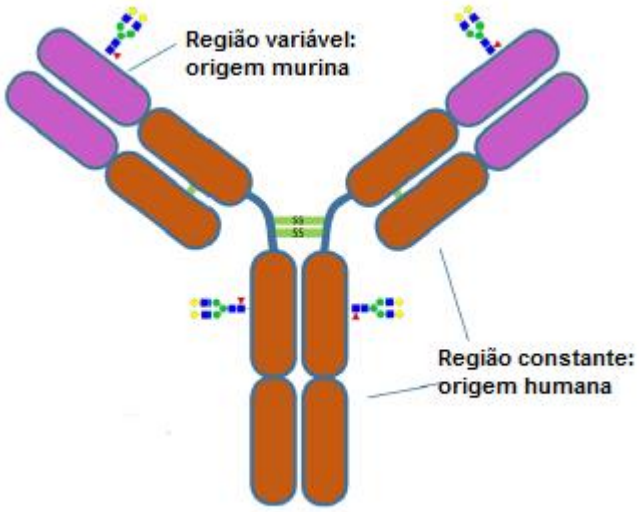

Figura 2. Ilustração esquemática da estrutura do anticorpo quimérico cetuximabe, mostrando a região variável e a constante (Adaptado de https://www.neb.com, acesso em novembro/2016).

Comparado aos quimioterápicos convencionais, o cetuximabe é bem tolerado. A maioria dos efeitos adversos por ele causados são reações cutâneas, incluindo

erupções acneiformes (em 50 a 100% dos pacientes), xerose, paroníquia, alterações nos cabelos, telangectasias (quando vasos capilares ficam visíveis abaixo da pele) e hiperpigmentação (KALAPURAKAL *et. al.,* 2012). Acredita-se que os efeitos adversos na pele estejam relacionados ao papel fisiológico do EGFR na epiderme. Salienta-se, no entanto, que o cetuximabe, como outros quimioterápicos/imunoterápicos, são administrados por via endovenosa. Os efeitos colaterais gerados são, portanto, generalizados, não se restringindo ao local onde o tumor se encontra. A combinação de cetuximabe e 5-FU, cisplatina ou carboplatina demonstrou relação custo-benefício aceitável devido ao aumento do tempo de sobrevida e ausência de toxicidade adicional (VERMOKEN et al., 2008; MESÍA et al., 2010; COHEN et al., 2013).

O tratamento do SCC em estágio avançado é normalmente realizado com o cetuximabe em combinação com quimioterápicos convencionais, como com o 5-FU, a cisplatina ou a carboplatina. Essas associações demonstraram relação custo-benefício aceitável devido ao aumento do tempo de sobrevida do paciente e ausência de toxicidade adicional (VERMOKEN et al., 2008; MESÍA et al., 2010; COHEN et al., 2013).

O 5-FU (Figura 3) é um antineoplásico análogo da pirimidina, capaz de interferir tanto na síntese do DNA como do RNA, pois bloqueia a metilação do ácido deoxiuridílico em ácido timidílico. O 5-FU foi desenvolvido em 1957 e tem sido usado para o tratamento de diversos tipos de cânceres, tais como mama, intestino, próstata, gastrointestinal, vaginal, cervical e pele. Geralmente é utilizado pela via intravenosa, mas alguns estudos têm demonstrado sua eficácia para o tratamento intralesional (GROVES et al., 2017; METTERLE et al., 2015). Está disponível também comercialmente na forma de cremes para a aplicação tópica, tais como Efurix® 5% (Valeant Pharmaceuticals, Int., Costa Mesa, CA), Fluoroplex® 1% (Allergan, Inc., Irvine, CA) e Carac® 0,5% (Dermik Laboratories, Berwyn, PA). É indicado para o tratamento de queratose actínica e carcinoma basocelular (MCGILLIS et al, 2004), mas também tem demonstrado sucesso para o tratamento do SCC (MORSE et al., 2003; PETRILLI et al., 2016).

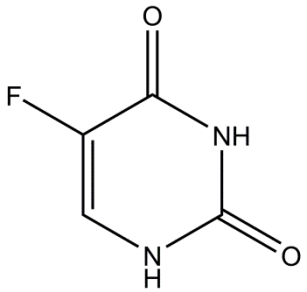

Figura 3. Estrutura do 5-fluorouracil.

Diversos trabalhos demonstraram que o uso combinado de 5-FU e cetuximabe é vantajoso para o tratamento do SCC, associado ou não a outros fármacos, tais como docetaxel, cisplatina, carboplatina e bleomicina, seguido ou não de radioterapia (BUIRET et al., 2010; COHEN et al., 2013; KEIL et al., 2013; CRANMER et al., 2010). Em 2011, o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso de cetuximabe em combinação com cisplatina ou carboplatina e 5-FU como primeira linha de tratamento em pacientes com SCC recorrente locoregional ou mestatástico de cabeça e pescoço. A aprovação foi baseada em um estudo randomizado com 442 pacientes, que utilizou a administração de cisplatina (100 mg/m², intravenoso), carboplatina (área sob a curva 5, intravenoso) no primeiro dia de tratamento e 5-FU (1000 mg/m²/dia, infusão intravenosa contínua do 1º ao 4º dia de tratamento). O cetuximabe foi administrado na dose de 400 mg/m² inicialmente, seguido da dose de 250 mg/m²/semana. Neste estudo, foi verificado melhora na sobrevivência dos pacientes tratados com cetuximabe, com tempo de sobrevida média de 10,1 a 7,4 meses. O tempo de sobrevida sem recorrência da doença também foi melhorado para o grupo tratado com cetuximabe (COHEN et al., 2013). Neste estudo foi feito o uso intravenoso dos fármacos livres, sem o uso de sistemas de liberação, resultando em efeitos adversos tais como náusea, vômitos, neutropenia, exantema, diarreia, conjuntivite, além de reações adversas a infusão, tais como hipomagnesemia, hipocalcemia e hipocalemia.

2.3 Vias de administração

O transporte de fármacos e o direcionamento destes para tumores sólidos é um assunto de interesse na tecnologia farmacêutica. A veiculação inadequada de um fármaco pode resultar em crescimento tumoral devido a células residuais e a possibilidade de desenvolvimento de células resistentes ao tratamento (SHENOY et al., 2005; FASEHEE et al., 2016).

A rota de administração também é muito importante quando sistemas de liberação de fármacos são utilizados (FASEHEE et al., 2016). Em um estudo realizado por Wiklander e colaboradores (WIKILANDER et al., 2015), por exemplo, vesículas extracelulares foram avaliadas quanto à sua biodistribuição após serem injetadas em camundongos pela via intravenosa, intraperitoneal e subcutânea. Os autores observaram diferentes perfis de distribuição, sendo que as vias intraperitoneal e subcutânea resultaram em menor acúmulo no fígado e rins, mas maior acúmulo no pâncreas e trato gastrointestinal.

A administração subcutânea de biomacromoléculas é mais segura e conveniente que a administração intravenosa (STONER et al., 2014; LIU et al., 2016). Por outro lado, espera-se uma redução na biodisponibilidade, principalmente quando se tem a administração de macromoléculas, visto que o fármaco precisa atravessar a complexa barreira tridimensional de matriz extracelular da derme, capilares e vasos linfáticos para atingir tumores de pele ou para alcançar os capilares e vasos linfáticos para atingir a circulação sistêmica (LIU et al., 2016).

A administração tópica, localizada, para o tratamento de SCC, principalmente os de pele, é uma alternativa promissora para diminuir efeitos adversos causados pela quimioterapia sistêmica. No entanto, os SCCs localizam-se nas camadas profundas da pele. Para um tratamento tópico efetivo é necessário que o quimioterápico chegue até essas camadas em altas concentrações, o que representa uma tarefa bastante complexa. Isto porque a função primordial da pele é a proteção contra agentes físicos, químicos, imunológicos, patógenos, radiação UV, dentre outros. A pele representa, portanto, uma barreira e também, em certos casos, uma oportunidade para a passagem de fármacos devido a sua extensa superfície (MENON, 2002).

O estrato córneo é camada mais externa da epiderme e o principal responsável pela função barreira da pele, sendo composto de corneócitos, que são queratinócitos completamente diferenciados, e pelos conteúdos secretados pelos corpos lamelares (Figura 4). O arranjo espacial desta camada ocasiona a formação de um caminho tortuoso, pelo qual as substâncias necessitam atravessar para chegar as camadas viáveis da pele, o que limita a permeabilidade cutânea (MENON, 2002; HARDING, 2004).

O estrato córneo mantém o conteúdo de água no organismo mesmo em condições climáticas variáveis, bem como limita a absorção de substâncias tóxicas do ambiente o que, consequentemente, dificulta a entrada de fármacos na pele. Esses

precisam, portanto, ter características físico-químicas adequadas para difundir através do estrato córneo e chegar, em concentrações terapêuticas, nas camadas da pele onde os tumores se encontram. Como o estrato córneo é uma barreira complexa, heterogênea, formada por regiões hidro e lipofílicas, para atravessá-lo o fármaco precisa ter, além de outras características, coeficiente de partilha óleo/água adequado (logKo/a de aproximadamente 2) e massa molecular baixa (GRATIERI *et al.*, 2012a).

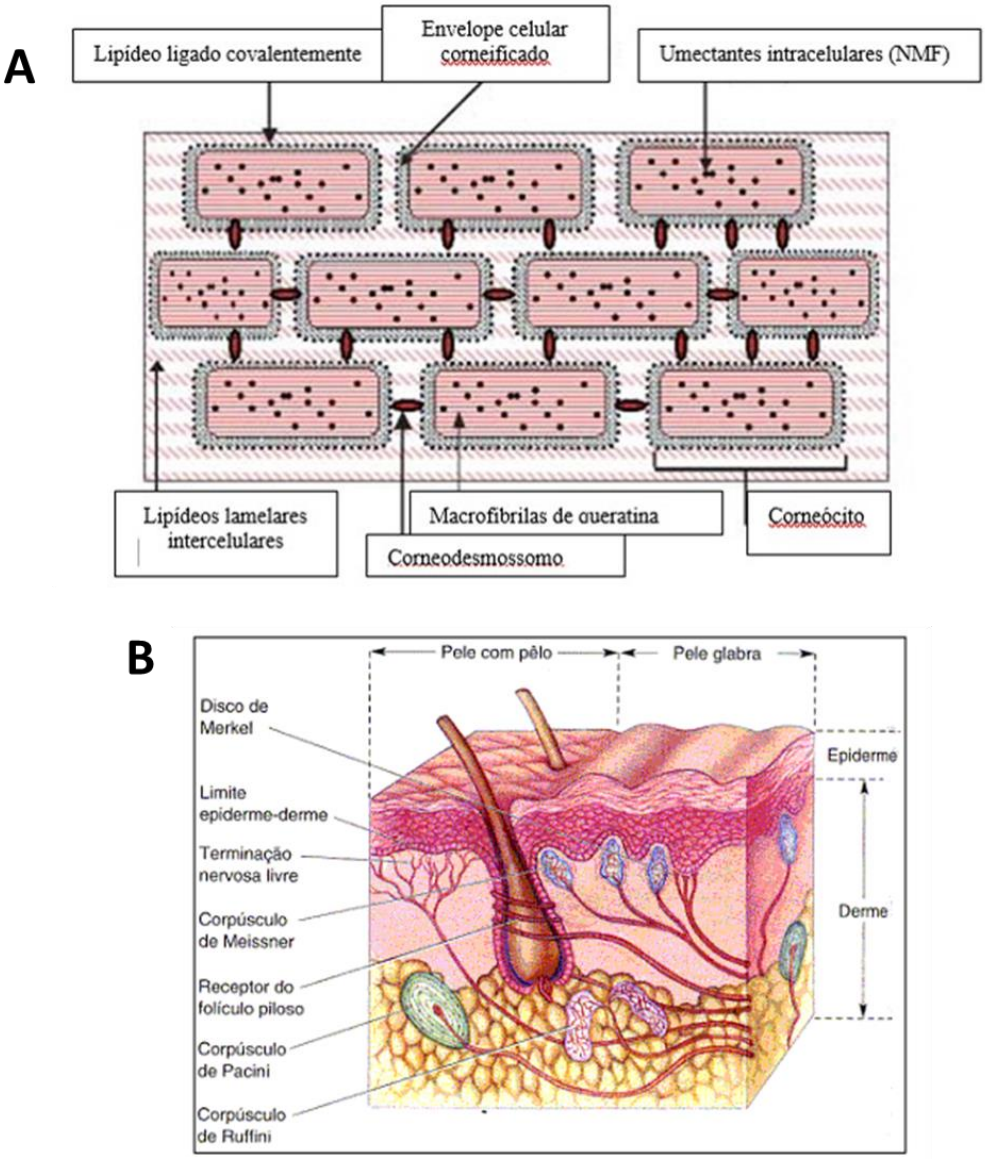

Figura 4: Pele e suas camadas. A) Representação esquemática dos componentes do estrato córneo (Adaptado de HARDING, 2004) e B) camadas da pele (Adaptado de BEAR et al.,2002)

O cetuximabe (fórmula molecular $C_{6484}H_{10042}N_{1732}O_{2023}S_{36}$), se administrado topicamente, deve difundir através do estrato córneo, onde não existe EGFR com os

quais o cetuximabe possa interagir, e alcançar as células tumorais (GUSTERSON & HUNTER, 2009). No entanto, além do mesmo ser uma macromolécula (MM = 145781,6 g/mol), é hidrossolúvel e pode sofrer degradação ou mudanças conformacionais quando em contato com o estrato córneo ou tecidos subcutâneos. Para a sua administração efetiva, sistemas de liberação, como os lipossomas/imunolipossomas, são necessários para mascarar suas características físico-químicas e proteger o fármaco contra a degradação, assim como métodos físicos, como a iontoforese e o ultrassom, são necessários para "forçar" a penetração do fármaco em altas concentrações e para o interstício tumoral.

O uso tópico de 5-FU para o tratamento de queratose actínica, por exemplo, vêm sendo realizado desde 1970, quando este foi aprovado para uso dermatológico pelo FDA. Porém, reações como dermatite erosiva, dor, prurido, hipopigmentação e hiperpigmentação, principalmente quando usa-se oclusão e resultam em baixa adesão ao tratamento (LOYAL et al., 2016; WESCHLER et al., 2008). Outro aspecto a ser considerado é a elevada hidrofilicidade da molécula, que limita sua penetração através do estrato córneo lipofílico. Sendo assim, sistemas de liberação vêm sendo estudados como alternativas promissoras para a veiculação de 5-FU (CHINEMBIRI et al., 2015).

2.4 Sistemas de liberação

A administração tópica de quimioterápicos ainda é pouco explorada, mas vem mostrando sua potencialidade principalmente para o tratamento de tumores cutâneos associados à terapia fotodinâmica (LOPEZ *et. al.*, 2004; OH *et. al.*, 2011; ROCHA *et. al.*, 2012; BOLFARINI *et. al.*, 2012; LEMOS et al., 2016), antimicrobianos (GAO et al., 2014; PEREZ et al., 2016; JORAHOLMEN et al., 2015) e antitumorais (COSCO et al., 2015; HUBER et al., 2015; PETRILLI et al., 2016). Três estratégias podem ser empregadas para facilitar a penetração de quimioterápicos na pele: a primeira delas é o desenvolvimento de novas moléculas, mais específicas e seguras, sendo este o caminho mais lento e caro (LI & WALLACE, 2008). A segunda estratégia envolve o desenvolvimento de sistemas nanocarreadores, uma alternativa que vem sendo explorada devido ao menor custo e tempo requeridos (KARATHANASIS, 2008). E a terceira estratégia envolve a aplicação de métodos físicos, como a iontoforese e o ultrassom para forçar a penetração de altas concentrações de quimioterápicos no

tumor (GRATIERI *et al.*, 2008, TAVEIRA *et al.*, 2009; OGURA; PALIWAL; MITRAGOTRI, 2008).

Neste contexto, os nanocarreadores são sistemas nanométricos coloidais capazes de encapsular ou de se ligar a moléculas quimioterápicas, sejam elas moléculas pequenas, como o 5-FU, ou macromoléculas, como o cetuximabe. Nanocarreadores, tais como nanopartículas poliméricas e lipossomas, são capazes de proteger fármacos contra degradação, sustentar sua liberação, aumentar a adesão do paciente ao tratamento por reduzir a frequência de administração e os efeitos adversos. Estes, por sua vez, são reduzidos devido a acumulação melhorada dos quimioterápicos nas células tumorais, evitando os tecidos normais. Desta forma, altas concentrações do fármaco carreado pelo sistema de liberação são atingidas nos tumores, com reduzida toxicidade sistêmica se comparados à administração de fármacos livres (não encapsulados nos nanocarreadores) (PEREZ-HERRERO & FERNANDEZ-MENARDES, 2015).

O acúmulo preferencial de nanocarreadores no tecido tumoral se deve a um dos fenômenos mais descritos do microambiente tumoral, o “efeito permeabilidade e retenção aumentada” (EPR) (Figura 5). O EPR descreve o transporte facilitado de macromoléculas pelo interstício tumoral devido a vasculatura frouxa e mais permeável dos tumores (IVEY et al., 2016; ELOY et al., 2014). Sendo assim, macromoléculas maiores que 40 kDa são capazes de extravasar seletivamente dos vasos sanguíneos tumorais e se acumular nos tecidos tumorais, efeito este que não ocorre nos tecidos normais (MATSUMURA & MAEDA, 1986; MAEDA, 2001).

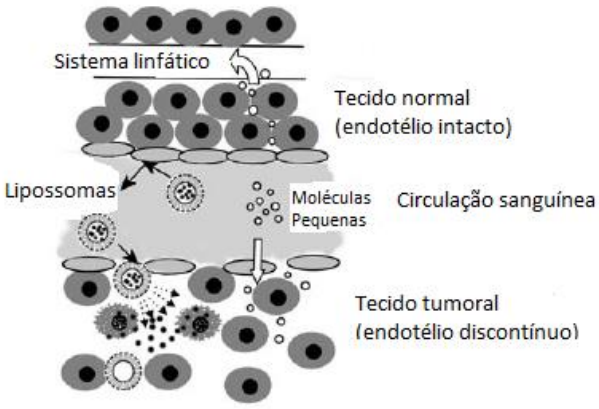

Figura 5: Esquema ilustrativo da acumulação de lipossomas e de moléculas pequenas em tecidos normal e tumoral (efeito EPR) (Adaptado de MILLA et al, 2012).

Lipossomas são nanocarreadores atóxicos, biodegradáveis e passíveis de preparação em larga escala. Com a forma de vesículas, são compostos por uma ou mais bicamadas lipídicas arranjadas concentricamente a um compartimento aquoso (Figura 6). Nesses sistemas de liberação, os fármacos podem ser encapsulados no compartimento aquoso ou intercalados na bicamada lipídica, permitindo assim a incorporação de moléculas hidrofílicas e lipofílicas (EGBARIA, WEINER 1990).

Um exemplo clássico da melhora do tratamento de tumores com lipossomas está na administração endovenosa de lipossomas de doxorrubicina (DOX). Os lipossomas de DOX foram os primeiros sistemas de liberação nanoparticulados aprovados pelo FDA. O Doxil® é o medicamento referência e está no mercado desde 1995 (BARENHOLZ, 2012).

Além de serem sistemas de liberação de uso consagrado na literatura e no mercado, lipossomas são sistemas interessantes para veiculação de fármacos hidrofílicos como o 5-FU. Apesar de fármacos hidrofílicos serem facilmente dissolvidos na fase aquosa durante o preparo dos lipossomas, são necessárias diversas estratégias, dentre elas o uso de lipídeos adequados e métodos de preparo otimizados com o intuito de melhorar a encapsulação destes fármacos, bem como evitar o extravasamento durante a estocagem (ELOY et al., 2014).

A superfície dos lipossomas pode ser facilmente modificada para aumentar seu tempo de circulação sistêmica ou para direcioná-los para células específicas. Por exemplo, a incorporação de polietilenoglicol (PEG) à bicamada lipídica, estratégia conhecida como peguilação, dificulta o reconhecimento das vesículas pelo sistema mononuclear fagocitário, aumentando o tempo de circulação do sistema de liberação (GABIZON et al., 1994; VIJAYAKUMAR et al., 2016). A peguilação evita ainda a agregação das vesículas, protege os lipossomas da degradação por proteínas plasmáticas e evita a liberação prematura do fármaco. Além disso, é capaz de reduzir a adsorção de opsoninas. Sendo assim, lipossomas com maior tempo de circulação podem se acumular mais facilmente na área do tumor pelo efeito EPR (MILLA et al., 2012).

A superfície dos lipossomas também pode ser funcionalizada com anticorpos, polissacarídeos, transferrina, folato, peptídeos de transdução de membrana, dentre outros (PETRILLI et al., 2014). A conjugação à superfície de lipossomas com anticorpos monoclonais dá origem aos imunolipossomas. Os imunolipossomas tem, portanto, afinidade por um antígeno/receptor específico. Se este estiver altamente

expresso no alvo terapêutico, o fármaco carreado pelo imunolipossoma pode ser liberado neste local específico em altas concentrações. A liberação direcionada do fármaco minimiza a toxicidade em tecidos com baixa expressão do antígeno/receptor, gerando menores efeitos colaterais e permitindo a administração do medicamento em menores doses (Figura 6) (PARK *et. al.*, 2001).

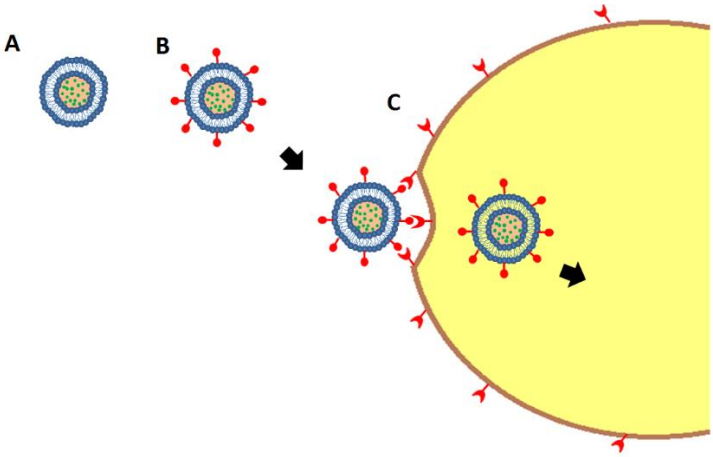

Figura 6. Lipossomas. A) Lipossoma convencional. B) Lipossoma funcionalizado com anticorpo – imunolipossoma. C) Representação do *uptake* de imunolipossomas por células que contém receptores para o anticorpo (Adaptado de ELOY et al., 2014).

No preparo de imunolipossomas (Figura 7), os anticorpos podem ser ligados à superfície destes covalentemente ou não covalentemente. A ligação não covalente é geralmente realizada com o uso de anticorpos biotinilados, ligados a lipossomas derivatizados com avidina. A ligação covalente utiliza técnicas de bioconjugação, tais como formação de ligações tioéster, dissulfídica ou amida entre os lipídeos e os anticorpos a serem ligados. Neste caso, os anticorpos podem ser ligados diretamente a grupos presentes na superfície dos lipossomas ou ligados pós-insercionalmente via micelas de um anticorpo ligado a um lipídeo (PAN *et. al.*, 2007).

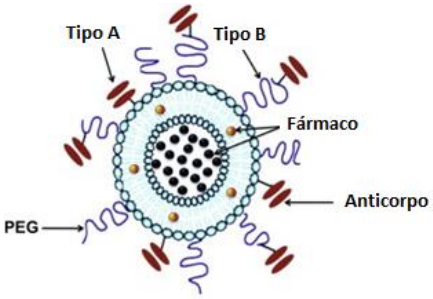

Figura 7. Representação esquemática de imunolipossomas. A figura mostra diferentes modos de conjugação do anticorpo ao lipossoma: no Tipo A o anticorpo é

diretamente conjugado ao lipossoma, enquanto que no Tipo B o anticorpo é conjugado ao lipossoma usando um espaçador flexível (Adaptado de IYER et al., 2011).

Imunolipossomas estericamente estabilizados podem ser obtidos pelo acoplamento de anticorpos às terminações distais de cadeias de PEG. Estas cadeias de PEG podem ser utilizadas como ligantes entre os lipossomas e os anticorpos, visando melhorar a ligação antígeno-anticorpo. Koning et al (2002) demonstraram que a ligação de anticorpos à extremidade terminal da cadeia de PEG é capaz de aumentar a associação entre os imunolipossomas e as células que possuem o receptor, mesmo quando baixas concentrações do anticorpo são utilizadas. Este reconhecimento melhorado se deve a correta orientação para a interação com o antígeno na superfície celular, combinada a reduzida interferência estérica das cadeias de PEG para esta interação.

Diversos métodos de acoplamento covalente foram desenvolvidos para a ligação de anticorpos derivatizados às extremidades PEG usando lipídeos peguilados funcionalizados com um grupamento terminal quimicamente reativo, tais como hidrazina, N-3-(piridilditio) proprionato, maleimida, succinil, p-nitrofenilcarbonil, entre outros. Uma das técnicas mais comuns de derivatização utiliza o reagente de Traut, capaz de produzir grupamentos tiol no anticorpo, permitindo a subsequente reação com o grupamento maleimida de lipídeos modificados através de ligação covalente (SCHNYDER et al., 2004; BARRAJÓN-CATALÁN et al., 2011).

O uso de imunolipossomas de cetuximabe é promissor visto que o EGFR está presente em uma variedade de tumores sólidos, incluindo o SCC. Imunolipossomas contendo DOX específicos para ligação ao EGFR demonstraram atividade clínica em um estudo de fase 1 de escalonamento de dose (MAMOT et al., 2005; WICKI et al., 2015) e estes progrediram para fase 2 (LIMASALE et al., 2015).

A aplicação tópica de lipossomas, sejam eles funcionalizados ou não, pode aumentar a deposição de fármacos na pele no sítio de ação, reduzindo a absorção sistêmica e os efeitos adversos, além de carrear fármacos diretamente pelos apêndices da pele (MAGHRABY *et. al.,* 2008). Diversos peptídeos e proteínas já tiveram sua penetração cutânea beneficiada pelos lipossomas (SHEW *et. al.*, 1985; MEYENBURG *et. al.*, 2000).

Sistemas de liberação na forma de nanobastões de ouro conjugados ao cetuximabe já foram descritos como facilitadores do diagnóstico de SCC por aplicação

tópica (PUVANAKRISHNAN *et. al.*, 2012). Este estudo foi realizado, no entanto, aplicando os nanobastões diretamente no tumor, *ex vivo*, sem a barreira conferida pelo estrato córneo. Sistemas mais conhecidos e não-rígidos, como os lipossomas, podem facilitar a penetração do cetuximabe através do estrato córneo, permitindo que ele chegue até o tumor em quantidades superiores aquelas conseguidas a partir da administração em nanobastões rígidos de ouro. Além disso, a presença do cetuximabe na superfície dos lipossomas, como no caso dos imunolipossomas, pode aumentar o *uptake* do lipossoma pelas células tumorais, aumentando a concentração nas células tumorais tanto do cetuximabe, como de quimioterápicos encapsulados no sistema de liberação.

2.5 Métodos físicos de promoção da penetração cutânea de fármacos

O emprego de métodos físicos é uma estratégia promissora para aumentar o transporte de macromoléculas através do estrato córneo e, consequentemente, permitir que maiores quantidades das mesmas cheguem às células tumorais (GRATIERI *et al.*, 2008, TAVEIRA et al., 2009). Dentre os métodos mais estudados para este fim está a iontoforese.

A iontoforese é a aplicação de uma corrente elétrica fraca, de no máximo 0,5 mA/cm^2. Ela aumenta tanto a penetração cutânea de fármacos ionizados, por eletromigração, como de fármacos neutros, por eletrosmose (GELFUSO *et al.*, 2011).

Na iontoforese uma corrente elétrica é aplicada na pele por meio de uma solução/formulação eletrolítica e de dois eletrodos, um positivo, o ânodo, e outro negativo, o cátodo (Figura 8). A formulação que contém o fármaco, de preferência ionizado, é colocada em contato com um dos eletrodos de forma que forças eletromigratórias direcionem à molécula para a pele. Desta forma, de maneira simplificada, moléculas catiônicas, ou seja, positivamente carregadas, sofrem repulsão pelo eletrodo positivo ou ânodo e penetram a pele, enquanto fármacos negativamente carregados ou ânions sofrem repulsão pelo cátodo. Devido à eletromigração, a taxa de penetração cutânea de substâncias ionizadas aumenta substancialmente quando comparada com a penetração passiva (na ausência de corrente elétrica) (TESSELAR, SJÖBERG, 2011).

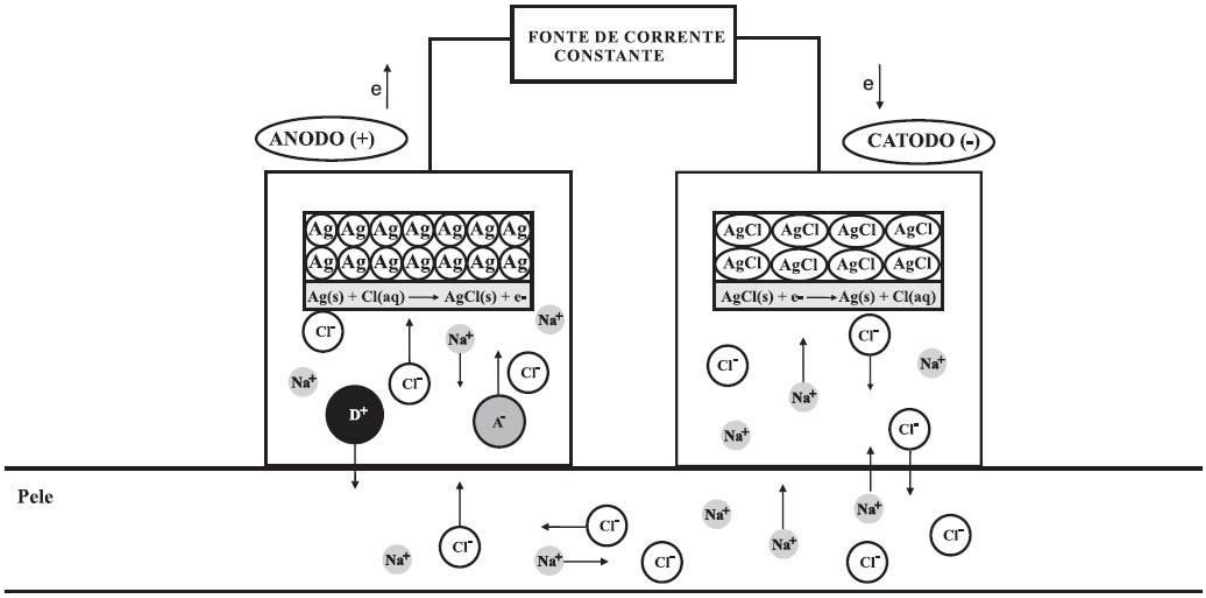

Figura 8. Figura esquemática de um aparato para iontoforese com sistema de eletrodos Ag/AgCl. O ânodo possui um fármaco ionizável D^+ e seu contra íon A^- (GRATIERI et al., 2008). Para facilitar a passagem da corrente elétrica e as reações eletroquímicas, o sal Na^+Cl^- está presente nos dois compartimentos.

Eletrosmose é o termo utilizado para descrever o fluxo de um volume de solvente e movimentação de cargas quando uma corrente elétrica é aplicada sobre a pele. Tal corrente causa a movimentação de íons Na^+ preferencialmente em relação aos íons Cl^-. Isso se deve ao ponto isoelétrico da pele (aproximadamente 4-4,5), que faz com que esta, em contato com uma solução em pH fisiológico, esteja negativamente carregada, favorecendo o transporte de cátions. Desta forma, é favorecido o transporte de íons no sentido do ânodo para o cátodo visando neutralizar as cargas negativas na pele e, com isso, ocorre o transporte de solvente e das moléculas neutras presentes no sistema. Sendo assim, moléculas com carga neutra em pH fisiológico são beneficiadas pela eletrosmose quando colocadas em contato com o ânodo e os cátions se beneficiam de uma força adicional de transporte à eletromigração (GUY et al., 2000; GRATIERI et al., 2008). Desta forma, o fluxo iontoforético total é a soma das contribuições da eletromigração e eletrosmose, como indicado na Equação I.

$$J\ total = \frac{\mathcal{Z}_p \mathcal{U}_p c_p I}{\mathcal{F}.\sum \mathcal{Z}_1 \mathcal{U}_1 c_1} + v.cp \quad \text{Equação I.}$$

Sendo $\mathcal{Z}_p \mathcal{U}_p c_p$ a carga do permeante, a mobilidade e a concentração, respectivamente, I a intensidade da corrente elétrica aplicada, $\mathcal{F}$ a constante de Faraday e v a velocidade do solvente eletrosmótico.

Diversos fatores são conhecidos por influenciar a iontoforese. Estes incluem as propriedades físico-químicas da molécula (tamanho, carga, concentração), a formulação escolhida (veículo, tampão, pH, viscosidade, presença de outros íons), o equipamento utilizado (faixa de corrente elétrica disponível, corrente contínua ou pulsada, tipo de eletrodo), variações biológicas (sítio de aplicação, fluxo sanguíneo no local, idade, sexo), temperatura da pele e duração da iontoforese (RAWAT et al., 2008).

A influência da iontoforese na penetração de sistemas nanoparticulados começou a ser explorada apenas recentemente. A maioria dos trabalhos sugere o aumento da retenção dos fármacos encapsulados na pele, com menor permeação através dela (VUTLA et al., 1996; FANG et al., 1999; TAVEIRA et al., 2009; KAJINOMOTO et al., 2011). No primeiro trabalho publicado com a associação de iontoforese e lipossomas, os autores investigaram o transporte iontoforético da [Leu5]encefalina em pele de cadáver e observaram a penetração cutânea do fármaco e dos constituintes do lipossoma, com menor degradação do fármaco encapsulado (VUTLA *et al.*, 1996). Além disso, foi demonstrado que o aumento da cadeia carbônica do fosfolipídeo usado para preparar o lipossoma reduz a permeação cutânea do fármaco nele encapsulado, mas não foi observada diferença estatisticamente significativa para cadeias carbônicas de 14, 16 ou 18 com relação a quantidade acumulada de fármaco nas camadas da pele (FANG et al., 1999). A associação da iontoforese com nanopartículas também já foi avaliada visando o tratamento de tumores cutâneos. A aplicação da iontoforese em nanopartículas lipídicas contendo DOX aumentou a penetração cutânea da DOX (TAVEIRA et al., 2009), o que resultou na regressão do crescimento tumoral do SCC (HUBER et al., 2015*)*.

Sendo assim, a iontoforese parece forçar a entrada de componentes das nanopartículas para dentro da pele, mantendo o fármaco neste local, diminuindo sua difusão para a circulação sistêmica, o que é promissor para um tratamento local de doenças como o câncer de pele.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, lipossomas contendo 5-FU e imunolipossomas com cetuximabe contendo 5-FU foram desenvolvidos com sucesso. Os sistemas de liberação apresentaram tamanho nanométrico inferior a 180 nm, baixa polidispersividade, eficiência de encapsulação do 5-FU relativamente alta, alta eficiência de conjugação do cetuximabe e estabilidade. Em células A431, o cetuximabe mostrou potencial citotóxico após 120 h de incubação e houve sinergismo quando 5-FU e cetuximabe foram combinados em imunolipossomas. Além disso, o uso de imunolipossomas resultou em maior porcentagem de internalização nas células EGFR positivas do que os lipossomas, mas não em células EGFR negativas. A encapsulação do 5-FU nos lipossomas diminuiu a penetração do fármaco através da pele, *in vitro*, o que sugere maior tolerabilidade e menores efeitos adversos em relação a administração do 5-FU em solução. A iontoforese aumentou mais de 5 vezes a penetração do 5-FU na pele. Sua associação aos imunolipossomas direcionou a penetração do 5-FU para a epiderme viável, local este onde os tumores cutâneos se desenvolvem. Nos estudos *in vivo* em modelo xenográfico de SCC de pele com superexpressão de EGFR, o tratamento tópico associado a iontoforese foi mais efetivo do que o tratamento subcutâneo. Em ambos tratamentos, no entanto, houve melhor controle do crescimento tumoral quando imunolipossomas foram aplicados e não houve perda de massa corpórea nos animais. A análise histológica revelou potencial de proliferação celular bastante reduzido para os diferentes tratamentos comparado ao grupo controle negativo. Os estudos pré-clínicos efetuados neste trabalho foram bem-sucedidos, o que pode balizar o planejamento de futuros estudos clínicos empregando iontoforese associada a imunolipossomas contendo cetuximabe e 5-FU para o tratamento de SCC de pele.

7 REFERÊNCIAS

ABRAHAM, W.; WERTZ, P.W.; DOWNING, D.T. Fusion patterns of liposomes formed from stratum corneum lipids. **J. Invest. Dermatol.**, v. 90, p. 259-262, 1988.

ALAM, M.; RATNER, D. Cutaneous squamous-cell carcinoma. **N. Engl. J. Med**., v. 344, p. 975-983, 2001.

ALSARRA, I.A.; ALARIFI, M.N. Validated liquid chromatographic determination of 5-fluorouracil in human plasma. **J. Chromatog. B**, v. 804, p. 435-439, 2004.

AMAGASE, H.; KAKIMOTO, M.; HASHIMOTO, K.; FUWA, T.; TSUKAGOSHI, S. Epidermal growth fator receptor-mediated selective. **Jpn. J. Cancer Res.**, v. 80, p. 670-678, 1989.

ANDEGA, S.; KANIKKANNAN, N.; SINGH, M. Comparison of the effect of fatty alcohols on the permeation of melatonin between porcine and human skin. **J. Control. Release,** v. 77, p. 17–25, 2001.

ASHWANIKUMAR, N.; KUMAR, N.A.; NAIR, S.A.; KUMAR, G.S.V. Dual drug delivery of 5-fluorouracil (5-FU) and methotrexate (MTX) through random copolymeric nanomicelles of PLGA and polyethylenimine demonstrating enhanced cell uptake and cytotoxicity. **Colloids Surf. B**, v. 122, p. 520-528, 2014.

BANGHAM, A.D.; STANDISH, M.M.; WATKINS, J.C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **J. Mol. Biol.**, v. 13, p. 238–252, 1965.

BARBERO, A.M.; FRASCH, H.F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review. **Toxicol. Vitr.**, v. 23, p. 1-13, 2009.

BARENHOLZ, Y. Doxil®—The first fda-approved nano-drug: Lessons learned. **J. Control. Release,** v. 160, p. 117–134, 2012.

BARRAJÓN-CATALÁN, E.; MENÉNDEZ-GUTÍERREZ, M.P.; FALCÓ, A.; SACEDA, M.; CATANIA, M.; MICOL, V. Immunoliposomes: A Multipurpose Strategy in Breast Cancer Targeted Therapy, Breast Cancer - Current and Alternative Therapeutic Modalities, Prof. Esra Gunduz (Ed.), 2011 ISBN: 978-953-307-776-5, **InTech**, Available from: http://www.intechopen.com/books/breast-cancer-current-and-alternative-therapeuticmodalities/ immunoliposomes-a-multipurpose-strategy-in-breast-cancer-targeted-therapy

BARRY, B. W. Delivery routes in skin: a novel approach. **Adv. Drug Delivery Rev**. v. 54, p. 31-40, 2002.

BARTH, A. B.; PEREIRA, R. L.; DE VARGAS, B. A.; VOLPATO, N. M. A simple and rapid method to assess butenafine hydrochloride in skin samples and a comparative cutaneous retention study of two marketed formulations. **Biomed. Chromatog.**, v. 25, p. 1132–1137, 2011.

BAUMAN, J.E.; EATON, K.D.; MARTINS, R.G. Treatment of Recurrent Squamous Cell Carcinoma of the Skin With Cetuximab. **Arch. Dermatol.**, v. 143, p. 889-892, 2007.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. Neurociências- Desvendando o Sistema Nervoso. Porto Alegre: Artmed Editora, 2ªed, 2002.

BERNARDI, D. S.. Influência da iontoforese na imunização transcutânea utilizando lipossomas e nanopartículas metálicas. Ribeirão Preto: **Tese (Doutorado)** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2015.

BOLFARINI, G.C.; SIQUEIRA-MOURA, M.P.; DEMETS, G.J.F. ; MORAIS, P. C.; Tedesco, A. C . In vitro evaluation of combined hyperthermia and photodynamic effects using magnetoliposomes loaded with cucurbituril zinc phthalocyanine complex on melanoma. **J. Photochem. Photobiol B: Biol**, v. 115, p. 1-4, 2012.

BONNER, J.A.; HARARI, P.M.; GIRALT, J.; AZARNIA, N.; SHIN, D.M.; COHEN, R.B.; JONES, C.U.; SUR, R.; RABEN, D.; JASSEM, J.; OVE, R.; KIES, M.S.; BASELGA, J.; YOUSSOUFIAN, H.; AMELLAL, N.; ROWINSKY, E.K.; ANG, K.K.Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous- Cell Carcinoma of the Head and Neck. **N. Engl. J. Med.**, v. 354, p. 567-578, 2006.

BOUWSTRA, J.A., DE VRIES, M.A., GOORIS, G.S., BRAS, W., BRUSSEE, J., PONEC, M. Thermodynamic and structural aspects of the skin barrier. **J. Control. Release**, v. 15, p. 209–220, 1991.

Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução nº RE 899, de 29 de maio de 2003.

Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução nº 27, de 17 de maio de 2012.

BUIRET, G.; COMBE, C.; FAVREL, V.; POMMIER, P.; MARTIN, L.; ECOCHARD, R.; FAYETTE, J.; TARTAS, S.; RAMADE, A.; CERUSE, P. A Retrospective, multicenter study of the tolerance of induction chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil followed by radiotherapy with concomitant cetuximab in 46 cases of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.**, v. 77, p. 430-437, 2010.

CASTILE, J.D.; TAYLOR, K.M.G. Factors affecting the size distribution of liposomes produced by freeze–thaw extrusion. **Int. J. Pharm.**, v. 188, p. 87–95, 1999.

CH´NG, S.; LOW, I.; NG, D.; BRASCH, H.; SULLIVAN, M.; DAVIS, P.; TAN, S.T. Epidermal growth factor receptor: a novel biomarker for aggressive head and neck cutaneous squamous cell carcinoma. **Hum. Pathol.**, v. 39, p. 344-349, 2008.

CHAROENPUTTAKUN, P.; LI, S.K.; NGAWHIRUNPAT, T. Iontophoretic delivery of lipophilic and hydrophilic drugs from lipid nanoparticles across human skin. **Int.** J. Pharm., v. 495, p. 318-328, 2015.

CHEN, H.M.; YU, C.H.; LIN, H.P.; YANG, H., KUO, R.C.; KUO, Y.S.; CHIANG, C.P. Successful treatment of an early invasive oral squamous cell carcinoma with topical 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. **J. Dent. Sci.**, v. 5, p. 36-40, 2010.

CHEN, Y.; WU, Q.; ZHANG, Z.; YUAN, L.; LIU, X.; ZHOU, L. Preparation of Curcumin-Loaded Liposomes and Evaluation of Their Skin Permeation and Pharmacodynamics. **Molecules**, v. 17, p. 5972-5987, 2012.

CHINEMBIRI, T.N.; GERBER, M.; DU PLESSIS, L.; DU PREEZ, J.; DU PLESSIS, J. Topical Delivery of 5-Fluorouracil from Pheroid™Formulations and the In Vitro Efficacy Against Human Melanoma. AAPSPharmaSciTech, v. 16, p. 1390-1398, 2015.

CHOU, T.C.; TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Adv. Enzyme Regul.**, v. 22, p. 27-55, 1984.

CHOW, A.; BROWN, B.D.; MERAD, M. Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 788-798, 2011.

ClinicalTrials.gov, accessed Nov/2016.

CHUNG, T.W.; LIN, S.Y.; LIU, D.Z.; TYAN, Y.C.; YANG, J.S. Sustained release of 5-FU from Poloxamer gels interpenetrated by crosslinking chitosan network. **Int. J. Pharm.**, v. 382, p. 39-44, 2009.

CLARES, B.; BIEDMA-ORTIZ, R.A.; SÁEZ-FERNÁNDEZ, E.; PRADOS, J.C.; MELGUIZO, C.; CABEZA, L.; ORTIZ, R.; ARIAS, J.L. Nano-engineering of 5-

fluorouracil-loaded magnetoliposomes for combined hyperthermia and chemotherapy against colon cancer. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 85, p. 329-338, 2013.

CODACCI-PISANELLI, G.; VAN DER WILT, C.L.; PINEDO, H.M.; NOORDHUIS, P.; BRAAKHUIS, B.J.; VAN LAAR, J.A.; PETERS, G.J. Antitumour activity, toxicity and inhibition of thymidylate synthase of prolonged administration of 5fluorouracil in mice. **Eur. J. Cancer**, v. 31A, p. 1517-1525, 1995.

COHEN, M.H.; CHEN, H.; SHORD, S.; FUCHS, C.; HE, K.; ZHAO, H.; SICKAFUSE, S.; KEEGAN, P.; PAZDUR, R. Approval Summary: Cetuximab in Combination With Cisplatin or Carboplatin and 5-Fluorouracil for the First-Line Treatment of Patients With Recurrent Locoregional or Metastatic Squamous Cell Head and Neck Cancer. **Oncologist**, v. 18, p. 460-466, 2013.

COSCO, D.; PAOLINO, D.; MAIUOLO, J.; DI MARZIO, L.; CARAFA, M.; VENTURA, C.A.; FRESTA, M. Ultradeformable liposomes as multidrug carrier of resveratrol and 5-fluorouracil for their topical delivery. **Int. J. Pharm.**, v. 489, p. 1-10, 2015.

CRANMER, L.D.; ENGELHARDT, C.; MORGAN, S.S. Treatment of unresectable and metastatic cutaneous squamous cell carcinoma. **Oncologist**, v. 15, p. 1320-1328, 2010.

CUNNINGHAM, D.; HUMBLET, Y.; SIENA, S.; KHAYAT, D.; BLEIBERG, H.; SANTORO, A.; BETS, D.; MUESER, M.; HARSTRICK, A.; VERSLYPE, C.; CHAU, I.; CUTSEM, E.V. Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 351, p. 337-345, 2004.

DE MATTOS, A.C.; KHALIL, N.M.; MAINARDES, R.M. Development and validation of an HPLC method for the determination of fluorouracil in polymeric nanoparticles. **Braz. J. Pharm. Sci**., v.49, p. 117-126, 2013.

DUREGON, E.; MOLINARO, L.; VOLANTE, M.; VENTURA, L.; RIGHI, L.; BOLLA, S.; TERZOLO, M.; SAPINO, A.; PAPOTTI, M.G. Comparative diagnostic and prognostic performances of the hematoxylin-eosin and phospho-histone H3 mitotic count and Ki-67 index in adrenocortical carcinoma. **Modern Pathology**, v. 27, p. 1246-1254, 2014.

EGBARIA, K.; WEINER, N. Liposomes as a topical drug delivery system. **Adv. Drug Deliv. Rev**, v.5, p. 287-300, 1990.

ELORZA, B.; ELORZA, M.A.; FRUTOS, G.; CHANTRES, J.R. Characterization of 5-fluorouracil loaded liposomes prepared by reverse-phase evaporation or freezing-thawing extrusion methods: study of drug release. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1153, p. 135-142, 1993.

ELOY, J.O.; DE SOUZA, M.C.; 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 Surf. B**, v. 123, p. 345-63, 2014.

ELOY, J.O. Lipossomas e imunolipossomas contendo fármacos antitumorais: desenvolvimento, caracterização e avaliação da eficácia contra o câncer de mama. Ribeirão Preto: **Tese (Doutorado)** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2016.

ESSA, E.A.; BONNER, M.C.; BARRY, B.W. Electrically assisted skin delivery of liposomal estradiol; phospholipid as damage retardant. **J. Control. Release**, v. 95, p. 535-546, 2004.

FANG, J.Y.; SUNG, K.C.; LIN, H.H.; FANG, C.L. Transdermal iontophoretic delivery of enoxacin from various liposome-encapsulated formulations. **J. Control. Release**, v. 60, p. 1-10, 1999.

FASEHHE, H.; ZARRINRAD, G.; TAVANGAR, S.M.; GHAFFARI, S.H.; FAGHIHI, S. The inhibitory effect of disulfiram encapsulated PLGA NPs on tumor growth: Different administration routes. **Matt. Sci. Eng. C**, v. 63, p. 587-595, 2016.

FDA, F. and D. A., & Food and Drug Administration. (2013). Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services.

FRESTA, M.; VILLARI, A.; PUGLISI, G;, CAVALLARO, G. 5-Fluorouracil: various kinds of loaded liposomes: encapsulation efficiency, storage stability and fusogenic properties. **Int. J. Pharm.**, v. 99, p. 145–156, 1993.

GABIZON, A.; CATANE, R.; UZIELY, B.; KAUFMAN, B.; SAFRA, T.; COHEN, R.; MARTIN, F.; HUANG, A.; BARENHOLZ, Y. Prolonged Circulation Time and Enhanced Accumulation in Malignant Exudates of Doxorubicin Encapsulated in Polyethylene-glycol Coated Liposomes. **Cancer Res.**, v. 54, p. 987-992, 1994.

GAO, W.; VECCHIO, D.; LI, J.; ZHU, J.; ZHANG, Q.; FU, V.; LI, J.; THAMPHIWATANA, S.; LU, D.; ZHANG, L. Hydrogel Containing Nanoparticle-Stabilized Liposomes for Topical Antimicrobial Delivery. **ACS Nano**, v. 8, p. 2900-2907, 2014.

GELFUSO, G.M., GRATIERI, T., SOUZA, J. G., THOMAZINE, J. A., LOPEZ, R. F. V., The influence of positive or negative charges in passive and iontophoretic skin penetration of porphyrins used in photodynamic therapy. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 77, p. 249-256, 2011.

GELFUSO, G.M.; BARROS, M.A.O.; DELGADO-CHARRO, M.B.; GUY, R.H.; LOPEZ, R.F.V. Iontophoresis of minoxidil sulphate loaded microparticles, a strategy for follicular drug targeting?. **Colloids Surf. B**, v. 134, p. 408-412, 2015.

GIACCHERO, D.; BARRIÈRE, J.; BENEZARY, K.; GUILLOT, B.; DUTRIAUX, C.; MORTIER, L.; LACOUR, J.P.; THYSS, A.; PEYRADE, Y. Efficacy of Cetuximab for

Unresectable or Advanced Cutaneous Squamous Cell Carcinoma - A Report of Eight. **Cases Clin. Onc.**, v. 23, p. 716-721, 2011.

GLAVAS-DODOV, M.; FREDRO-KUMBARADZI, E.; GORACINOVA, K.; SIMONOSKA, M.; CALIS, S.; TRAJKOVIC-JOLEVSKA, S.; HINCAL, A.A. The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5- FU. **Int. J. Pharm.**, *291*, 79–86, 2005.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G.M.; LOPEZ, R.F.V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Quim. Nova**, v. 31, p. 1490-1498, 2008.

GRATIERI, T.; KALIA, Y.N. Mathematical models to describe iontophoretic transport in vitro and in vivo and the effect of current application on the skin barrier. **Adv Drug Deliv Rev**., v.65, p. 315-329, 2012.

GROSS, K.; KIRCIK, L.; KRICORIAN, G. 5% 5-Fluorouracil cream for the treatment of small superficial basal cell carcinoma: Efficacy, tolerability, cosmetic outcome, and patient satisfaction. **Dermatol Surg.**, v. 33, p. 433-439, 2007.

GROVES, T.R.; FARRIS, R.; ANDERSON, J.E.; ALEXENDER, T.C; KIFFER, F.; CARTER, G.; WANG, J.; BOERMA, M.; ALLEN, A.R. 5-Fluorouracil chemotherapy upregulates cytokines and alters hippocampal dendritic complexity in aged mice. **Behav. Brain Res.**, v. 316, p. 215-224, 2017.

GUPTA, A.K. The management of actinic keratosis in the United States with topical 5-fluorouracil: a pharmacoeconomic evaluation. **Cutis**, v. 70, p. 30-36, 2002.

GIJSENS, A.; DERYCKE, A.; MISSIAEN, L.; DE VOS, D.; HUWYLER, J.; EBERLE, A.; DE WITTE, P. Targeting the photocytotoxic compound AlPcS4 to HeLa cells by transferrin conjugated PEG-liposomes. **Int. J. Cancer**, v. 101, p. 78-85, 2002.

GUSTERSON, B.A.; HUNTER, K.D. Should we be surprised at the paucity of response to EGFR inhibitors?. **The Lancet Oncology**, v. 10, p. 522-527, 2009.

GUY, R.; KALIA, Y.N.; DELGADO-CHARRO, M.B.; MERINO, V.; LÓPEZ, A. MARRO, D. Iontophoresis: electrorepulsion and electroosmosis. **J. Control. Release**, v. 64, p. 129-132, 2000.

HADDAD, R.; NESHER, E.; WEISS, J.; SKORNICK, Y.; KASHTAN, H. Photodynamic therapy for Bowen's disease and squamous cell carcinoma of the skin. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, v. 1, p. 225-230, 2004.

HADIAN, Z.; SAHARI, M.A.; MOGHIMI, H.R.; BARZEGAR, M. Formulation, Characterization and Optimization of Liposomes Containing Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids; A Methodology Approach. **Iran. J. Pharm. Res.**, v. 13, p. 393-404, 2014.

HAQUE, T.; RAHMAN, K.M.; THURSTON, D.E.; HADGRAFT, J.; LANE, M.E. Topical therapies for skin cancer and actinic keratosis. **Eur. J. Pharm. Sci**, v. 77, p. 279-289, 2015.

HARDING, C.R. The stratum corneum: structure and function in health and disease. **Dermatol. Ther.**, v.17, p.6-15, 2004.

HUBER, L.A.; PEREIRA, T.A.; RAMOS, D.N.; REZENDE, L.C.D.; EMERY, F.S.; SOBRAL, L.M.; LEOPOLDINO, A.M.; LOPEZ, R.F.V. Topical Skin Cancer Therapy Using Doxorubicin-Loaded Cationic Lipid Nanoparticles and Iontophoresis. **J. Biomed. Nanotechnol.**, v. 11, p. 1-14, 2015.

International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH). ICH Harmonised Tripartite Guideline.

Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Current Step 4 version, 2005.

IVEY, J.W.; BONAKDAR, M.; KANITKAR, A.; DAVALOS, R.V.; VERBRIDGE, S.S. Improving cancer therapies by targeting the physical and chemical hallmarks of the tumor microenvironment. **Cancer Lett.**, v. 380, p. 330-339, 2016.

IYER, A.K.; SU, Y.; FENG, J.; LAN, X.; ZHU, X.; LIU, Y.; GAO, D.; SEO, Y.; VANBROCKIN, H.F.; BROADDUS, V.C.; LIU, B.; HE, J. The effect of internalizing human single chain antibody fragment on liposome targeting to epithelioid and sarcomatoid mesothelioma. **Biomaterials**, v. 32, p. 2605-2613, 2011.

JAAFARI, A.; TILAOUI, M.; MOUSE, H.A.; M´BARK, L.A.; ABOUFATIMA, R.; CHAIT, A.; LEPOIVRE, M.; ZYAD, A. Comparative study of the antitumor effect of natural monoterpenes: relationship to cell cycle analysis. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 22, p. 534-540, 2012.

JOHNSON, T.M.; ROWE, D.E.; NELSON, B.R.; SWANSON, N.A. Squamous cell carcinoma of the skin (excluding lip and oral mucosa). **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 26, p. 467-484, 1992.

JORAHOLMEN, M.W.; SKALKO-BASNET, N.; ACHARYA, G.; BASNET, P. Resveratrol-loaded liposomes for topical treatment of the vaginal inflammation and infections, **Eur. J. Pharm. Sci.,** v. 79, p. 112-121, 2015.

KAISER, N.; KIMPLER, A.; MASSING, U.; BURGER, A.M.; FIERBIG, H.H.; BRANDL, M.; SCHUBERT, R. 5-Fluorouracil in vesicular phospholipid gels for anticancer treatment: entrapment and release properties. **Int. J. Pharm.**, v. 256, p. 123-131, 2003.

KAJIMOTO, K.; YAMAMOTO, M.; WATANABE, M.; KIGASAWA, K.; KANAMURA, K.; HARASHIMA, H.; KOGURE, K. Noninvasive and persistent transfollicular drug

delivery system using a combination of liposomes and iontophoresis. **Int J Pharm**., v. 403, p. 57–65, 2011.

KAKUMANU, S.; TAGNE, J.B.; WILSON, T.A.; NICOLOSI, R.J. A nanoemulsion formulation of dacarbazine reduces tumor size in a xenograft mouse epidermoid carcinoma model compared to dacarbazine suspension. **Nanomedicine:NBM**, v. 7, p. 277-283, 2011.

KALAPURAKAL, S.J.; MALONE, J.; ROBBINS, K.T.; BUESCHER, L.; GODWIN, J.; RAO, K. Cetuximab in refractory skin cancer treatment. **J. Cancer**, v. 3, p. 257-261, 2012.

KARATHANASIS, E.; CHAN, L.; BALUSU, S.R.; D´ORSI, C.J. Multifunctional nanocarriers for mammographic quantification of tumor dosing and prognosis of breast cancer therapy. **Biomaterials**, v. 29, p. 4815 – 4822, 2008.

KEIL, F.; SELZER, E.; BERGHOLD, A.; REINISCH, S.; KAPP, K.S.; DE VRIES, A.; GREIL, R.; BACHTIARY, B.; TINCHON, C.; ANDERHUBER, W.; BURIN, M.; KASPAREK, A.K.; ELSAßER, W.; KAINZ, H.; RIEDL, R.; KOPP, M.; KORNEK, G. Induction chemotherapy with docetaxel, cisplatin and 5-fluorouracil followed by radiotherapy with cetuximab for locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. **Eur. J. Cancer**, v. 49, p. 352-359, 2013.

KONING, G.A.; KAMPS, J.A.A.M.; SCHERPHOF, G.L. Efficient intracellular delivery of 5-fluorodeoxyuridine into colon cancer cells by targeted immunoliposomes. **Cancer Detec. Prev.**, v. 26, p. 209-307, 2002.

LAGINHA, K.; MUMBENGEGWI, D.; ALLEN, T. Liposomes targeted via two different antibodies: Assay, B-cell binding and cytotoxicity. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1711, p. 25-32, 2005.

LANE, M.E. Skin penetration enhancers. **Int. J. Pharm.**, v. 447, p. 12-21, 2013.

LEE, S.J.; KIM, S.Y.; CHUNG, J.H.; OH, S.J.; RYU, J.S.; HONG, Y.S.; KIM, T.W.; MOON, D.H. Induction of thymidine kinase 1 after 5-fluorouracil as a mechanism for 30-deoxy-30-[18F]fluorothymidine flare. **Biochem. Pharmacol.**, v. 80, p. 1528-1536, 2010.

LEMOS, C.N. ; DE SOUZA, J.G. ; Simão, P.S. ; Lopez, R.F.V.. Iontophoresis Improved Growth Reduction of Invasive Squamous Cell Carcinoma in Topical Photodynamic Therapy. **Plos One**, v. 11, p. e0145922, 2016.

LEVY, S.; FURST, K.; CHERN, W. A comparison of the skin permeation of three topical 0.5% Fluorouracil formulations with that of a 5% formulation. **Clin. Ther.**, v. 23, p. 901–907, 2001.

LI, C.; WALLACE, S. Polymer-drug conjugates: recent development in clinical oncology. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 60, p. 886 – 898, 2008.

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 J. Pharm. Sci.**, v. 10, p. 81-98, 2015.

LIMASALE, Y.D.P.; TEZCANER, A.; ÖZEN, C.; KESKIN, D.; BANERJEE, S. Epidermal growth factor receptor-targeted immunoliposomes for delivery of celecoxib to cancer cells. **Int. J. Pharm.**, v. 479, p. 364-373, 2015.

LIU, S.; XIE, B.; WEI, W.; HUI, M.; SU, Z. Design and preparation of chimeric hyaluronidase as a chaperone for the subcutaneous administration of biopharmaceuticals. **Biochem Eng J**, v. 112, p. 32-41, 2016.

LOPEZ, R.F.V. Estudo de um sistema de liberação para o ácido 5-aminolevulínico por iontoforese para aplicação na terapia fotodinâmica de câncer de pele. Ribeirão Preto: **Tese (Doutorado)** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2000.

LOPEZ, R. F.; LANGE, N.; GUY, R.; BENTLEY M.V. Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.56, p.77– 94, 2004.

LOVEN, K.; STEIN, L.; FURST, K.; LEVY, S. Evaluation of the Efficacy and Tolerability of Applied to Each Side of the Face in Patients with Actinic Keratosis, **Clin. Ther.**, v. *24*, p. 4–5, 2002.

LU, Y.; LI, X.; LU, H.; FAN, Z. 1, 9-Pyrazoloanthrones Downregulate HIF-1α and Sensitize Cancer Cells to Cetuximab-Mediated Anti-EGFR Therapy. **PLoS ONE**,v. 5, p. e15823, 2010.

LU, Y.G.; WANG, Y.Y.; YANG, Y.D.; ZHANG, X.C.; GAO, Y.; ZHANG, J.B.; LI, G.L. Efficacy of topical ALA-PDT combined with excision in the treatment of skin malignant tumor. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, v. 11, p. 122-126, 2014.

MAEDA, H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting, **Adv. Enzyme Regul.**, v. 41, p. 189–207, 2001.

MADY, M.M.; DARWISH, M.M. Effect of chitosan coating on the characteristics of DPPC liposomes. **J. Adv. Res.**, v. 1, p. 187-191, 2010.

MAGHRABY, G.M.; BARRY, B.W.; WILLIAMS, A.C. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 34, p. 203-222, 2008.

MAMOT, C.; DRUMMOND, D.C.; NOBLE, C.O.; KALLAB, V.; GUO, Z.; HONG, K.; KIRPOTIN, D.B.; PARK, J.W. Epidermal Growth Factor Receptor–Targeted

Immunoliposomes Significantly Enhance the Efficacy of Multiple Anticancer Drugs In vivo. **Cancer Res.**, v. 65, p. 11631-11638, 2005.

MAMOT, C.; RITSCHARD, R.; WICKI, A.; STEHLE, G.; DIETERLE, T.; BUBENDORF, L.; HILKER, C.; DEUSTER, S.; HERRMANN, R.; ROCHLITZ, C. Tolerability, safety, pharmacokinetics, and efficacy of doxorubicin-loaded anti-EGFR immunoliposomes in advanced solid tumours: a phase 1 dose-escalation study. **Lancet Oncol.**, v. 13, p. 1234-1241.

MANOJLOVIC, V.; WINKLER, K.; BUNJES, V.; NEUB, A.; SCHUBERT, R.; BUGARSKI, B.; LENEWEIT, G. Membrane interactions of ternary phospholipid/cholesterol bilayers and encapsulation efficiencies of a RIP II protein, **Colloids Surf. B**, v. *64*, 284– 296, 2008.

MATSUMURA, Y.; MAEDA, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. **Cancer Res.**, v. 46, p. 6387-6392, 1986.

MAUBEC, E.; DUVILLARD, P.; VELASCO, V.; CRRICKX, B.; AVRIL, M. F. Immunohistochemical analysis of EGFR and HER-2 in patients with metastatic squamous cell carcinoma of the skin. **Anticancer Res**, v. 25, p. 1205-1210, 2005.

MCGILLIS, S.T.; FEIN, H. Topical Treatment Strategies for Non-Melanoma Skin Cancer and Precursor Lesions. **Semin Cutan Med Surg.**, v. 23, p. 174-183, 2004.

MENON, G.K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Adv. Drug Deliv. Rev**., v.54, p.S3-S17, 2002.

MERINO, V.; LÓPEZ, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Electrorepulsion versus electroosmosis: effect of pH on the iontophoretic flux of 5-fluorouracil. **Pharm. Res.**, v. 16, p. 758-761, 1999.

MESÍA, R.; RIVERA, F.; KAWECKI, A.. ROTTEY, S.; HITT, R.; KIENZER, H.; CUPISSOL, D., DE RAUCOURT, D.; BENASSO, M.; KORALEWSKI, P.; DELORD, J.P.; BOKEMEYER, C.; CURRAN, D.; GROSS, A.; ,VERMORKEN, J.B. Quality of life of patients receiving platinumbased chemotherapy plus cetuximab first line for recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. **Ann Oncol.**, v. 21, p. 1967–1973, 2010.

METTERLE, L.; NELSON, C.; PATEL, N. Intralesional 5-fluorouracil (FU) as a treatment for nonmelanoma skin cancer (NMSC): A review. **J Am Acad Dermatol.**, V. 74, P. 552-557, 2015.

MEYENBURG, S.; LILIE, H.; PANZNER, S.; RUDOLPH, R. Fibrin encapsulated liposomes as protein delivery system: Studies on the in vitro release behavior. **J. Control. Release**, v. 69, p. 159-168, 2000.

MEZEI, M.; GULASEKHARAM, V. Liposomes - a selective drug delivery system for the topical route of administration. I. Lotion dosage form, **Life Sci.,** v. 26, p. 1473-1477, 1980.

MILLA, P.; DOSIO, F.; CATTEL, L. PEGylation of Proteins and Liposomes: a Powerful and Flexible Strategy to Improve the Drug Delivery. **Curr. Drug Metab.**, v. 13, 105-119, 2012.

MISAK, H.; ZACHARIAS, N.; SONG, Z.; HWANG, S.; MAN, K.P.; ASMATULU, R.; YANG, S.Y. Skin cancer treatment by albumin-5-FU loaded magnetic nanocomposite spheres in a mouse model. **J. Biotechnol.**, v. 164, p. 130-136, 2013.

MORSE, L.G.; KENDRICK, C.; HOOPER, D.; WARD, H.; PARRY, E.; Treatment of squamous cell carcinoma with intralesional 5-Fluorouracil. **Dermatol. Surg.**, v. 29, p.1150-1153, 2003.

MORSE, L.G.; KENDRICK, C.; HOOPER, D.; WARD, H.; PARRY, E.; Treatment of squamous cell carcinoma with intralesional 5-Fluorouracil. **Dermatol. Surg.**, v. 29, p.1150-1153, 2003.

MORTESEN, 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. **J. Drug Deliv.,** p. 1-13, 2013.

NAKATA, E.; HUNTER, N.; MASON, K.; FAN, Z.; ANG, K.K.; MILAS, L. C225 Antiepidermal growth factor receptor antibody enhances the efficacy of docetaxel chemoradiotherapy. **J. Radiation Oncology Biol. Phys.**,v. 59, p. 1163-1173, 2004.

NOBS, L.; BUCHEGGER, F.; GURNY, R.; ALLEMANN, E. Current Methods for Attaching Targeting Ligands to Liposomes and Nanoparticles. **J. Pharm. Sci**., v. 93, p. 1980-1992, 2004.

NUÑO-GONZÁLEZ, A.; VICENTE-MARTÍN, F.J.; PINEDO-MORALEDA, F.; LÓPEZ-ESTEBARANZ, J.L. High-risk cutaneous squamous cell carcinoma. **Acta Dermosifiliogr**., v. 103, p. 567-578, 2012.

OECD. (2004). Skin Absorption: in vitro Method. *Test*, (April), 1–8.

OGURA, M.; PALIWAL, S.; MITRAGORI, S. Low-Frequency Sonophoresis. **Adv. Drug Deliv. Rev.***,* v. 60, p. 1218-23, 2008

OH, E.K.; JIN, S.E.; KIM, J.K.; PARK, J.S.; PARK, Y.; KIM, C.K. Retained topical delivery of 5-aminolevulinic acid using cationic ultradeformable liposomes for photodynamic therapy. **Eur. J. Pharm. Sci**, v. 44, p. 149-157, 2011.

OSTRENGA, J.; STEINMETZ, C.; POULSEN, B.; YETT, S. Significance of vehicle composition II. Prediction of optimal vehicle composition. **J. Pharm. Sci.**, v. 60, p. 1180–1183, 1971.

ÖZER, A.Y., Stability studies on 5-FU liposomes. **Drug Target. Deliv.**, v.1, p. 151–160, 1992.

PAN, X.; WU, G.; YANG, W.; BARTH, R. F.; TJARKS, W.; LEE, R. J. Synthesis of cetuximab-immunoliposomes via cholesterol-based membrane anchor for targeted delivery of a neutron capture therapy (NCT) agent to glioma cells. **Bioconjug. Chem.**, v. 18, p. 101-108, 2007.

PARK, J.W. et al. Tumor targeting using anti-her2 immunoliposomes. **J Control. Release**, v. 74, p. 95-113, 2001.

PARK, S.Y.; YOON, S.J.; FREIRE-DE-LIMA, L.; KIN, J.H.; HAKOMORI, S.I. Control of cell motility by interaction of gangliosides, tetraspanins, and epidermal growth factor receptor in A431 versus KB epidermoid tumor cells. **Carbohydr. Res.**, v. 344, p. 1479-1486, 2009.

PEREZ-HERRERO, E.; FERNANDEZ-MEDARDE, A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 93, p. 52-79, 2015.

PEREZ, M.J.A.; SCHILRREFF, P.; APEZTEGUIA, G.; CELES, F.S.; ZACCHINO, S.; DE OLIVEIRA, C.I.; ROMERO, E.L.; MORILLA, M.J. Topical amphotericin B in ultradeformable liposomes: Formulation,skin penetration study, antifungal and antileishmanial activity in vitro. **Colloids Surf. B**, v. 139, p. 190-198, 2016.

PERK, L.R.; VISSER, G.W.; VOSJAN, M.J.; STIGTER-VAN- WALSUM, M.; TIJINK, B.M.; LEEMANS, C.R.; VAN DONGEN, G.A. 89Zr as a PET surrogate radioisotope for

scouting biodistribution of the therapeutic radiometals 90Y and 177Lu in tumor-bearing nude mice after coupling to the internalizing antibody cetuximab. **J Nucl Med**.; v.46, p. 1898–1906, 2005.

PETRILLI, R.; ELOY, J.O.; MARCHETTI, J.M.; LOPEZ, R.F.V.; LEE, R.J. Targeted lipid nanoparticles for antisense oligonucleotide delivery. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v. 15, p. 847-855, 2014.

PETRILLI, R.; ELOY, J. O.; LOPEZ, R. F. V.; LEE, R. Cetuximab immunoliposomes enhance delivery of 5-FU to skin squamous carcinoma cell line. **Anti-cancer agents Med. Chem.**, v. 16, 2016 (E-pub ahead of print, doi 10.2174/1871520616666160526110913).

Portal Google. Disponível em http://www.google.com/patents/US7691826. Acesso em 22 de novembro de 2016.

Portal INCA. Disponível em <http://www.inca.com.br>. Acesso em 22 de novembro de 2016.

Portal Neb. Disponível em < https://www.neb.com/~/media/NebUs/Files/Application%20Notes/Characterization%20of%20Glycans%20from%20Erbitux%20Rituxan%20and%20Enbrel%20using%20PNGase%20F%20Glycerol%20Free%20Recombinant.pdf>. Acesso em 22 de novembro de 2016.

Portal Piercenet. Disponível em < www.piercenet.com/method/overview-elisa>. Acesso em 20 de novembro de 2015.

PRAÇA, F.S.G.; BENTLEY, M.V.L.B.; LARA, M.G.; PIERRE, M.B.R. Celecoxib determination in different layers of skin by a newly developed and validated HPLC-UV method. **Biomed. Chromatogr.**, v. 25, p. 1237-1244, 2011.

PUVANAKRISHNAN, P.; DIAGARADJANE, P.; KAZMI, S.; DUNN, A.K.; KRISHNAN, S.; TUNNELL, J.W. Narrow band imaging of squamous cell carcinoma tumors using topically delivered anti-EGFR antibody conjugated gold nanorods. **Lasers Surg. Med.**, v. 44, p. 310-317, 2012.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fuidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quim. Nova**, v. 24, p. 68-76, 2001.

RATUSHNY, V.; ASTSATUROV, I.; BURTNESS, B.A.; GOLEMIS, E.A.; SILVERMAN, J.S. Targeting EGFR resistance networks in head and neck cancer. **Cell. Signal.**, v. 21, p. 1255-1268, 2009.

RAWAT, S.; VENGURLEKAR, S.; JAIN, R.S.; SRIKARTI, G. Transdermal Delivery by Iontophoresis. **Indian J Pharm Sci.**, V. 70, P. 5-10, 2008.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

ROCHA, M.S.T.; LUCCI, C.M.; LONGO, J.P.F.; GALERA, P.D.; SIMIONI, A.R.; LACAVA, Z.G.M.; TEDESCO, A.C.; AZEVEDO, R.B. Aluminum-chloride-phthalocyanine encapsulated in liposomes: activity against naturally occurring dog breast cancer cells. **J. Biomed. Nanotechnol.**, v. 8, p. 251-257, 2012.

RUGGERI, B.A.; CAMP, F.; MIKNYOCZKI, S. Animal models of disease: Pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. **Biochem. Pharmacol.**, v. 87, p. 150-161, 2014.

SABITHA, M.; REJINOLD, N.S.; NAIR, A.; LAKSHMANAN, V.K.; NAIR, S.V.; JAYAKUMAR, R. Development and evaluation of 5-fluorouracil loaded chitin nanogels for treatment of skin cancer. **Carbohyd. Polym.**, v. 91, p. 48-57, 2013.

SAKATA, O.; FUJII, M.; KOIZUMI, N.; NAKADE, M.; KAMEYAMA, K.; WATANABE, Y. Effects of Oils and Emulsifiers on the Skin Penetration of Stearyl Glycyrrhetinate in Oil-in-Water Emulsions. **Biol. Pharm Bull.**, v. 37, p. 486–9, 2014.

SALEHI, Z.; MASHAYEKHI, F.; SHAHOSSEINI, F. Significance of eIF4E expression in skin squamous cell carcinoma. **Cell Biol. Int.**, v.31, p.1400-1404, 2007.

SANSON, A.L.; SILVA, S.C.R.; MARTINS, M.C.G.; GIUSTI-PAIVA, A.; MAIA, P.P.; MARTINS, I. Liquid-liquid extraction combined with high performance liquid chromatography-diode array-ultra-violet for simultaneous determination of antineoplastic drugs in plasma. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 47, p. 363-371, 2011.

SCHNYDER, A.; KRÄHENBÜHL, S.; TÖRÖK, U.; DREWE, J.; HUWYLER, J. Targeting of skeletal muscle in vitro using biotinylated immunoliposomes. **Biochem. J.,** v. 377, p. 61-67, 2004.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the know and the unknow. **J. Cell Physio.**, v. 182, p. 311-322, 2000.

SEBER, S.; GONULTAS, A.; OZTURK, O.; YETISYIGIT, T.Recurrent squamous cell carcinoma of the skin treated successfully with single agent cetuximab therapy. **Onco Targets Ther.**, v. 9, p. 945-948, 2016.

SHENOY, V.S.; VIJAY, I.K; MURTHY, R.S. Tumour targeting: biological factors and formulation advances in injectable lipid nanoparticles, **J. Pharm. Pharmacol.,** v. 57, p. 411-422, 2005.

SHEW, R.L.; DEAMER, D.W. A novel method for encapsulation of macromolecules in liposomes. **Biochim Biophys Acta.,** v. 816, p.1-8, 1985.

SIERON, A.; KAWCZYK-KRUPKA, A.; CEBULA, M.A.W.; SZYGULA, M.; ZIELEZNIK, W.; GRUK, M.; SUWALA-JURCZYK, S. Photodynamic therapy (PDT) using topicallyapplied _-aminolevulinic acid (ALA) for the treatment of malignant skin tumors. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, v. 1, p. 311-317, 2004.

SKVORTSOVA, I.; SKVORTSOV, S.; RAJI, U.; STASYK, T.; RIESTERER, O.; SCHOTTDORF, E.V.; POPPER, B.A.; SCHIESTL, B.; EICHBERGER, P.; DEBBAGE, P.; NEHER, A.; BONN, G.K.; HUBER, L.A.; MILAS, L.; LUKAS, P. Epithelial-to-mesenchymal transition and c-myc expression are the determinants of cetuximab-induced enhancement of squamous cell carcinoma radioresponse. **Radiother. Oncol.**, v. 96, p. 108-115, 2010.

SOLOMON, B.; HAGEKYRIAKOU, J.; TRIVETT, M.K.; STACKER, S.A.; McARTUR, G.A.; CULLINANE, C. EGFR blockade with ZD1839 (“Iressa”) potentiates the antitumor effects of single and multiple fractions of ionizing radiation in human A431 squamous cell carcinoma. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.**, v. 55, p. 713-723, 2003.

STONER, K.L.; HARDER, H.; FALLOWFIELD, L.J.; JENKINS, V.A. Intravenous versus subcutaneous drug administration. Which do patients prefer? A systematic review. **Patient-Patient-Centered Outcomes Res.,** p. 1-9, 2014.

STRATIGOS, A.; GARBE, C.; LEBBE, C.; MALVEHY, J.; DEL MARMOL, V.; PEHAMBERGER, H.; PERIS, K.; BECKER, J.C.; ZALAUDEK, I.; SAIAG, P.; MIDDLETON, M.R.; BASTHOLT, L.; TESTORI, A.; GROB, J.J. On behalf of the European Dermatology Forum (EDF), the European Association of Dermato-Oncology

(EADO), and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC).Diagnosis and treatment of invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline. **Eur. J. Cancer**, v. 51, p. 1989-2007, 2015.

SU, X.; YANG, N.; WITTRUP, K.D.; IVRINE, D.J. Synergistic Antitumor Activity from Two-Stage Delivery of Targeted Toxins and Endosome-Disrupting Nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 14, p. 1093-1102, 2013.

SUE, M. Cetuximab improves survival in advanced colorectal cancer. **Oncology Times UK: AACR Annual Meeting**, v. 4, p.13, 2007.

TANG, H.; MITRAGOTRI, S.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. Theoretical Description of Transdermal Transport of Hydrophilic Permeants: Application to Low-frequency Sonophoresis. **J. Pharm. Sci.**, v. 90, p. 545-568, 2001.

TAVEIRA, S.F.; NOMIZO, A.; LOPEZ, R.F.V. Effect of the iontophoresis of a chitosan gel on doxorubicin skin penetration and cytotoxicity. **J. Control. Release**, v. 134, p. 35-40, 2009.

TESSELAAR, E.; SJÖBERG, F. Transdermal iontophoresis as an in-vivo technique for studying microvascular physiology. **Microvascular Res.**, v. 81, p. 88-96, 2011.

THOMAS, A.M.; KAPANEN, A.I.; HARE, J.I.; RAMSAY, E.; EDWARDS, K.; KARLSSON, G.; BALLY, M.B. Development of a liposomal nanoparticle formulation of 5-Fluorouracil for parenteral administration: Formulation design, pharmacokinetics and efficacy. **J. Control. Release**, v. 150, p. 212-219, 2011.

TIAN, F.; FAN, T.; JIANG, Y.; ZHANG, X.; WANG, X. A small interfering RNA targeting NF-_B p65 alone or combined with 5-FU inhibits growth of esophageal squamous cell carcinoma in nude mice. **Pathol. Res. Pract.**, v. 208, p. 32-38, 2012.

UHL, R.G.; STEVENSON, A.; SIDOROV, V. Towards improved gene delivery: Flip of cationic lipids in highly polarized liposomes. **Chem. Commun.**, p. 383–385, 2007.

United States Pharmacopoeia USP 34, 2010

UNIVERSIDADE DO TEXAS, Estados Unidos. Antibody-targeted photodynamic therapy. PCT/US2004/006985. 8 de março de 2004. 7 de março de 2003. 28 de julho de 2005.

URIBE, P.; GONZALEZ, S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and squamous cell carcinoma of the skin: molecular bases for EGFR-targeted therapy. **Pathology-Research and Practice**, v. 207, p. 337-342, 2011.

WANG, Y.; YANG, Y.; YANG, Y.; LU, Y. Surgery combined with topical photodynamic therapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the lip. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, v. 14, p. 170-172, 2016.

VAN ETTEN, E.W.M.; KATE, M.T.T.; SNIJDERS, S.V.; BAKKER-WOUDENBERG, I.A.J.M. Administration of Liposomal Agents and Blood Clearance Capacity of the Mononuclear Phagocyte System. **Antimicrob. Agents. Chemother.,** v. 42, p. 1677-1681, 1998.

VERMA, D.D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. **Int. J. Pharm.**, v. 258, p. 141-151, 2003.

VERMOKEN, J.B.; MESIA, R.; RIVERA, F. et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 359, p. 1116–1127, 2008.

VIJAYAKUMAR, M. R.; KOSURU, R.; VUDDANDA, P.R.; SINGH, S.K.; SING, S. Trans resveratrol loaded DSPE PEG 2000 coated liposomes: An evidence for prolonged systemic circulation and passive brain targeting. J. Drug Deliv. Sci. Tec., v. 33, p. 125-135, 2016.

VUTLA, N.B.; BETLAGERI, G.V.; BANGA, A.K. Transdermal iontophoretic delivery of encephalin formulated in liposomes. **J. Pharm. Sci**, v. 85, p. 5-8, 1996.

WANG, Y.; YANG, Y.; YANG, Y.; LU, Y.Surgery combined with topical photodynamic therapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the lip. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, v. 14, p. 170-172, 2016.

WERSCHLER, W.P.; FAACS, F. Considerations for the use of fluorouracil cream 0,5% for the treatment of actinic keratosis in elderly patients. J. Clin. Aesthetic Dermatol., v. 1, p. 22-27, 2008.

WICKI, A.; RITSCHARD, R.; LOESCH, U.; DEUSTER, S.; ROCHLITZ, C.; MAMOT, C. Large-scale manufacturing of GMP-compliant anti-EGFR targeted nanocarriers: Production of doxorubicin-loaded anti-EGFR -immunoliposomes for a first-in-man clinical trial. **Int. J. Pharm.**, v. 484, p. 8-15, 2015.

WIKLANDER, O.P.B; NORDIN, J.Z.; O´LOUGHLIN, A.; GUSTAFSSON, Y.; CORSO, G.; MÄGER, I.; VANDER, P.; LEE, Y.; SORK, H.; SEOW, Y.; HELDRING, N.; ALVAREZ-ERVIT, L.; SMITH, C.E.; LE BLANC, K.; MACCHIARINI, P.; JUNGEBLUTH, P.; WOOD, M.J.A.; EL ANDALUSSI, S. Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. **J. Extracel. Vesicles**, v. 4, p. 26316, 2015.

WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Penetration enhancers. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. *56*, p. 603–618, 2004.

YANG, T. et al. Preparation and evaluation of paclitaxel-loaded PEGylated immunoliposome. **J. Control. Release** , v. 120, p.169–177, 2007.

ZHANG, Z.; WO, Y.; ZHANG, Y.; WANG, D.; HE, R.; CHEN, H.; CUI, D. In vitro study of ethosome penetration in human skin and hypertrophic scar tissue. **Nanomedicine**, v. 8, p. 1026-1033, 2012

ZHANG, T.; ZHOU, S.; HU, L.; PENG, B.; LIU, Y.; LUO, X.; SONG, Y.; LIU, X.; DENG, Y. Polysialic acid-modifying liposomes for efficient delivery of epirubicin, in-vitro characterization and in-vivo evaluation. **Int. J. Pharm.**, v. 515, p. 449-459, 2016.

ZUCO, V.; SUPINO, R.; FAVINI, E.; TORTORETO, M.; CINCINELLI, R.; CROCE, A.C.; BUCCI, F.; PISANO, C.; ZUNINO, F. Efficacy of ST1968 (namitecan) on a topotecan-resistant squamous cell carcinoma. **Biochem. Pharmacol.**, v. 79, p. 535-541, 2010.