

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

**Nanomedicina: Aplicação de anticorpos
monoclonais em nanossistemas na terapêutica
de cancro colorretal**

Carlos Alberto Salvador de Sousa

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Ana Grenha

2020

Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Química e Farmácia
Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Nanomedicina: Aplicação de anticorpos monoclonais em nanossistemas na terapêutica de cancro colorretal

Carlos Alberto Salvador de Sousa

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da Professora Doutora Ana
Grenha

FARO

2020

Nanomedicina: Aplicação de anticorpos monoclonais em nanossistemas na terapêutica de cancro colorretal

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

© 2020 Carlos Alberto Salvador de Sousa

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho, através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, à Professora Doutora Ana Margarida Grenha agradeço a confiança e a paciência, ao ter aceitado o desafio de orientar esta dissertação. Também pelo rigor manifestado no decurso deste trabalho, bem como a disponibilidade, apoio e esclarecimento de dúvidas.

À minha família, e em especial aos meus pais e aos meus irmãos, agradeço por toda a dedicação, apoio, orgulho, confiança que depositaram em mim, bem como pela força que sempre me transmitiram, impulsionando-me sempre a alcançar os meus objetivos.

Aos meus amigos, aos de sempre, que apoiaram em todos os momentos e pela compreensão e ajuda nos momentos complicados e aos novos, agradeço por toda a amizade e apoio, pelos bons momentos e boas memórias criadas, com alguns em especial destaque. A todos os que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu mais sincero agradecimento.

À minha equipa da Farmácia Baptista, agradeço pelos quatro anos em que demonstraram toda a disponibilidade possível, por todos os bons momentos e por todos os conhecimentos que me foram transmitidos para o meu enriquecimento profissional, bem como pela integração na equipa e companheirismo demonstrado, sem esquecer um agradecimento especial ao “*superturno*”, pela amizade, pelos excelentes momentos passados e boas noites vividas.

À equipa dos Serviços Farmacêuticos Hospital das Forças Armadas – Polo de Lisboa, por me mostrarem o que é ser farmacêutico num ambiente diferente e a importância do nosso trabalho em todas as alturas.

A todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para a minha formação, muito obrigado.

“What we know is a drop, what we don't know is an ocean.”

Isaac Newton

Resumo

O cancro colorretal (CCR) é um cancro que se desenvolve no intestino grosso, mais especificamente no cólon que é a parte mais comprida ou no reto, que é a parte final mais reta do intestino grosso. O CCR é o 3º cancro mais comum a seguir ao cancro da mama e da próstata, com uma taxa de incidência acima dos 30 casos por 100.000 habitantes em Portugal, afetando mais os homens do que as mulheres, tendo sido diagnosticados mais de 1,3 milhões de novos casos em 2012. O risco de desenvolver CCR é multifatorial, estando associado a fatores como o tabagismo, a obesidade, a inatividade física, o consumo elevado de carne vermelha, os fatores genéticos e sendo a idade o maior fator de risco.

A quimioterapia convencional, muitas vezes não consegue eliminar subpopulações de células cancerígenas altamente agressivas e dotadas de resistência à quimioterapia, as quais possuem a capacidade de melhorar a heterogeneidade do tumor e desenvolver metástases. Uma das abordagens para contornar estes problemas é a utilização de anticorpos monoclonais, sendo que este conceito foi proposto por Paul Ehrlich há mais de um século. O desenvolvimento da tecnologia de hibridomas em 1975 permitiu a produção de anticorpos monoclonais. Juntamente com a sua especificidade para o alvo, sendo relativamente bem tolerados e apresentando uma semi-vida longa, contribuíram para o sucesso no desenvolvimento de medicamentos. Os anticorpos monoclonais melhoram significativamente o tratamento de uma variedade de doenças humanas. Os mecanismos de ação mais bem descritos de anticorpos monoclonais terapêuticos incluem citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos, citotoxicidade dependente do complemento, fagocitose celular dependente de anticorpos e indução da morte celular.

De forma a melhorar a adesão à terapêutica e aumentar mais a especificidade é cada vez mais comum associar anticorpos monoclonais à nanomedicina. A nanomedicina tem vindo a desenvolver-se em grande escala nos últimos anos, nas áreas de terapêutica, diagnóstico e biossensores, agentes de imagem e monitorização e reparação e engenharia tecidual. As várias aplicações indicam, que a associação de anticorpos monoclonais à nanotecnologia melhora significativamente os resultados terapêuticos, pois os anticorpos têm elevada especificidade com efeitos secundários mais reduzidos e são o foco de muitos trabalhos de investigação em doenças que necessitam de tratamento clínico ou cirúrgico intensivo.

O objetivo desta monografia é explorar a utilização de anticorpos monoclonais em nanotecnologia no tratamento do cancro colorretal, abordando-se os diferentes

nanossistemas existentes e as suas potenciais vantagens, como forma de aumentar a especificidade para o CCR.

Palavras-chave: anticorpos monoclonais, cancro colorretal, nanomedicina, nanossistemas e nanotecnologia.

Abstract

Colorectal cancer (CRC) develops in the large intestine, more specifically in the colon, which is the longest part of in the rectum, which is the straightest end of the large intestine. CRC is the 3rd most common cancer after breast and prostate cancer, with an incidence rate above 30 cases per 100,000 inhabitants in Portugal, affecting men more than women. Around 1.3 million of new cases were diagnosed in 2012. The risk of developing CRC is multifactorial, being associated with factors such as smoking, obesity, physical inactivity, high consumption of red meat, genetic factors and with age being the biggest risk factor.

Conventional chemotherapy often fails to eliminate subpopulations of highly aggressive cancer cells that are resistant to chemotherapy, can improve tumor heterogeneity, develop metastasis and lack specificity. One of the approaches to solve these problems is the use of monoclonal antibodies, and this concept was proposed by Paul Ehrlich more than a century ago. The development of hybridoma technology in 1975 allowed the production of monoclonal antibodies. Together with its specificity for the target, being relatively well tolerated and presenting a long half-life, they contributed to the success in the development of medicines. Monoclonal antibodies significantly improve the treatment of a variety of human diseases. The best-described mechanisms of action of therapeutic monoclonal antibodies include antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, complement-dependent cytotoxicity, antibody-dependent cell phagocytosis, and apoptosis.

To improve adherence to therapy and increase the specificity even more, it is increasingly common to associate monoclonal antibodies to nanomedicine. Nanomedicine has been developing on a large scale in recent years, not only in the therapeutic area, where there are applications by various routes of administration (ex: topical, oral, parenteral, pulmonary, etc.), but also in diagnostic and biosensors, imaging and monitoring agents and tissue repair and engineering. This proves that nanotechnology associated with monoclonal antibodies significantly improves therapeutic results, as they have high specificity with reduced side effects and are the focus of many studies on diseases that need intensive clinical or surgical treatment.

The objective of this work is to explore the use of monoclonal antibodies in nanotechnology in the treatment of CRC, addressing the different existing nanosystems and their potential advantages, as a way of increasing the specificity for CRC.

Keywords: colorectal cancer, monoclonal antibodies, nanomedicine, nanosystems and nanotechnology.

Índice

Índice de figuras	x
Índice de Tabelas	xii
Lista de Abreviaturas	xiii
1. Introdução	1
2. Metodologia	2
3. Cancro Colorretal	3
3.1. Patogénese	4
3.2. Epidemiologia e etiologia	5
3.3. Sinais e Sintomas.....	7
3.4. Fatores de risco	8
3.5. Diagnóstico.....	8
Endoscopia.....	9
Colonoscopia por tomografia computadorizada	10
Biópsia.....	10
Exames	10
3.6. Estadiamento	10
4. Nanotecnologia	12
4.1. Nanomedicamentos	13
4.2. Desenvolvimento de nanossistemas para veiculação de fármacos.....	13
4.2.1. Nanopartículas Poliméricas	15
4.2.2. Nanopartículas Lipídicas	19
4.2.3. Nanopartículas Inorgânicas	21
5. Anticorpos Monoclonais	24
5.1. Tipos de anticorpos monoclonais	25
5.1.1. Murinos.....	25
5.1.2. Quiméricos.....	26
5.1.3. Humanizados	27
5.1.4. Humanos.....	28
5.2. Bevacizumab.....	29
5.4. Panitumumab	31
6. Aplicação de anticorpos monoclonais em nanossistemas no âmbito do tratamento de CCR	32
6.1. Bevacizumab.....	32
6.2. Cetuximab.....	38
Conclusão	50

Referências Bibliográficas.....	51
--	-----------

Índice de figuras

Figura 3.1 - Representação do intestino grosso, a sua divisão anatómica e os principais gânglios linfáticos..	3
Figura 3.2 - Demonstração do exame Sigmoidoscopia.	9
Figura 3.3 - Demonstração do exame de Colonoscopia.....	9
Figura 3.4 - Representação dos diferentes estadios do CCR.....	12
Figura 4.1 - Metodologia de desenvolvimento para nanossistemas... ..	14
Figura 4.2 - Classificação dos grupos e sub-grupos das nanopartículas.....	15
Figura 4.3 - Representação da estrutura de uma nanocápsula e de uma nanoesfera... ..	16
Figura 4.4 – Diferença estrutural de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.	17
Figura 4.5 - Estrura de um dendrão e um dendrímero.. ..	19
Figura 4.6 - Estrutura de Lipossoma.....	20
Figura 4.7 - Estrutura de nanopartícula lipídica sólida.....	21
Figura 4.8 - Estrutura de um transportador de lípidos nanoestruturado.....	21
Figura 4.9 - Nanotubos de parede única (esquerda) e nanotubo de parede múltipla (direita).....	23
Figura 5.1 - Técnica de hibridização celular somática.....	26
Figura 5.2 - Conteúdo dos vários tipos de anticorpos monoclonais.....	27
Figura 6.1 - Representação da construção da formulação. As nanopartículas de sílica mesoporosa são preenchidas com supressor tumoral miR-328 e revestidas com polidopamina.	33
Figura 6.2 - Representação da construção da formulação. Após o revestimento com polidopamina são associados dois polímeros associados previamente, um com aptâmero e outro com bevacizumab, o que resulta na formulação final.	33
Figura 6.3 - Percentagem de apoptose para o grupo de controlo, para o grupo em que foi administrada a formulação sem bevacizumab e para o grupo em que foi administrada a formulação com bevacizumab.....	34
Figura 6.4 - Viabilidade celular das células de cancro colorretal no grupo de controlo, no sistema sem bevacizumab e no sistema com bevacizumab, para tempos de incubação de 12, 24 e 48 horas.....	35
Figura 6.5 - Comparação da inibição de crescimento tumoral HT29, nos 5 grupos testados com bevacizumab livre, o sistema B-NP-PEG, o sistema NP-PEG, HSA-PEG e solução salina.	36
Figura 6.6 - Concentrações de VEGF séricas no ratinhos para cada grupo.....	37

Figura 6.7 - Quantificação de bevacizumab sérica nos ratinhos para os grupos administrados com bevacizumab livre com uma dose administrada de 5mg/kg, por intravenoso, duas vezes por semana e com o sistema B-NP-PEG.....	37
Figura 6.8 - Níveis de bevacizumab tumorais nos ratinhos para os grupos administrados com bevacizumab livre com uma dose administrada de 5mg/kg, por intravenoso, duas vezes por semana e com o sistema B-NP-PEG.....	38
Figura 6.9 - Representação da construção da formulação.....	40
Figura 6.10 - Absorção celular em horas para os 3 tipos de células de cancro colorretal..	41
Figura 6.11 - Percentagens de necrose, apoptose e apoptose tardia para os três tipos de células de CCR, HCT116, HT29 e SW620, em três situações, grupo de controlo, apenas com cetuximab e nanossistema com cetuximab.....	42
Figura 6.12 - Formulação do sistema NanoZnD que consiste num núcleo de nanopartículas de ouro cobertas com PEG com o composto antineoplásico de zinco e doxorrubicina (ZnD), embebidas com albumina de soro bovino (BSA) e cetuximab (CTX) acoplado.....	43
Figura 6.13 - Resultado da contagem de células para a preparação de zinco e doxorrubicina (ZnD) comparando com o grupo de controlo.....	43
Figura 6.14 - Valores da viabilidade celular para as células HCT116 e HCT116DR nas 5 preparações, para incubações de 24 e 48 horas.	45
Figura 6.15 - Construção da formulação de nanocelas de apoferritina que foi preenchida com oxaliplatina e se acoplou à superfície um conjugado de PEG com panitumumab.	46
Figura 6.16 - Viabilidade celular no grupo SW620 em 5 grupos diferentes, grupo de controlo, grupo administrado com panitumumab (PAN), grupo com sistema de nanocelas de apoferritina com panitumab e oxaliplatina, grupo com o sistema sem panitumumab e grupo com oxaliplatina livre.	47
Figura 6.17 - Viabilidade celular no grupo HCT116 em 5 grupos diferentes, grupo de controlo, grupo administrado com panitumumab (PAN), grupo com sistema de nanocelas de apoferritina com panitumab e oxaliplatina, grupo com o sistema sem panitumumab e grupo com oxaliplatina livre.	48
Figura 6.18 - Percentagem de apoptose, apoptose tardia e de células vivas dos grupos SW 620 e HCT 116 em incubações de 24 e 48 horas.....	49

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Mortalidade Regional por Cancro Colorretal.....	7
---	---

Índice de Tabelas

Tabela 3.1 - Principais genes afetados que levam a cancro colorretal.....	5
Tabela 3.2 - Indicadores de mortalidade relativos a Tumor Maligno do Cólon Reto, por sexo, em Portugal.....	6
Tabela 3.3 - Descrição da localização do tumor primário do CCR.	11
Tabela 3.4 - Descrição dos gânglios linfáticos do CCR.....	11
Tabela 3.5 - Descrição das metástases do CCR.....	11
Tabela 5.1 - Características do Bevacizumab.....	30
Tabela 5.2 - Características do Cetuximab.	31
Tabela 5.3 - Características do Panitumumab.	32
Tabela 6.1 - Concentração necessária de celecoxib para inibir 50% da proliferação celular de cada grupo.	39

Lista de Abreviaturas

AbMo – Anticorpo monoclonal

ADCC – Citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos do inglês *antibody dependent cellular cytotoxicity*

ADCP – Fagocitose celular dependente de anticorpos, do inglês *antibody dependent cellular phagocytosis*

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AFO – Nanocelas de apoferritina preenchidas com oxaliplatina e ligadas a um conjugado de polietilenoglicol

AFPO – Nanocelas de apoferritina preenchidas com oxaliplatina e ligadas a um conjugado de polietilenoglicol e panitumumab

Apt – Aptâmero

AuNP – Nanopartículas de ouro, do inglês *gold nanoparticles*

AuNP@PEG@CTX – Nanopartículas de ouro com polímeros de polietilenoglicol e moléculas de cetuximab acopladas

AuNP@PEG@ZnD – Nanopartículas de ouro com polímeros de polietilenoglicol e compostos de zinco de doxorubicina anexadas

BEVA – Bevacizumab

B-NP-PEG – nanopartículas de albumina de soro humano revestidas com revestimento de polietilenoglicol e preenchidas com bevacizumab

cADN – cópia de ADN

CCR – Cancro colorretal

CDC – Citotoxicidade dependente do complemento

CDR – Regiões determinantes complementares, do inglês *complementarity-determining regions*

CLX – Celecoxib

CTX – Cetuximab

EGFR – Recetor do fator de crescimento epidérmico, do inglês *epidermal growth factor receptor*

HACA - Anticorpo quimérico humano, do inglês *human and chimeric antibody*

HAMA – Anticorpo humano contra anticorpo quimérico

HC-cADN – cópia de ADN de cadeia pesada

HPMA – Co-polímero de N-(2-hidroxipropil metacrilato)

HSA – Albumina de soro humano, do inglês *human serum albumin*

IgG – Imunoglobulina G

IL – Imunolipossoma

IV – via intravenosa

MSNs – Nanopartículas de sílica mesoporosa, do inglês *mesoporous silica nanoparticles*

MSNs-miR-328 - Nanopartículas de sílica mesoporosa preenchida com supressor tumoral miR-328

MSNs-miR-328@PDA - Nanopartículas de sílica mesoporosa preenchida com supressor tumoral miR-328 e revestida com polidopamina

MSNs-miR-328@PDA-PEG-Apt - Nanopartículas de sílica mesoporosa preenchida com supressor tumoral miR-328, revestida com polidopamina com co-polímeros de aptâmero acoplados

MSNs-miR-328@PDA-PEG-Apt-Bev - Nanopartículas de sílica mesoporosa preenchida com supressor tumoral miR-328, revestida com polidopamina com co-polímeros de polietilenoglicol com aptâmero e bevacizumab acoplados

NanoZnD – Nanopartículas de ouro cobertas com polímero de polietilenoglicol com o compostos de zinco e doxorrubicina anexados, embebidos em albumina de soro bovino e moléculas de cetuximab acopladas

NLC – Transportadores lipídicos nanoestruturados, do inglês *nanostructured lipid carriers*

NP-PEG – nanopartículas de albumina de soro humano revestidas com revestimento de polietilenoglicol

PAN – Panitumumab

PCL – Poli-(caprolactona)

PDA – Polidopamina

PEG – Polietilenoglicol

PGA – Poli-(ácido glutâmico)

PLA – Poli-(ácido láctico), do inglês

PLGA – Poli-(ácido D,L-lático-co-glicólico), do inglês *poly-(lactic-co-glycolic D,L acid)*

PoCR – reação em cadeia da polimerase, do inglês *polymerase in chain reaction*

RMI – Ressonância magnética

SLN – Nanopartículas lipídicas sólidas, do inglês *solid lipid nanoparticles*

SN-38 – Antineoplásico análogo da camptotecina

SWNT – Nanotubos de parede única do inglês *single wall nano tubes*

SWNT-COOH – Nanotubos de parede única com grupos carboxílicos anexados

SWNT-PEG6000-NH₂ – Nanotubos de parede única com polímeros de polietilenoglicol acoplados

SWNT/py38 – Nanotubos de parede única com cadeias de SN-38 anexadas

SWNT-25/py38 – Nanotubos de parede única com cadeias de SN-38 e cadeias de cetuximab anexadas

UE – União Europeia

V-cADN – cópia de ADN da região variável de murino

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular, do inglês *vascular endothelial growth factor*

ZnD – Composto de zinco e doxorrubicina

1. Introdução

O cancro colorretal (CCR) é o terceiro cancro mais comum em homens e o segundo em mulheres. A incidência é maior no sexo masculino com uma razão de 1:4. Com 608.000 mortes estimadas a cada ano, aproximadamente 8% de todas as mortes por cancro, o CCR é a quarta causa de morte relacionada com cancro, mais comum no mundo (1).

Em 2012 foram diagnosticados cerca de 14 milhões de novos casos de cancro e 8 milhões de mortes por cancro mundialmente. Em 2015 ocorreram cerca de 16,6 milhões de mortes devido a cancro e especula-se que em 2030, o número de novos casos chegue aos 21 milhões (2,3). Em 2009, o custo económico do cancro na União Europeia (UE) foi de 126 mil milhões de euros, dos quais 12% (15 mil milhões) se destinaram ao cancro da mama. Os custos diretos de tratamento correspondem a 40% destes valores (4).

A nanomedicina utiliza ferramentas, tal como o nome indica, à escala nanométrica para o diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças e para obter maior compreensão da complexa fisiopatologia subjacente à doença. O objetivo final é melhorar a qualidade de vida de doentes (5). A aplicação da nanotecnologia mudou o ambiente da indústria farmacêutica e de biotecnologia para produzir medicamentos mais seguros e eficientes. O sistema de administração de fármacos, bem como a taxa exponencial de descobertas baseadas em nanopartículas, levaram ao aumento do interesse pela nanomedicina (6).

Os anticorpos monoclonais (AbMo) melhoram significativamente o tratamento de uma variedade de doenças humanas. Os mecanismos de ação mais bem descritos de anticorpos monoclonais terapêuticos incluem citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC), citotoxicidade dependente do complemento (CDC), fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP), indução da morte celular, e envolvimento de recetores superficiais de células (7). De forma a melhorar a adesão à terapêutica e aumentar mais a especificidade, é cada vez mais comum associar anticorpos monoclonais à nanotecnologia. Estes novos sistemas, com as suas propriedades únicas, criaram várias estratégias para superar as complicações e eliminar as "falhas" dos tratamentos convencionais, a fim de estabelecer melhores resultados terapêuticos (8).

Congregando todos os aspetos descritos, esta dissertação tem como principal objetivo descrever os anticorpos monoclonais que são utilizados em nanossistemas com

aplicação na terapêutica de cancro colorretal, abordando as suas características, vantagens e desvantagens e resultados obtidos na sua aplicação.

2. Metodologia

Pretende-se com esta dissertação de mestrado a elaboração de uma revisão bibliográfica que demonstre as aplicações de anticorpos monoclonais em nanossistemas na terapêutica de cancro colorretal, fornecendo informação atualizada e sistematizada de modo a encontrar resposta ao objetivo colocado.

A metodologia utilizada consistiu numa revisão de diversas fontes bibliográficas, realizada através de pesquisa de artigos científicos em várias bases de dados, nomeadamente, *PubMed*, *Web of Knowledge*, B-On, Elsevier, entre outras. Após a seleção dos artigos, que possuam uma apresentação lógica e estruturada da investigação mais relevante sobre a temática, a informação dos mesmos foi posteriormente cruzada de forma a aumentar a exatidão das conclusões retiradas. Os termos de pesquisa utilizados foram: cancro colorretal, anticorpos monoclonais, nanomedicina, nanotecnologia e nanossistemas, tanto em português como em inglês.

Assim sendo, com esta dissertação pretende-se apresentar conclusões relevantes sobre o tema, através da citação de estudos desenvolvidos pelos mais diversos autores ao longo do tempo com uma apresentação lógica e estruturada da investigação mais relevante sobre a temática, com vista a identificar o estado do conhecimento sobre o tema, variáveis e resultados já existentes.

3. Cancro Colorretal

O CCR, desenvolve-se no intestino grosso, especificamente no cólon ou no reto. Aproximadamente 96% são adenocarcinomas que resultam do crescimento prolongado e lento de pólipos ou adenomas pré-cancerosos, na parede interna do cólon e do reto. Entre esses, 10% podem evoluir para cancro invasivo (9,10).

A maioria do CCR surgem no cólon sigmoide e no reto, representado na figura 3.1, em que apresentam tendencialmente um aumento de carcinomas, localizados na porção proximal, com o aumento de idade dos indivíduos (11).

Uma vez estabelecidas, essas células cancerígenas podem-se espalhar para a parede colorretal e potencialmente invadir os vasos sanguíneos ou linfáticos, levando a metástases em órgãos e tecidos distantes, como fígado ou pulmões (10,12).

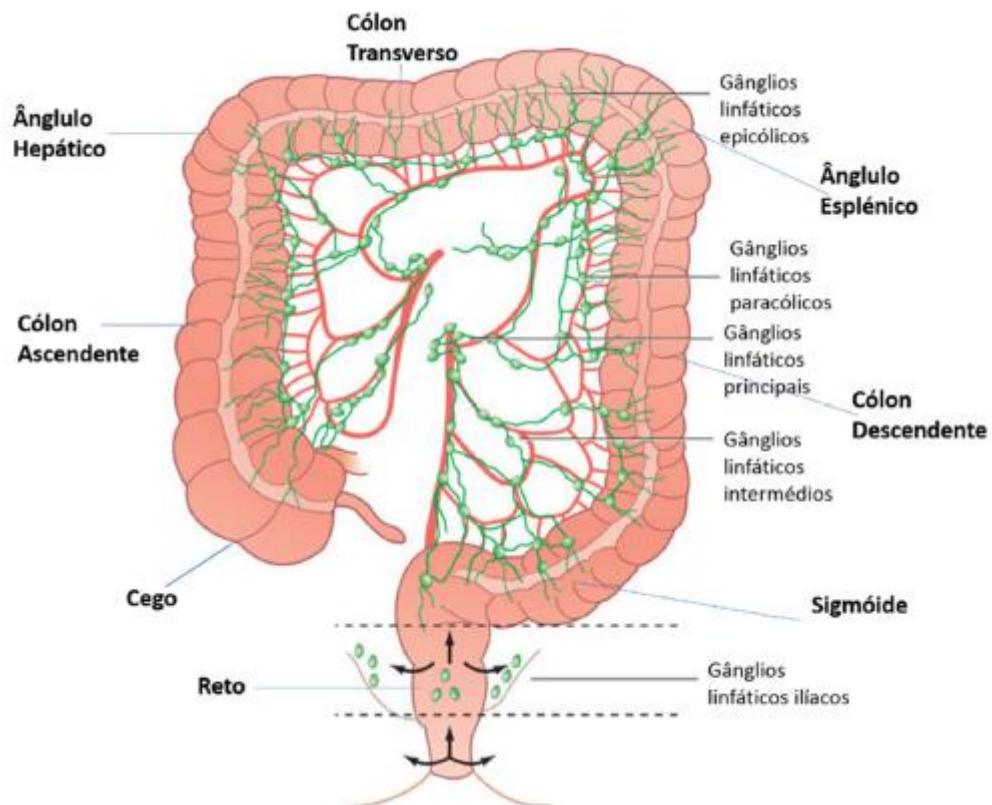


Figura 3.1 - Representação do intestino grosso, a sua divisão anatômica e os principais gânglios linfáticos. Adaptado de (11).

O sistema digestivo consiste no trato digestivo, desde a boca até ao ânus e está associado a órgãos acessórios, glândulas primárias com localização exterior ao trato digestivo. A porção mais distal do colon é o reto e está localizado na pélvis, terminando no canal anal, demonstrado na figura 3.1. A principal função do intestino grosso é transformar o quimo, produzido nas fases anteriores da digestão, em fezes que são armazenadas até à sua eliminação. Durante este processo ocorre reabsorção de água e sais solúveis, secreção de muco e grande atividade bacteriana (13).

O reto está localizado na pélvis e estende-se desde a mucosa anal até ao colón sigmóide, apresentando cerca de 10 a 15 cm, que correspondem à parte final do intestino grosso, demonstrado na figura 3.1. Ao longo deste percurso é produzido muco que lubrifica, permite o fluxo e protege contra a ação de ácidos produzidos pelas bactérias (13).

3.1. Patogénese

O CCR resulta dos efeitos acumulativos de múltiplas alterações genéticas sequenciais, tais como mutações do ácido desoxirribonucleico (ADN). Os proto-oncogenes, genes supressores tumorais e genes reparadores do ADN são afetados por alterações genéticas que contribuem para o cancro (14).

O CCR desenvolve-se, geralmente, a partir da mucosa normal, começando por um processo benigno, os pólipos, que por sua vez podem progredir para doença invasiva. Em 1990, Fearon & Vogelstein, propuseram o primeiro modelo genético para a tumorigénese colorretal, denominado por sequência adenocarcinoma (15).

Este modelo postula:

- o aparecimento da neoplasia depende da ativação de oncogenes juntamente com a inativação de genes supressores de tumores;
- para que a transformação seja maligna e necessária a presença de mutações em pelo menos, quatro a cinco genes
- o número total de alterações é mais importante do que a sua ordem de aparecimento.

No entanto, é também reconhecido que apenas uma pequena porção de adenomas progredem para carcinoma invasivo e que a história natural dos adenomas, pólipos hiperplásicos e carcinomas é extremamente variável (16).

Os proto-oncogenes estão envolvidos no crescimento e divisão normal das células que se podem tornar causadores de cancro, ou seja, oncogenes. Os genes supressores de tumores atuam no controlo do crescimento e divisão celular conduzindo a uma divisão celular descontrolada. Os genes reparadores de ADN, quando sofrem mutações não conseguem de reparar o ADN alterado, o que leva a mutações adicionais noutros genes. A soma de todos estes fatores pode ser a origem de células cancerígenas (14).

Os principais genes afetados estão representados na tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Principais genes afetados que levam a cancro colorretal. Adaptado de (17).

Gene	Tipo	Estado	Frequência da Mutação (Aproximado)	Consequências
APC	Supressor Tumoral	Adenoma Inicial	70%	A inativação do gene leva à ativação da via de sinalização WNT, proliferação e diferenciação do epitélio colorretal
BRAF, KRAS	Oncogene	Adenoma Intermediário	10% 35%	Ativação da via MAPK
SMAD2, SMAD4, TGFBR2	Supressor Tumoral	Adenoma Avançado	5%, 10%, 15%	A perda do cromossoma 18q leva à diminuição da via de sinalização do TGF- β
TP53	Supressor Tumoral	Adenocarcinoma	50%	A perda do cromossoma 17p leva ao aumento do stress celular com danos no ADN
MLH1	<i>Gene Mutator</i>	Via Alternativa de Carcinogénese	10%	Afeta a reparação de ADN defeituoso

3.2. Epidemiologia e etiologia

O CCR é o 3º cancro mais comum a seguir ao cancro da mama e da próstata, com uma taxa de incidência acima dos 30 casos por 100.000 habitantes em Portugal, afetando mais os homens do que as mulheres. Em 2012 foram, diagnosticados mais de 1,3 milhões de novos casos, sendo mais prevalente nas regiões mais desenvolvidas com incidência a variar com a área geográfica (2).

Na Europa, o CCR é a segunda causa de morte em ambos os géneros e cerca de 1 em cada 20 homens e 1 em cada 35 mulheres irá desenvolver CCR em algum momento da sua vida. Por outras palavras, é diagnosticado cancro colorretal a cerca de 35 em cada 100.000 homens e 25 em cada 100.000 mulheres. A maioria dos doentes com cancro colorretal tem mais de 60 anos na altura do diagnóstico, sendo que o cancro colorretal é raro em pessoas com idade inferior a 40 anos (18,19).

A mortalidade global atribuída ao CCR e cerca de metade da sua taxa de incidência tendo ocorrido, mundialmente, 694.000 mortes no ano de 2012. Nas últimas duas décadas tem-se verificado uma tendência de diminuição da mortalidade o que, provavelmente, se deve ao aumento da deteção da doença em estadios mais precoces.

Nos Estados Unidos da América, o número estimado de novos casos de CCR em 2019 foi de 145 mil, o que representa 8,3% dos novos casos de cancro e número estimado de mortes por CCR foi de 51 mil, o que representa cerca de 8,4% de mortes por cancro (20).

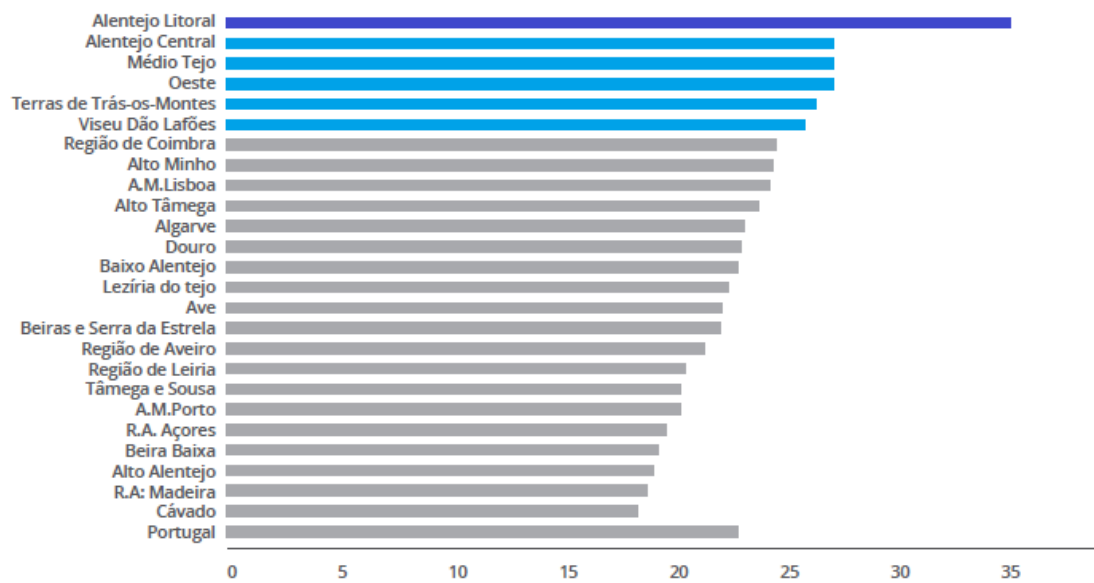
A mortalidade por sexo e a taxa de mortalidade por 100.000 habitantes em Portugal, entre 2011 e 2015, estão indicados na tabela 3.2, que nos indica que o número de óbitos por CCR foi aumentado de 2011 para 2015, com exceção no ano de 2014 que demonstrou uma diminuição no número de óbitos, enquanto que nas mulheres foi diminuindo de 2011 para 2015, com exceção no ano 2013 que sofreu um ligeiro aumento no número de óbitos. Em termos de número de óbitos conclui-se que morrem cerca de 11 pessoas por ano, devido ao CCR.

Tabela 3.2 - Indicadores de mortalidade relativos a Tumor Maligno do Cólon e Reto, por sexo, em Portugal. Adaptado de (19).

Tumor Maligno do Cólon e Reto					
	2011	2012	2013	2014	2015
H/M					
Número de óbitos	3791	3776	3803	3760	3812
Taxa de mortalidade por 100.000 Habitantes	21,6	21,2	21,2	20,5	20,5
Homens					
Número de óbitos	2161	2222	2213	2181	2284
Taxa de mortalidade por 100.000 Habitantes	29,6	29,7	29,4	28,3	29,1
Mulheres					
Número de óbitos	1630	1552	1590	1579	1525
Taxa de mortalidade por 100.000 Habitantes	15,6	14,9	14,1	14,7	16,8

Em termos de mortalidade, o gráfico 1 mostra os dados de Portugal divididos por regiões por cada 100.00 habitantes em Portugal. Este indica que a região com maior mortalidade é o Alentejo Litoral, seguido pelo Alentejo Central, Médio Tejo e Oeste, com mortalidade semelhante (19).

Gráfico 1 - Mortalidade Regional por Cancro Colorretal. Adaptado de 2017 (19).



Segundo o Plano Regional de Oncologia do Alentejo, em 2013 o carcinoma do colon foi o mais diagnosticado na região do Alentejo e o carcinoma do reto foi o quinto. Cerca de 20 a 25% dos doentes diagnosticados necessitam de intervenção cirúrgica de urgência e 25% dos doentes apresentam doença metastática à data do diagnóstico (21).

3.3. Sinais e Sintomas

Os principais sintomas de um tumor colorretal em estadio inicial são frequentemente vagos e dependem da localização do tumor no intestino. Num estadio muito inicial, a maioria dos cancros colorretais não provoca quaisquer queixas ou sintomas (18,22). Estes podem incluir:

- Mudança nos hábitos intestinais, incluindo diarreia ou obstipação
- Fezes pastosas de cor escura;
- Fezes afiladas (em fita);
- Sangramento retal ou sangue nas fezes;
- Desconforto abdominal persistente, como cólicas, gases ou dor;
- Sensação de esvaziamento incompleto do intestino;
- Fraqueza ou fadiga;
- Perda de peso inexplicável;
- Náuseas e vômitos;
- Sensação dolorida na região anal, com esforço ineficaz para evacuar.

Por vezes, com o crescimento tumoral, poderá ocorrer perda de sangue que não é visível a olho nu e pode provocar uma carência de ferro e/ou anemia, causar sintomas de fadiga e falta de ar e até obstrução intestinal (17,22).

3.4. Fatores de risco

O CCR é uma doença muito heterogénea com um risco de desenvolvimento que aumenta com a idade e com a presença de lesões como os pólipos adenomatosos e doença inflamatória do intestino, como doença de Crohn e colite ulcerosa. O risco genético familiar associado a síndromes hereditárias e a história familiar de CCR constituem também fatores de risco elevados para o seu desenvolvimento. Existem ainda fatores ambientais que parecem também contribuir para o aumento do risco do seu desenvolvimento. Os fatores de risco modificáveis estão relacionados com o estilo de vida, que incluem a dieta alimentar, nomeadamente uma alimentação rica em gordura, carnes vermelhas e alimentos processados e pobre em fibra, um estilo de vida sedentário, obesidade e síndrome metabólica, consumo excessivo de álcool e tabagismo. Os fatores de risco não modificáveis são os fatores não controláveis, que incluem idade superior a 50 anos, raça e etnia, história pessoal de pólipos colorretais ou CCR, historial de doença inflamatória intestinal, colite ulcerosa ou doença de Crohn, Síndrome de Lynch ou diabetes mellitus tipo 2 (23–25).

3.5. Diagnóstico

Quando existem suspeitas de CCR, devido à presença de um ou mais sintomas, ou a idade ou saúde em geral gerem essa suspeição, devem-se realizar alguns testes ou exames para confirmar o diagnóstico. O cancro pode demorar vários anos para se desenvolver e a deteção nos estadios iniciais aumenta significativamente a eficácia de tratamento (25).

Em 2003 o *National Cancer Policy Board*, estimou que um investimento de pequenas dimensões para implementar rastreios, rápidos e eficazes, resultaria numa queda de 29% em mortes de cancro num espaço de 20 anos. Os exames de diagnóstico permitem detetar e distinguir o CCR de outro tipo de lesões benignas, permitindo também identificar o estadio e a fase em que se encontra o tumor, de forma a estabelecer a terapêutica a aplicar ao doente (14,26,27).

É recomendada a realização de testes de rastreio, pois permitem a deteção do cancro numa fase inicial, e a prevenção do CCR pela remoção de pólipos antes de se tornarem cancerígenos assim como cancros em estadios iniciais para os quais o tratamento é menos extensivo e mais eficaz (9).

Vários tipos de testes podem ser utilizados para detecção do cancro colorretal:

Endoscopia

- **Sigmoidoscopia:** uma sonda iluminada, sigmoidoscópio, é inserida no reto e no cólon inferior, para detetar pólipos e outras anomalias, ilustrado na figura 3.2 (14).

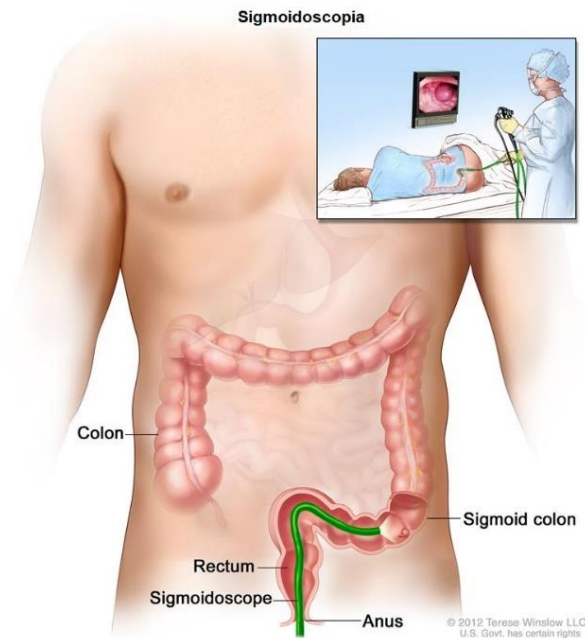


Figura 3.2 - Demonstração do exame Sigmoidoscopia. Adaptado de National Cancer Institute, 2019 (12).

- **Colonoscopia:** Uma sonda iluminada, colonoscópio, é inserida no reto e em todo o cólon, para detetar pólipos e outras anomalias, ilustrado na figura 3.3 (14).

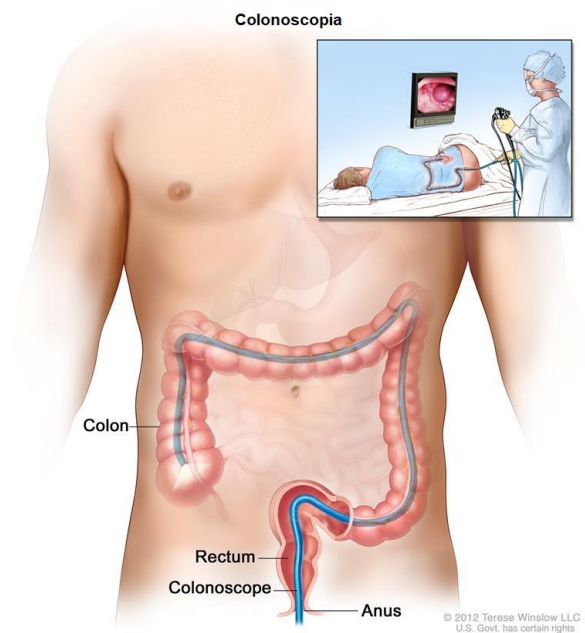


Figura 3.3 - Demonstração do exame de Colonoscopia. Adaptado de (14).

As vantagens da colonoscopia em relação à sigmoidoscopia incluem nomeadamente a possibilidade de remover pólipos através de biópsia e o exame abrange todo o cólon, e não somente a parte inferior (14).

Colonoscopia por tomografia computadorizada

É um exame processado por tomografia computadorizada para criar fotos do cólon. Um computador reúne as imagens para criar imagens detalhadas que podem mostrar pólipos e qualquer outro efeito que pareça incomum na superfície interna do cólon (14).

Biópsia

Consiste na remoção de células ou tecidos para que possam ser examinados ao microscópio por um patologista para verificar se há sinais de cancro (14).

Exames

- Retal: utilização de luvas e lubrificante, em que é colocado o dedo dentro do reto do doente, e são procuradas áreas anormais (14).
- Sangue oculto nas fezes: teste que verifica a presença de sangue nas fezes. Dois tipos de testes podem ser utilizados para detetar sangue oculto nas fezes: químico ou imunoquímico. A sensibilidade do teste imunoquímico é superior ao teste químico, sem causar uma redução inaceitável em especificidade (14).

3.6. Estadiamento

O estadiamento é um procedimento importante para estabelecer o prognóstico dos pacientes com CCR em que o sistema mais usado é o sistema TNM. Este sistema avalia o tamanho e localização do tumor principal (T), o grau de propagação para os gânglios linfáticos (N) e metástases à distância (M), sendo diferente para cada tipo de cancro. A combinação destes três determina o estadiamento do cancro (Tabela 2, 3 e 4) (26,28).

Tabela 3.3 - Descrição da localização do tumor primário do CCR. Adaptado de (28).

Tumor primário (T)		
TX	Não pode ser avaliado	
T0	Não existe evidência de tumor primário	
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>	
T1	Tumor invade submucosa	
T2	Tumor invade a musculatura própria	
T3	Tumor invade a musculatura própria até aos tecidos peri-colorretais	
T4	T4a	Tumor penetra na superfície do peritoneu visceral
	T4b	Tumor invade diretamente outros órgãos ou estruturas

Tabela 3.4 - Descrição dos gânglios linfáticos do CCR. Adaptado de (28).

Gânglios linfáticos (N)		
NX	Não pode ser avaliado	
N0	Não há manifestação de metástases em gânglios linfáticos	
N1	N1a	Metástases em 1 gânglio linfático
	N1b	Metástases em 2 a 3 gânglios linfáticos
	N1c	Depósitos na serosa, mesentério, tecidos peri-cólicos ou retais
N2	N2a	Metástases em 4 a 6 gânglios linfáticos
	N2b	Metástases em 7 ou mais gânglios linfáticos

Tabela 3.5 - Descrição das metástases do CCR. Adaptado de (28).

Metástases (M)		
M0	Não existem metástases	
M1	M1a	Existem metástases num órgão ou estrutura
	M1b	Existem metástases em mais do que um órgão ou estrutura

Depois de estabelecido o TNM do CCR é possível descrever o estadió em que se encontra, representado na figura 3.4.

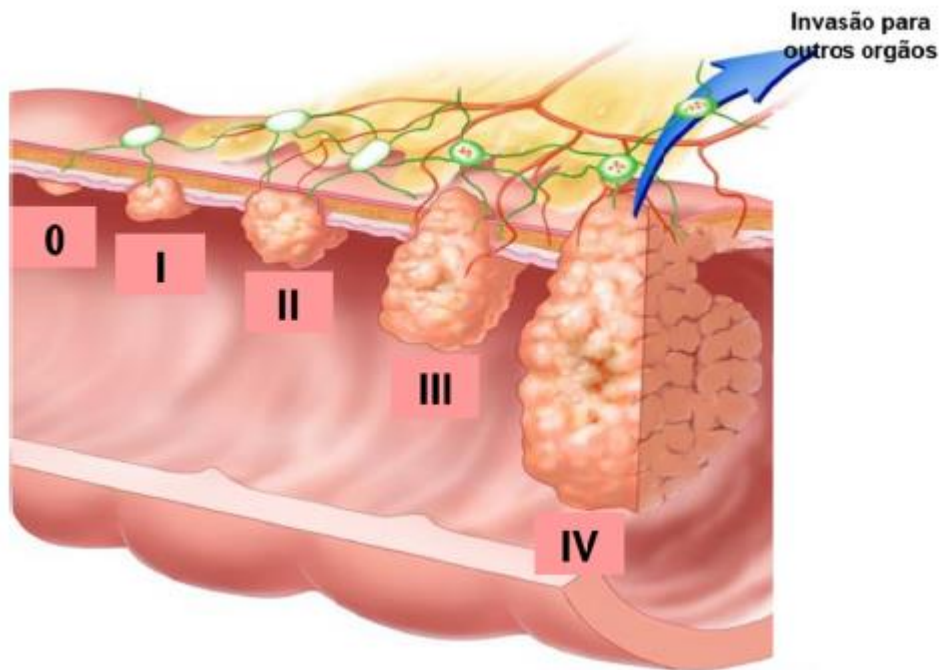


Figura 3.4 - Representação dos diferentes estádios do CCR. Adaptado de (29).

Para cada um dos estádios é possível observar a extensão da lesão ao nível da parede do cólon, do envolvimento dos gânglios linfáticos regionais e da existência de metástases a distância.

4. Nanotecnologia

A nanotecnologia é vista como uma manipulação de materiais à escala supramolecular. Esta inclui o design, produção, caracterização e aplicação de materiais em nanoescala, incluindo tecnologias novas e avançadas que permitem o uso de macromoléculas. A nanotecnologia lida com estruturas de dimensões muito pequenas, em que existe uma corrente mais conservadora que indica que sistemas nano estão inseridos numa escala de 1 a 100 nm, mas na área da entrega de fármaco é genericamente aceite que sistemas até 1000 nm são também sistemas nano (30–32).

Quando esta tecnologia é aplicada à medicina, adquire o nome de nanomedicina, que apresenta um forte potencial para diagnóstico de patologias, assim como na produção de novos agentes terapêuticos. Neste campo, o objetivo é manipular matéria de modo a obter nanossistemas que apresentem interação privilegiada com as células humanas, permitindo alcançar um maior número de soluções para o diagnóstico e terapêutica, estimulando os mecanismos de reparação endógenos (33,34).

A nanomedicina, continua a ser uma denominação muito ampla, que inclui nanomedicamentos, nanoagentes de imagiologia e diagnóstico. Os nanomedicamentos

podem ser desenvolvidos tanto como sistemas de veiculação de fármacos como medicamentos biologicamente ativos, com a restrição de que o termo engloba sistemas complexos de escala nanométrica, compostos pelo menos por dois componentes, um dos quais é o princípio ativo (35).

4.1. Nanomedicamentos

Na segunda metade do século XX começam a surgir os primeiros nanomedicamentos, rodeados de grande ceticismo por parte da comunidade clínica, que punha em causa o seu potencial terapêutico tendo em conta o seu tamanho, a real aplicação para produção industrial e a sua viabilidade económica (35).

A promoção da investigação e da descoberta de mecanismos coloidais para a veiculação de fármacos em 1960 e 1970, conduziu ao desenvolvimento de nanotecnologias que incluíam lipossomas, nanopartículas e nanocápsulas, complexos fármaco-ADN, e conjugados de fármaco-polímero (36).

A partir dos anos 90, as nanopartículas de óxido de ferro começaram a ser aplicadas em soluções para infusão parental, para tratar anemias e como agentes de imagem para ressonância magnética (RMI). Conjugados de anticorpo-fármaco, albumina-fármaco, e blocos micelares co-poliméricos foram as tecnologias que se seguiram (6).

No que diz respeito a novos meios de administração, podemos constatar que a maioria dos fármacos antineoplásicos usados atualmente é insolúvel em água. Isso requer a utilização de solventes especiais e meios de administração intravenosa na maioria dos casos. Utilizando as nanopartículas, vários desses medicamentos podem ser convertidos em formulações orais ou manipulados em nanocristais que podem ser suspensos em água, tornando, assim, possível a sua administração oral (5).

4.2. Desenvolvimento de nanossistemas para veiculação de fármacos

Quando se fala em nanossistemas para veiculação de fármacos e imagiologia existem vários aspetos a considerar. De acordo com a sua aplicação terapêutica, o nanossistema em desenvolvimento deve ser otimizado tendo em conta a dosagem, a via de administração e a posologia (35).

A metodologia para a sua criação mantém uma sequência de pontos de verificação, comuns a todos os nanossistemas, esquematizada na figura 4.1.

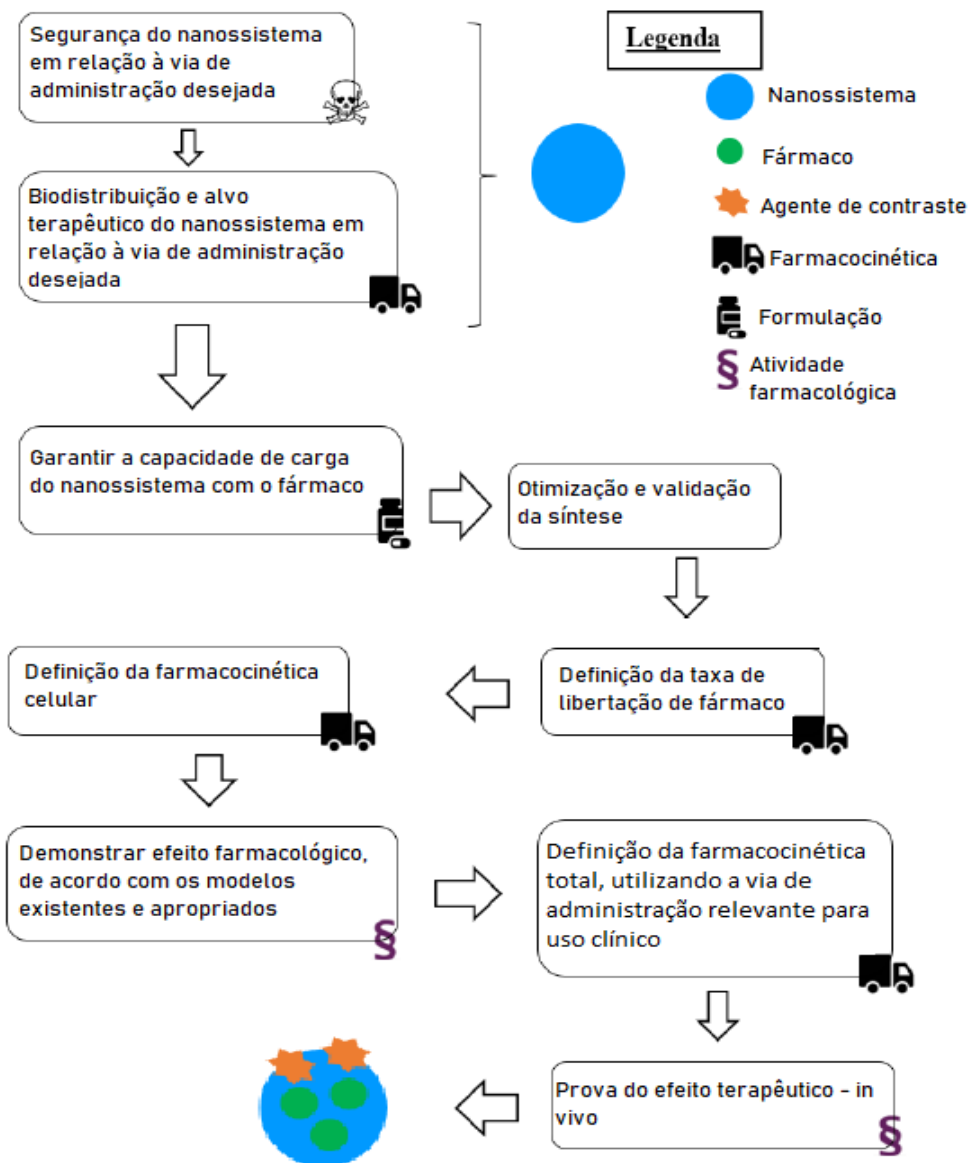


Figura 4.1 - Metodologia de desenvolvimento para nanossistemas. Adaptado de (35).

O conhecimento de fatores como capacidade de carga, segurança, farmacocinética, alvo terapêutico, estabilidade e taxa de libertação de fármacos durante esta fase é de grande importância (32).

A grande família das nanopartículas inclui nanopartículas poliméricas, lipídicas e inorgânicas, exemplificada na figura 4.2. Como se observa, estas dividem-se depois em subgrupos.

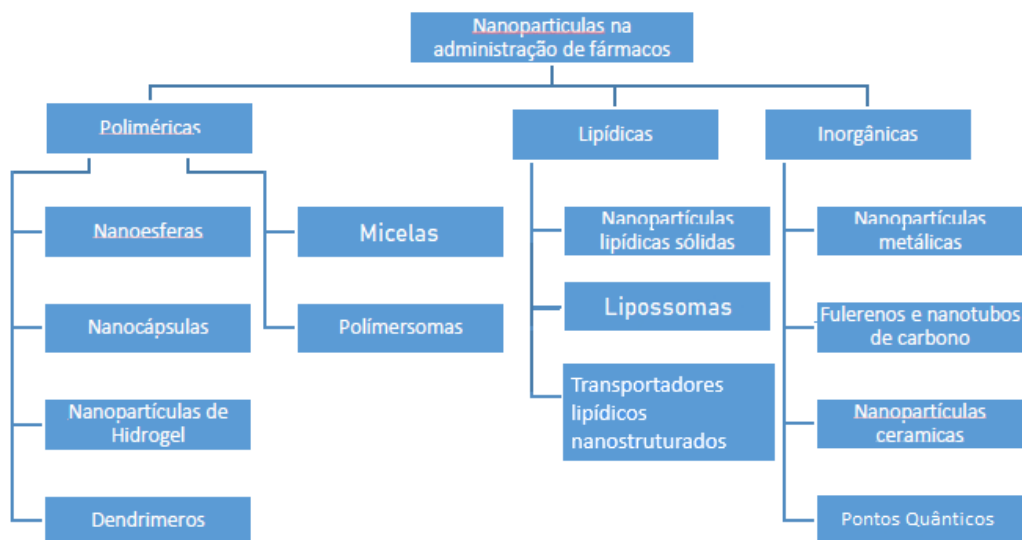


Figura 4.2 - Classificação dos grupos e sub-grupos das nanopartículas. Adaptado de (32).

Os tipos de nanopartículas mais detalhadas neste trabalho serão as nanopartículas inorgânicas pelo facto de existirem mais estudos de nanossistemas com AbMo para o tratamento de CCR. Esta secção proporciona alguma descrição sobre cada um dos tipos de nanossistemas, permitindo assim reunir informação que será útil posteriormente na descrição dos trabalhos com sistemas específicos.

4.2.1. Nanopartículas Poliméricas

Atualmente, as nanopartículas poliméricas são estudadas como ferramentas de administração de fármacos antineoplásicos, pelo seu grande potencial. As nanopartículas são preparadas por encapsulação e dissolução do fármaco em polímeros biodegradáveis ou por incorporação do mesmo numa matriz polimérica (37). Estas nanopartículas são produzidas com materiais biocompatíveis e biodegradáveis, que incluem polímeros naturais, como gelatina e albumina, e polímeros sintéticos (38).

Existem várias vantagens do uso de nanopartículas poliméricas na administração de fármacos e são produzidas regularmente a menor custo, em grandes quantidades, quando em comparação com nanopartículas lipídicas (32).

Nanocápsulas e nanoesferas

As nanopartículas poliméricas compreendem um conjunto de sistemas que englobam sistemas vesiculares, denominados nanocápsulas, e sistemas matriciais, nanoesferas. As nanocápsulas são sistemas em que o fármaco está confinado a uma

cavidade envolvida por uma única membrana polimérica, enquanto que as nanoesferas são sistemas em que o fármaco é distribuído por toda a matriz polimérica. As estruturas estão representadas na figura 4.3 e descritas na figura 4.4 (32).

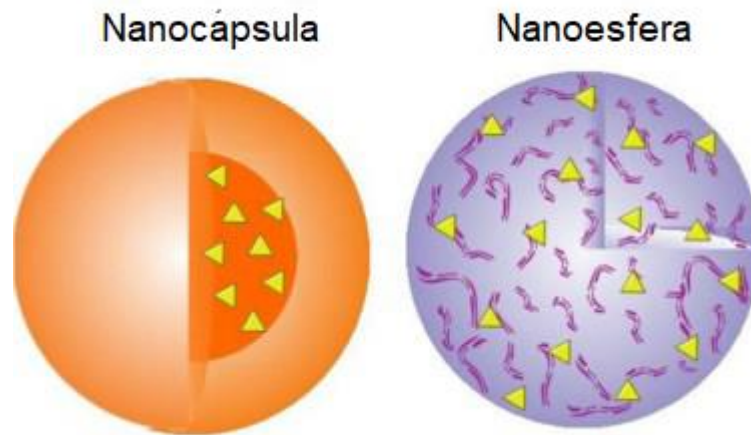


Figura 4.3 - Representação da estrutura de uma nanocápsula e de uma nanoesfera. Adaptado de (39).

As nanocápsulas constituem sistemas do tipo reservatório, como é possível observar na figura 4.4, em baixo, onde é possível identificar-se um núcleo líquido diferenciado (óleo ou água) rodeado por material sólido (invólucro polimérico). Neste caso a substância ativa pode encontrar-se dissolvida no núcleo e incluída ou adsorvida na parede polimérica. As nanoesferas são sistemas formados por matrizes poliméricas que, contrariamente às nanocápsulas não apresentam um núcleo diferenciado. Os fármacos nas nanoesferas encontram-se frequentemente distribuídos ou encapsulados de forma homogênea no interior da matriz, sendo libertadas por difusão, podendo ainda encontrar-se adsorvidos à superfície da nanoesfera (40,41).

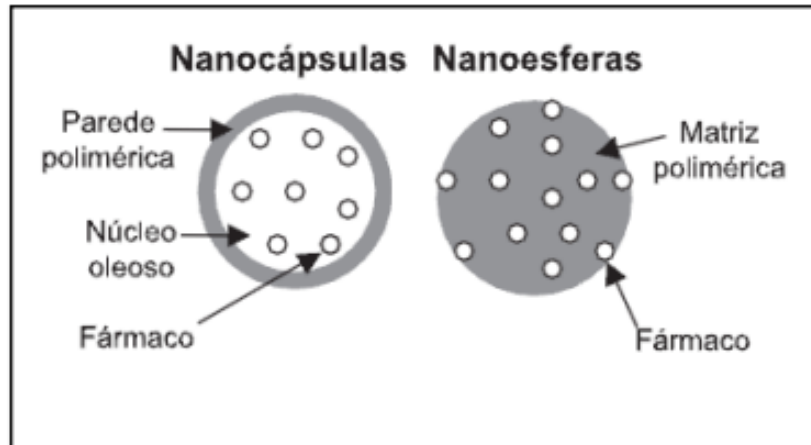


Figura 4.4 – Diferença estrutural de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas. Adaptado de (41)

Nanopartículas baseadas em proteínas

As proteínas são polímeros hidrofílicos naturais, com vantagens na manipulação e no transporte de fármacos. As desvantagens existentes destes materiais são a sua fácil degradação e o potencial de antigenicidade, que é a capacidade do sistema imunitário provocar a formação de anticorpos como reação à presença de substâncias estranhas no organismo, quando administrados por via parenteral. As nanopartículas baseadas em proteínas são geralmente preparadas por uma técnica de dessolvatação. Este método consiste em dissolver a proteína em água e posteriormente dessolvatar com um solvente com maior afinidade por água como o álcool ou a acetona (42).

A albumina de soro humano (HSA) é um destes casos. É uma proteína sanguínea, mais abundante nos humanos, a qual tem elevada capacidade de ligação a outras moléculas, como iões e fármacos. Tem ainda intervenção ao nível da regulação da pressão osmótica coloidal, que é a pressão gerada pelas proteínas no plasma sanguíneo e capacidade para se acumular em tumores sólidos, por ter afinidade elevada para recetores sobre expressos em células endoteliais e malignas. Ao realizar ligações covalentes com polietilenoglicol (PEG) à albumina, isto fornece-lhe proteção contra degradação enzimática, previne agregações superficiais e aumenta o tamanho da mesma, o que resulta num aumento do tempo de semi-vida por redução da filtração renal, o que aumenta a adesão à terapêutica e pode levar a um aumento de eficácia do tratamento sem levar a níveis de toxicidade altos (43,44).

As nanocelas à base de proteínas são outro tipo de nanopartículas que têm sido exploradas como potenciais portadores na medicina. São formadas pela

construção de subunidades de proteínas. Ao possuir uma estrutura em cela esta adquire três zonas importantes, uma zona interior, uma zona exterior e uma zona de intersubunidade, cada uma com a sua função. A zona interior é onde se carregam os fármacos para atuar na terapia. A zona exterior possui a função de aumentar sua biocompatibilidade e capacidade de dirigir as nanocelas até ao alvo. A zona de intersubunidade facilita a sua construção no que toca a libertação de fármaco (45).

Micelas

As micelas são classificadas como um conjunto de moléculas anfipáticas que se agregam espontaneamente e adquirem a forma de vesículas esféricas quando entram em contacto com um meio aquoso. As micelas convencionais consistem num sistema em que as cabeças hidrofílicas (polares) das moléculas são orientadas para o exterior e as caudas hidrofóbicas (apolares) são orientadas para o interior, tornando o núcleo hidrofóbico. Este arranjo espacial confere às micelas capacidade de encapsular fármacos hidrofóbicos (46).

As micelas têm tipicamente um tamanho entre 1 e 10 nm, inferior ao dos lipossomas, que serão descritos abaixo. Assim, apresentam maior capacidade de infiltração tecidual comparando com esses e o seu desenvolvimento e utilização na administração de fármacos teve um pouco por base esse pressuposto. Por outro lado, e a exemplo do que acontece com os lipossomas, as micelas podem ser produzidas para serem ativada pelos mesmos mecanismos destes, de que cabe ressaltar a alteração de pH, de temperatura e a luz (47).

As propriedades assim exibidas conferem às micelas um potencial de aplicação como veículo na entrega de fármacos antineoplásicos com fraca solubilidade (48).

Dendrímeros

Os dendrímeros são moléculas sintéticas ramificadas, constituídas por camadas de dendrões, como mostrado na figura 4.4, que se alinham simetricamente e radialmente a partir de um núcleo comum central, onde o número de camadas constitui os dendrímeros (48).

Por serem geometricamente simétricos, e por possuírem grupos funcionais periféricos, cavidades internas, um peso molecular controlado e tamanho nanométrico, são considerados transportadores de fármacos com bom desempenho, versáteis e com boa capacidade de adsorção (49).

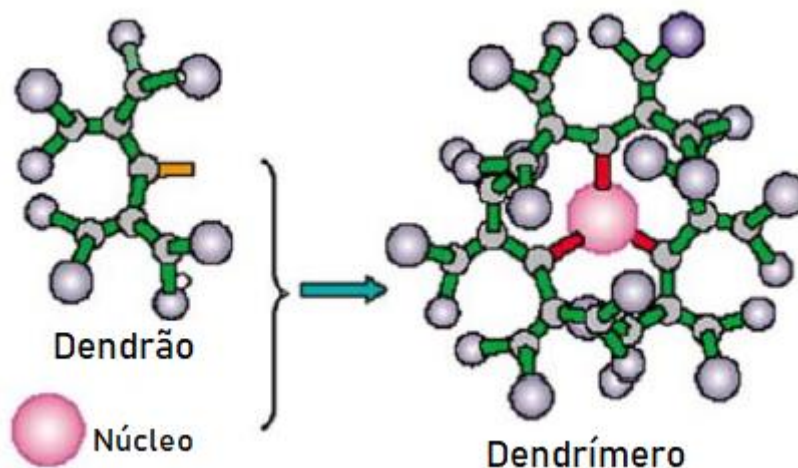


Figura 4.5 - Estrutura de um dendrão e um dendrímero. Adaptado de (48).

Polimerssomas

Os polimerssomas são vesículas artificiais que encapsulam no seu núcleo uma solução aquosa, resultante da auto-agregação de co-polímeros anfipáticos, mas a sua estrutura pode ser arranjada de forma a ser hidrofóbica ou hidrofílica. Isso ocorre porque a capacidade dos polimerssomas para encapsular moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas e anfipáticas como outras estruturas vesiculares, em combinação com a sua membrana espessa e resistente, proporciona-lhes melhor estabilidade *in vitro* e *in vivo* (50). Podem ser incorporadas na sua formulação ligandos-alvo, o que permite um aumento na taxa de absorção de fármaco nas células, o que pode levar a melhores resultados terapêuticos (6).

Os polímeros mais utilizados para efeitos de libertação controlada de fármacos são o poli-(ácido D,L-lático-co-glicólico) (PLGA), poli-(ácido lático) (PLA), poli-(ácido glutâmico) (PGA), poli-(caprolactona) (PCL), co-polímeros de N-(2-hidroxipropil)-metacrilato (HPMA), polissacáridos e poli (aminoácidos) (51). Devido às suas propriedades de biocompatibilidade e biodegradação, PLA, PLGA e PGA têm sido amplamente utilizados numa quantidade impressionante de formulações. Isto deve-se, em parte, à clearance simplificada, das matrizes poliméricas, através dos sistemas metabólicos homeostáticos do organismo (52).

4.2.2. Nanopartículas Lipídicas

As nanopartículas lipídicas são um tipo de nanopartículas produzidas com lípidos naturais ou sintéticos, como uma matriz para aprisionar fármacos num núcleo lipídico, em que o tamanho das partículas pode variar entre 50 e 1000 nm. As nanopartículas

lipídicas têm várias vias de administração, demonstram forte compatibilidade e estabilidade biológica e controlam a distribuição de fármacos (48).

Lipossomas

Os lipossomas consistem num núcleo aquoso encerrado por uma ou várias camadas de fosfolípidos e colesterol que formam uma bicamada lipídica, representado na figura 4.5. Devido a esta estrutura única, os lipossomas podem encapsular agentes hidrofílicos no compartimento aquoso e agentes hidrofóbicos no espaço lipídico (49).

Os lipossomas são frequentemente revestidos com uma camada polimérica fosfolipídica, para criar o que é conhecido como um lipossoma furtivo e podem ser construídos para conter mais do que um fármaco, o que permite combinações de fármacos (5,53) .

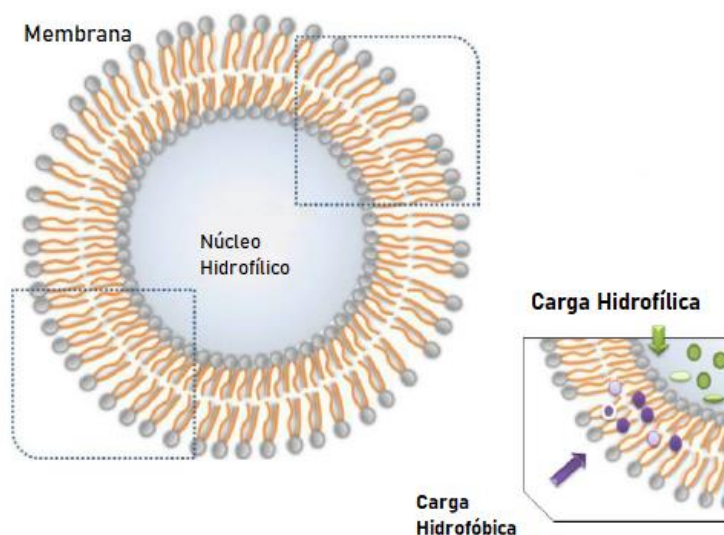


Figura 4.6 - Estrutura de Lipossoma. Adaptado de (53).

Nanopartículas lipídicas sólidas

As nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) são um grupo de transportadores de fármacos com diâmetro médio entre 10 e 1000 nm, representado na figura 4.6, produzidos por lípidos que, à temperatura ambiente e corporal, permanecem em estado sólido. Combinam os benefícios dos lipossomas e das nanopartículas poliméricas e proporcionam alta estabilidade em ambiente fisiológico (54,55).

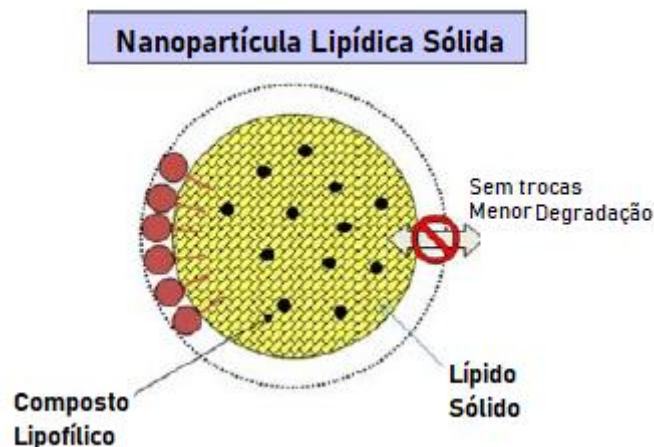


Figura 4.7 - Estrutura de nanopartícula lipídica sólida. Adaptado de (55).

Transportadores lipídicos nanoestruturados

Os transportadores lipídicos nanoestruturados (NLC) foram introduzidos como uma evolução das SLN, mencionadas anteriormente. Os NLC compõem-se de uma mistura entre lípidos de fase sólida e líquida, que formam uma matriz não organizada, a qual aumenta a estabilidade e capacidade de carga de fármaco comparando com as SLN. Os NLC evitam ainda perdas de fármaco durante o armazenamento e verifica-se que apresentam os mesmos níveis de biotoxicidade que as SLN. A sua estrutura está representada na figura 4.8 (56).



Figura 4.8 - Estrutura de um transportador de lípidos nanoestruturado. Adaptado de (56).

4.2.3. Nanopartículas Inorgânicas

Existem vários tipos de nanopartículas inorgânicas, incluindo pontos quânticos, nanopartículas de sílica mesoporosa, óxidos de ferro superparamagnéticos, nanopartículas metálicas, como ouro e prata, nanotubos de carbono e outras nanopartículas metálicas e não metálicas, que aumentam a eficiência da terapia de

radiação e melhoram a imagem do tumor. Várias destas nanopartículas inorgânicas são suficientemente pequenas para penetrar nos capilares e podem ser absorvidas em diferentes tecidos (49). Essas nanopartículas têm propriedades específicas que são adequadas para várias aplicações bio-analíticas e muitas apresentam problemas toxicológicos, mas recentemente têm sido utilizadas para aplicações terapêuticas (35,38).

Visto serem maioritariamente utilizadas como métodos de diagnóstico, far-se-á uma menção a todos os tipos de nanopartículas, mas apenas serão descritas as que são utilizadas na terapêutica.

Nanopartículas de sílica mesoporosa

As nanopartículas de sílica mesoporosa (MSNs) apresentam-se como estrutura robustas, possuem um rácio elevado de área de superfície/volume, enquanto mantém uma alta porosidade. As MSNs podem também proporcionar libertação estimulada por fármaco e realizar segmentação ativa, que é um processo de corte ou divisão das MSNs, por modificação superficial de anticorpos, péptidos, moléculas pequenas, ácido fólico ou aptâmeros (57,58).

Nanopartículas de base cerâmica

Atualmente, o desenvolvimento de novos materiais de cerâmica para aplicações biomédicas tem beneficiado de um crescimento exponencial. A libertação controlada de fármacos é uma das áreas mais exploradas em termos de aplicação de nanopartículas de cerâmica na área da biomedicina (59).

As nanopartículas cerâmicas geralmente consistem em nanomateriais inorgânicos, por exemplo sílica e óxido de alumínio. Também é possível usar metais, e sulfetos metálicos para criar nanoestruturas de vários tamanhos, formas e porosidades (32). Uma desvantagem que estas partículas apresentam é a sua grande dimensão, que condiciona o acesso a determinados tecidos. As formas desenvolvidas para este tipo de nanopartícula podem apresentar vantagens em termos de adesão aos vasos sanguíneos e transporte pelos mesmos, por exemplo uma forma de disco apresenta este tipo de vantagem em relação a uma forma esférica (60).

Nanotubos de carbono

Os nanotubos de carbono são subprodutos de fulerenos criados por descarga de corrente contínua em arco, caracterizados por estruturas ocas, baseadas em carbono e semelhantes a gaiolas ou celas, constituídos por filamentos tubulares cilíndricos com um diâmetro entre 1 e 2 nm e podem ser constituídos por parede única ou por parede

múltipla, como demonstrado na figura 4.7. Há uma grande questão sobre a possível toxicidade que se deve principalmente à variedade de estruturas de fulereno existentes e às modificações na sua superfície, para os tornar solúveis em água e, conseqüentemente, no sangue, com o intuito de poderem ser conjugados com moléculas ativas e ao facto das suas propriedades eletrónicas, térmicas e estruturais alterarem, dependendo do tipo de nanotubos (32,35,61).

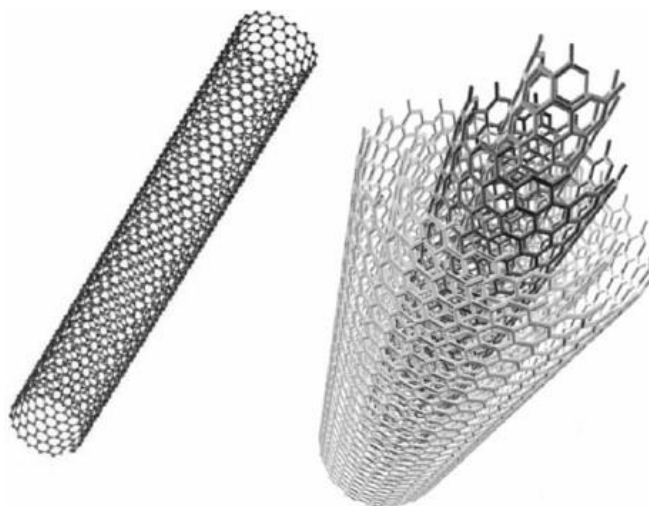


Figura 4.9 - Nanotubos de parede única (esquerda) e nanotubo de parede múltipla (direita). Adaptado de (62).

Nanopartículas metálicas

Embora tenham sido produzidas nanopartículas compostas por diferentes metais, as nanopartículas de prata e ouro são de grande importância para uso terapêutico. Um grande número de ligandos tem sido associado a nanopartículas, incluindo péptidos, proteínas e ADN. Estes, quando ligados a nanopartículas metálicas foram utilizados para a distribuição de fármacos, ensaios, deteção e imagem (32). A conjugação com proteínas permite a localização de recetores na célula cancerígena e o ouro coloidal permite a quantificação da endocitose. Deste modo, as nanopartículas de ouro estão entre as partículas mais estudadas devido ao elevado número de métodos disponíveis para preparação de colóides com tamanho e forma bem definida mas existem outros metais utilizados para tratamento como prata e óxido de ferro (35).

Algumas das formas de nanopartículas de ouro (AuNP) a ser desenvolvidas são: nanoconchas de ouro-sílica, nanobastões de ouro, nanopartículas ouro-sulfureto de ouro. As últimas três formas de nanopartículas fazem parte da segunda geração de AuNP e possuem uma dimensão inferior, o que lhes confere uma vantagem em termos de distribuição de fármacos (63).

Pontos Quânticos

Pontos quânticos, conhecidos como *quantum dots* no seu nome em inglês, são nanocristais compostos de materiais semicondutores com propriedades fotofísicas especiais, incluindo bandas de emissão simétricas ajustáveis em tamanho, absorvência superior de luz, alta intensidade fluorescente e boa fotoestabilidade. As suas propriedades óticas resultaram num aumento da utilização de nanotecnologia baseada em pontos quânticos em aplicações biomédicas, tais como: deteção, controlo, tratamento e patologia molecular de cancro (64).

De seguida será explicado o que são anticorpos monoclonais, os seus diferentes tipos e são descritos os que são utilizados na terapia de CCR.

5. Anticorpos Monoclonais

A eficácia da quimioterapia tem um grande impacto na preservação da qualidade de vida e no prolongamento do tempo de vida dos doentes, mas a falta de especificidade e presença de efeitos secundários pode levar a uma fraca adesão à terapêutica. A resistência a fármacos é considerada um processo multifatorial, influenciado pela farmacocinética dos mesmos (65,66). Além disso, as células tumorais podem apresentar ou desenvolver, durante o tratamento, os mecanismos moleculares intrínsecos para se adaptarem ao fármaco antineoplásico (67).

Os fármacos antineoplásicos convencionais são altamente tóxicos, limitando assim a dose que pode ser administrada a pacientes, não apresentam grande seletividade, quando comparados com anticorpos monoclonais e, conseqüentemente, reduzindo a eficácia e adesão ao tratamento (68,69).

Foi neste sentido que surgiram os anticorpos monoclonais (AbMo), os quais melhoraram significativamente o tratamento de uma variedade de doenças humanas, em particular doenças neoplásicas e inflamatórias. Estes anticorpos são produzidos a partir de um linfócito B “mãe” que é clonado, produzindo sempre os mesmo anticorpos com resposta específica a um agente patogénico, com estrutura, propriedades físico-químicas e biológicas, especificidade e afinidade idênticas, ligando-se assim ao mesmo epítipo no antigénio (70). Os mecanismos de ação mais bem descritos de anticorpos monoclonais terapêuticos incluem citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC), citotoxicidade dependente do complemento (CDC), fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP), indução da morte celular (apoptose). Atualmente, a grande maioria dos AbMo que estão aprovados para

utilização terapêutica, apresenta especificidade definida para um segmento molecular de um antígeno, conhecido como epítipo (7,71,72). Este fenómeno acontece através da linhagem de células B com a ajuda de células T e outros componentes do sistema imunitário. Uma resposta imunológica normal resulta em múltiplas linhagens de células B que se diferenciam terminalmente em células plasmáticas secretoras de anticorpos, resultando numa resposta de AbMo. Dois problemas básicos que necessitam de ser abordados antes de se usar AbMo são a questão do tempo de vida limitado de células plasmáticas, limitando a escolha de quais os AbMo de interesse e o facto dos AbMo serem obtidos a partir de culturas de células B estimuladas por antígenos (71,73).

Estudos clínicos têm demonstrado que muitos pacientes não respondem adequadamente à terapia mono-específica, que é uma terapia em que os anticorpos têm especificidade para apenas um antígeno ou epítipo, e a resistência ao tratamento ou recorrência do tumor são frequentemente observados (74–76). Isto é, talvez não tão surpreendente, considerando o facto de que o cancro é muitas vezes uma doença multifatorial, onde tumores adquirem uma série de mutações. Além disso, muitos tumores dependem de múltiplas vias, frequentemente redundantes, de sobrevivência e proliferação. Especificar um único alvo não parece ser suficiente para destruir as células cancerígenas (7).

5.1. Tipos de anticorpos monoclonais

5.1.1. Murinos

Em 1975, Georges J. F. Köhler e César Milstein, descobriram que a fusão de células B com células de mieloma origina um hibridoma ou híbridos de células formadoras de anticorpos e linhagens celulares de replicação contínua, como demonstrado na figura 5.1. Os ratos e os seres humanos, muitas vezes diferem na glicosilação nos anticorpos, uma preocupação para aplicações *in vivo* com AbMo murinos. A colocação ausente ou incorreta de hidratos de carbono na cadeia altera a solubilidade dos anticorpos, a depuração sérica, e a boa interação entre anticorpos e recetores Fc. A glicosilação correta da porção Fc do anticorpo é muito importante se a ação do anticorpo depende de ativação do complemento ou de ADCC (70,71).

As principais desvantagens de AbMo puramente murinos são a redução de semivida no plasma de murino contra imunoglobulina G (IgG) humana, e o anticorpo humano contra anticorpo murino (HAMA), que reduz ainda mais a sua semivida (77,78). A IgG humana normalmente tem uma semivida de cerca de três semanas, as IgG de murino têm uma semivida de apenas algumas horas e tendem a provocar uma resposta

HAMA, que não só desencadeia uma eliminação mais rápida do IgG murino, mas também pode provocar uma resposta de hipersensibilidade anafilática, devido à sua natureza externa (70). As diminuições na semivida circulante exigem o aumento das doses administradas, que podem, então, levar a aumentar HAMA, ou aceitar uma redução da eficácia do produto. Um objetivo de alta prioridade tem sido para reduzir o teor de AbMo murinos, mas mantendo a eficácia, no entanto, muitos AbMo completamente murinos continuam a ser utilizados para criação de imagens e aplicações terapêuticas (71).

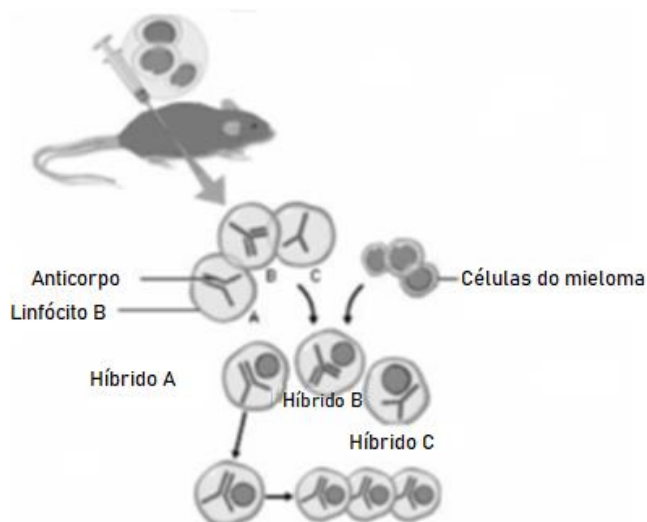


Figura 5.1 - Técnica de hibridização celular somática. Adaptado de (68).

5.1.2. Quiméricos

Os AbMo quiméricos são compostos por sequências de proteínas a partir de origem: murina e humana. Enquanto que os anticorpos murinos são 100% de proteína de murino, anticorpos quiméricos são tipicamente apenas cerca de 33% de proteínas de murino, representado na figura 5.2, com 67% de proteína humana restante, com a região variável a manter especificidade murino. As regiões constantes, as quais ditam o isótopo de anticorpo, são substituídas com proteínas humanas (71).

O método de ADN recombinante que torna isto possível é através do isolamento dos genes da região variável de um hibridoma que secreta um anticorpo murino que se liga ao alvo desejado, seguida de amplificação dos genes usando a reação em cadeia da polimerase (PoCR). Este produto inicial é uma cópia de ADN (cADN) da região variável de murino (V-cADN). O V-cADN pode então ser ligado num plasmídeo. Numa sequência paralela, o cADN para as regiões constantes da cadeia pesada humana também é amplificado e ligado num plasmídeo separado para produzir cADN de cadeia pesada (HC-cADN). Neste ponto, o V-cADN e HC-cADN podem ser reunidos numa

célula hospedeira. Este método elaborado fornece a proteína de fusão desejada, o anticorpo quimérico intacto (71).

Mesmo com esta modificação bem-sucedida para o anticorpo monoclonal de murino original, ainda pode haver uma resposta imunitária humana para as sequências de péptidos de murino na estrutura do anticorpo quimérico. O anticorpo quimérico humano (HACA) é uma resposta imunitária à porção de murino (região variável) do anticorpo (71).

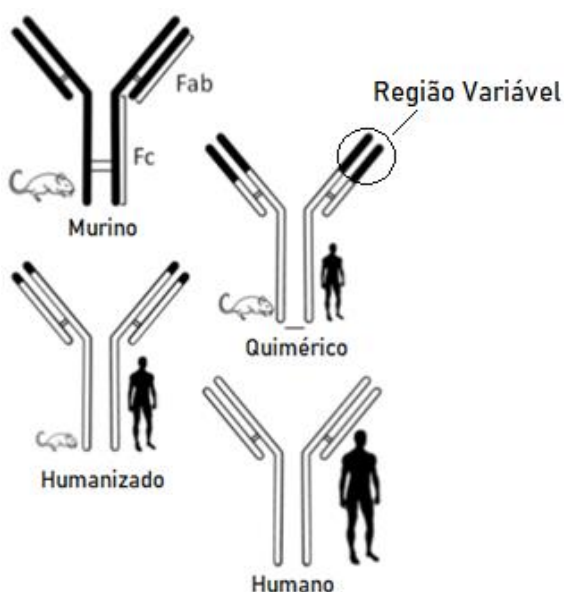


Figura 5.2 - Conteúdo dos vários tipos de anticorpos monoclonais. Adaptado de (68).

5.1.3. Humanizados

Os AbMo humanizados tipicamente retêm apenas as regiões variáveis ou regiões determinantes complementares (CDR), de um anticorpo de murino, enquanto o resto do anticorpo é humano. Assim, os AbMo humanizados contêm tipicamente apenas 5% a 10% de composição de murino, representado na figura 5.2. A preparação de AbMo humanizados segue uma trajetória semelhante à síntese de anticorpos quiméricos. Os AbMo humanizados geralmente induzem menos respostas imunológicas adversas do que os AbMo murinos ou quiméricos (79).

Os AbMo humanizados são tipicamente sintetizados por enxerto de CDR de murino num anticorpo humano. Utilizando tecnologia de ADN recombinante, os genes de cadeia leve e pesada podem ser amplificados por PCR. A grande quantidade de cADN humano linfóide resultante pode ser utilizado como um molde para a síntese *in vitro* de todo o anticorpo, exceto para as CDR. As CDR de murino foram clonadas e

cultivadas em paralelo. Os respectivos genes podem, em seguida, unir-se por *splicing* no vetor de ADN e serem incorporados em bactérias de crescimento. Para simplificar o processo, muitas vezes, tanto cADN humano, e cADN de murino, que contêm vetores, podem ser incorporados na mesma célula bacteriana e um anticorpo monoclonal humanizado intacto pode ser produzido. Tal como acontece com os anticorpos quiméricos, os anticorpos humanizados devem ser extraídos a partir de culturas bacterianas purificadas, um problema encontrado algumas vezes com ambos, quiméricos e AbMo humanizados. O processo de síntese de expressar anticorpos humanizados pode também levar a glicosilação inadequada ou inexistente. A glicosilação de Fc é significativo na solubilidade, depuração sérica, e farmacocinética geral de anticorpos (71).

Os anticorpos humanizados apresentam uma menor predisposição para uma resposta imunitária do que os AbMo murinos ou quiméricos. A melhoria dos anticorpos humanizados sobre os anticorpos murino e quimérico tem sido amplamente aceite (71).

5.1.4. Humanos

Os AbMo humanos são integralmente, ou quase 100%, de composição humana. A palavra monoclonal não é tecnicamente aplicável a todos os anticorpos humanos sintéticos, porque algumas das tecnologias de síntese não utilizam a tecnologia de hibridomas. Existem duas tecnologias utilizadas para produzir anticorpos humanos: por engenharia genética, ou ratos transgênicos e o uso de bibliotecas de exibição em fagos (*phage display libraries*, no inglês) (71).

Ratos *knockout* são desenvolvidos por células-tronco embrionárias de colheita de embriões de ratinhos em fase inicial de fertilização. Um gene existente é inativado ou “*nocauteado*”, substituindo-o com um fragmento artificial de ADN. As células estaminais são alteradas, em seguida, cultivadas em ratinhos com um perfil genómico alterado. A inativação da capacidade de reorganizar configurações da linha germinal de cadeia pesada e leve inibe a capacidade do rato para fazer imunoglobulina de murino e as células B murinas correspondentes. A substituição da cadeia pesada e leve de ADN de linha germinal humana pode fazer com que o animal de experimentação, ratinho, produza células B humanas que podem produzir anticorpos monoclonais humanos. Embora tecnicamente difícil, a utilização de ratos *knockout* para produzir AbMo totalmente humanos é uma tecnologia emergente e promissora (71).

Estes apresentam os valores de afinidade para com os antigénios semelhantes a anticorpos humanos, equivalência à farmacocinética de anticorpos humanos, e

possuem respostas praticamente inexistentes de hipersensibilidade murina em comparação com os AbMo quiméricos e humanizados (71).

Existem vários AbMo utilizados em diferentes terapias para cancro como bevacizumab, utilizado em terapia de CCR em monoterapia, ou em cancro da mama, cancro pulmonar ou cancro renal quando associado a diferentes fármacos em terapia combinada, cetuximab, utilizado em terapia de CCR ou carcinoma pavimento celular da cabeça e pescoço, rituximab, utilizado em terapia de linfoma não-Hodgkin e leucemia linfocítica crónica ou trastuzumab, utilizado em terapia de cancro da mama, e utilizados em terapias para outras doenças como, alemtuzumab, utilizado em terapia para esclerose múltipla surto-remissão, belimumab, utilizado em terapia de lúpus eritematoso sistémico ou como certolizumab, utilizado em terapia para artrite reumatoide ou artrite psoriática (80–85).

De seguida serão descritos com detalhe os AbMo que são utilizados na terapêutica para CCR, os seus mecanismos de ação, requisitos para utilização dos mesmos e as reações adversas mais frequentes. Serão também mencionados os AbMo que eram utilizados para terapia de CCR, mas que foram descontinuados devido a problemas relacionados com eficácia e segurança clínica

5.2. Bevacizumab

O bevacizumab (BEVA) é um AbMo humanizado tipo IgG1 cujo mecanismo de ação consiste em ligar-se ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator chave na vasculogénese e angiogénese, inibindo a ligação aos recetores, Flt-1 (VEGFR-1) e KDR (VEGFR-2) sobre a superfície de células endoteliais. A neutralização da atividade biológica do VEGF, regride a vascularização de tumoral, normaliza e inibe a formação de novos vasos. Este AbMo tem como indicação terapêutica, monoterapia em CCR, monoterapia para retinopatia diabética, terapia combinada com paclitaxel ou capecitabina em cancro da mama, terapia combinada com derivados de platina em cancro da pulmonar avançado ou terapia combinada com interferão α -2a em cancro renal. Os requisitos para utilização deste AbMo são resultado positivo para recetores VEGF: Flt-1 (VEGFR-1) e KDR (VEGFR-2). Respetivamente a segurança clínica, os efeitos adversos descritos como mais frequentes são: hipertensão, fadiga, diarreia e dor abdominal (80).

Na tabela 5.1 estão resumidas as características do bevacizumab, incluindo o seu mecanismo de ação, os requisitos de utilização, e a segurança clínica.

Tabela 5.1 - Características do Bevacizumab. Adaptado de (80).

Anticorpo Monoclonal		Mecanismo de Ação	Requisitos para utilização	Segurança Clínica
Bevacizumab	Tipo de Anticorpo	Liga-se ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), inibindo a ligação aos recetores Flt-1 (VEGFR-1) e KDR (VEGFR-2) sobre a superfície de células endoteliais. A neutralização da atividade do VEGF, regride a vascularização tumoral e inibe a formação de novos vasos.	Recetores VEGF-positivo (+): Flt-1 (VEGFR-1) e KDR (VEGFR-2)	As reações adversas mais frequentes: hipertensão, fadiga, diarreia e dor abdominal
	Humanizado			

5.3. Cetuximab

O cetuximab (CTX) é um AbMo quimérico tipo IgG1, cujo mecanismo de ação consiste em ligar-se ao recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) com uma afinidade aproximadamente 5 a 10 vezes superior à dos ligandos endógenos. Bloqueia a ligação dos ligandos endógenos ao EGFR, o que provoca a inibição da função do recetor. Além disso induz a internalização do EGFR, o que pode levar à diminuição dos recetores disponíveis na superfície celular e ainda direciona as células efectoras imunitárias citotóxicas para as células tumorais que expressam EGFR. Este AbMo tem como indicações terapêuticas, monoterapia em CCR quando os doentes não respondem a terapia com irinotecano e/ou oxaliplatina, terapia combinada com radioterapia ou com derivados de platina em carcinoma pavimento celular da cabeça e pescoço. Os requisitos para utilização são existência de concentração elevada do produto proteico do proto-oncogene RAS, que é um transdutor de sinal central do EGFR. Respetivamente a segurança clínica, os efeitos adversos descritos como mais frequentes são: cefaleias, conjuntivite, diarreia, desidratação, hipomagnesemia, náuseas e vômitos (85).

Na tabela 5.2 estão resumidas as características do cetuximab tais como o seu mecanismo de ação, os requisitos de utilização, e a segurança clínica.

Tabela 5.2 - Características do Cetuximab. Adaptado de (85)

Anticorpo Monoclonal		Mecanismo de Ação	Requisitos para utilização	Segurança Clínica
Cetuximab	Tipo de Anticorpo	Liga-se ao recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). Inibe a função do recetor e diminui os recetores disponíveis na superfície da célula. Direciona as células efectoras imunitárias para as células tumorais que expressam EGFR.	Concentração elevada do produto proteico do proto-oncogene RAS (sarcoma murino)	As reações adversas mais frequentes são hipomagnesemia, desidratação, cefaleias, conjuntivite, diarreia, náuseas e vômitos
	Quimérico			

5.4. Panitumumab

O panitumumab (Pan) é um AbMo humano tipo IgG2, cujo mecanismo de ação consiste em ligar-se ao EGFR e inibir a sua função, o que leva à diminuição dos recetores disponíveis na superfície da célula. Este AbMo tem como indicação terapêutica monoterapia em CCR. Os requisitos para utilização são confirmação de não mutação genética de RAS (KRAS e NRAS), pois esta mutação as células cancerígenas não dependentes de EGFR, continuando com um crescimento descontrolado mesmo com EGFR bloqueado. Respetivamente a segurança clínica, os efeitos adversos descritos como mais frequentes são: fasciite necrosante, sépsis, abscessos locais, irritações cutâneas hipomagnesemia grave, diarreia grave e desidratação (86).

A exemplo do descrito para os AbMo anteriores, a tabela 5.3 resume as características do panitumumab (mecanismo de ação, requisitos de utilização e segurança clínica).

Tabela 5.3 - Características do Panitumumab. Adaptado de (86)

Anticorpo Monoclonal		Mecanismo de Ação	Requisitos para utilização	Segurança Clínica
Panitumumab	Tipo de Anticorpo	Liga-se ao EGFR. Inibe a função do recetor e leva à diminuição dos recetores disponíveis na superfície da célula.	Evidência de não mutação de RAS (KRAS e NRAS)	As reações adversas mais frequentes: fasciite necrosante, sépsis, abscessos locais, irritações cutâneas hipomagnesemia grave, diarreia grave e desidratação
	Humano			

A literatura reporta ainda outros dois AbMo utilizados em CCR, os quais foram descontinuados por razões de segurança clínica ou devido a baixa eficácia: o matuzumab, descontinuado devido a baixa eficácia (87,88), enquanto o conatumumab foi descontinuado devido a falta de dados sobre eficácia e segurança (89,90).

6. Aplicação de anticorpos monoclonais em nanossistemas no âmbito do tratamento de CCR

6.1. Bevacizumab

O BEVA foi testado em preparações compostas por diferentes nanossistemas. A primeira preparação utilizada foi criada com MSNs. Estas foram preenchidas com um supressor tumoral, miR-328, e revestidas com polidopamina com o intuito de melhorar a distribuição do supressor tumoral miR-328. Foi de seguida associado PEG como polímero associado previamente com aptâmero (Apt) e outro polímero, associado previamente com BEVA, ambos à superfície. O Apt tem a capacidade de reconhecer com alta especificidade uma molécula alvo. A formulação está representada nas figuras 6.1 e 6.2 (91).

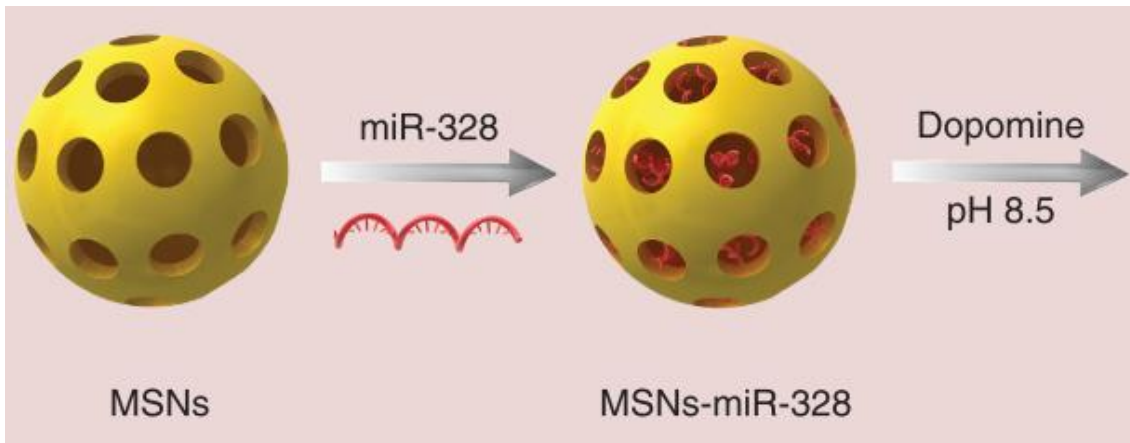


Figura 6.1 - Representação da construção da formulação. As nanopartículas de sílica mesoporosa (MSN) são preenchidas com supressor tumoral miR-328 e revestidas com polidopamina (PDA). Adaptado de (91).

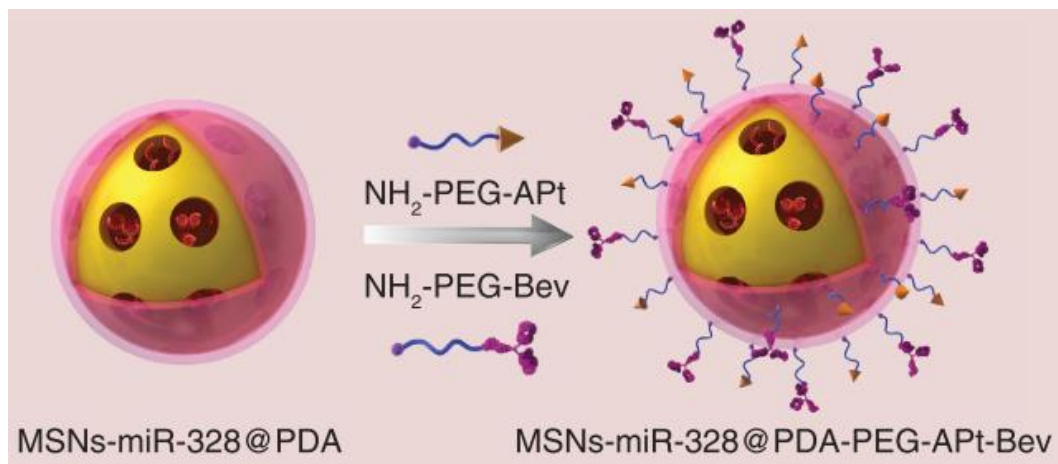


Figura 6.2 - Representação da construção da formulação. Após o revestimento com polidopamina (PDA) são associados dois polímeros associados previamente a outras moléculas, um com aptâmero (Apt) e outro com bevacizumab (BEVA), o que resulta na formulação final. Adaptado de (91).

As MSNs foram selecionadas devido à sua estrutura porosa única, que proporciona elevada área de superfície. Por outro lado, observa-se boa biocompatibilidade e facilidade em modificar a superfície, além de segmentação passiva mediada por efeito da permeabilidade e retenção melhorada. As MSNs podem proporcionar libertação estimulada pelo fármaco (58,92).

Para testar a eficácia da preparação, foram utilizadas células cancerígenas de CCR, SW480. Foram administradas por via intravenosa (IV), várias formas desta preparação, uma com BEVA, como descrito acima, outra sem BEVA e ainda houve um grupo de controlo em que não foi administrada qualquer formulação. Conforme demonstrado na figura 6.3, a administração da formulação MSNs-miR-328@PDA-PEG-Apt-Bev resultou em cerca de 67% de apoptose em células de CCR, enquanto a

formulação sem BEVA conduziu a 57% de apoptose celular. O grupo de controlo evidenciou 27% de apoptose (91).

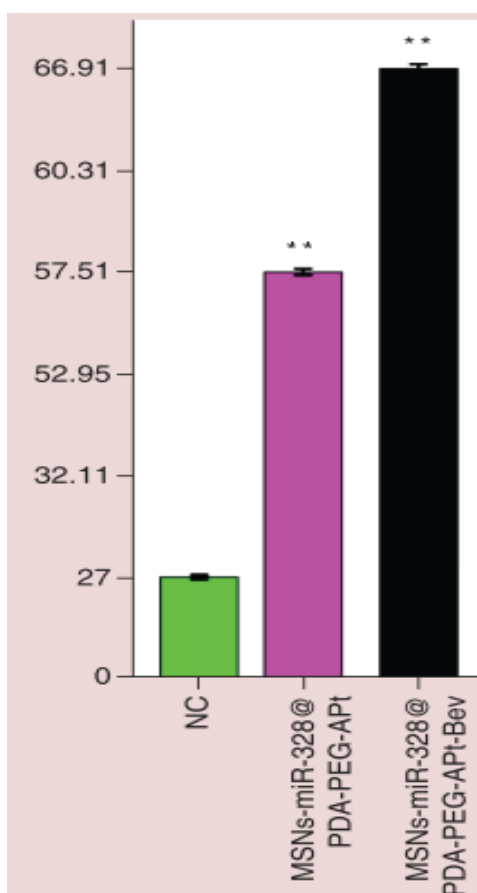


Figura 6.3 - Percentagem de apoptose para o grupo de controlo, para o grupo em que foi administrada a formulação sem bevacizumab e para o grupo em que foi administrada a formulação com bevacizumab. Adaptado de (91).

A formulação MSNs-miR-328@PDA-PEG-Apt-Bev revelou uma diminuição mais acentuada da viabilidade celular das células SW480, quando comparada com a formulação sem BEVA e ainda maior quando comparada com o grupo de controlo, durante um período de incubação de 12, 24 e 48 horas a concentração 10 µg/mL, tal como representado na figura 6.4. Isto demonstra que a percentagem de apoptose das células SW480 no sistema com Apt e BEVA é bastante maior, 40% superior, comparando com o grupo de controlo e ligeiramente maior, 9% superior, comparando com o sistema sem BEVA, isto deve-se provavelmente à alta seletividade e especificidade que o Apt e o BEVA fornecem ao sistema (91).

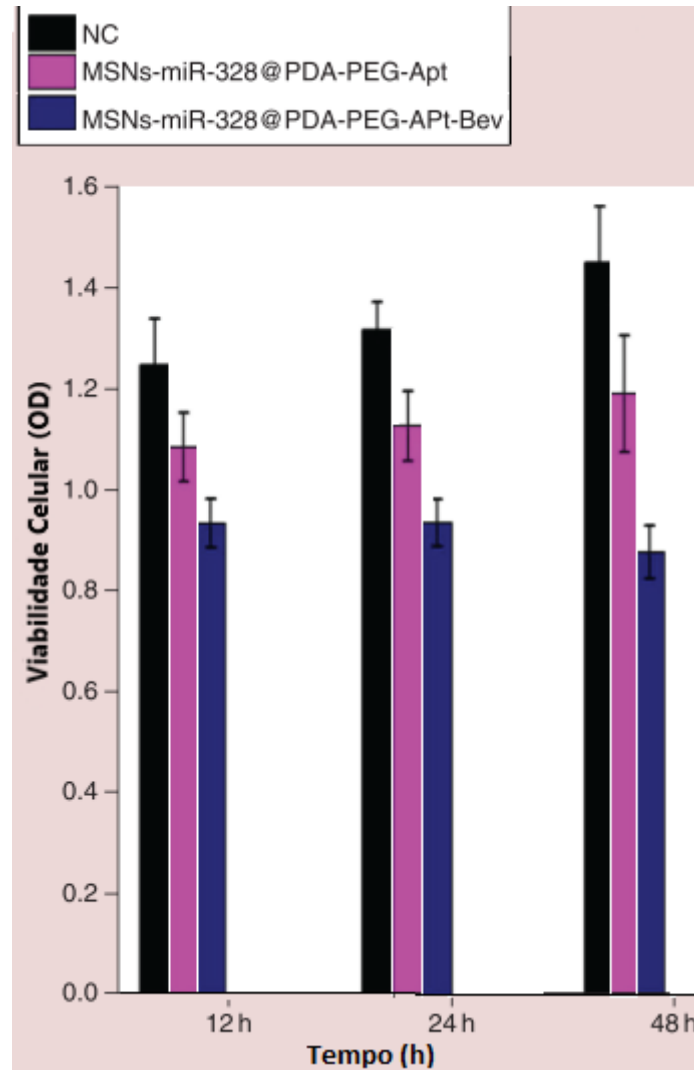


Figura 6.4 - Viabilidade celular das células de cancro colorretal no grupo de controlo, no sistema sem bevacizumab e no sistema com bevacizumab, para tempos de incubação de 12, 24 e 48 horas. Adaptado de (91).

A segunda preparação utilizada foi criada com nanopartículas de HSA, que foi escolhida por ter a capacidade para se acumular em tumores e por ter elevada afinidade para recetores sobre expressos. Estas foram preenchidas com BEVA e posteriormente revestidas com PEG, cuja função já foi explicado anteriormente, a que foi dado o nome de B-NP-PEG e preparam também um sistema sem o BEVA, que foi dado o nome de NP-PEG (93).

Realizaram-se ensaios *in vivo*, em ratinhos, nos foram injetadas por via IV células cancerígenas de CCR, HT29. Os animais divididos em cinco grupos, foram tratados com preparações ou sistemas distintos: o grupo 1 foi tratado com BEVA livre, o grupo 2 foi tratado com o sistema B-NP-PEG, em que carregaram o sistema a 145ug/mg o que corresponde a 90% da sua capacidade com BEVA, o grupo 3 foi tratado com o sistema

NP-PEG, o grupo 4 foi tratado com solução aquosa de HSA-PEG e o grupo 5 com solução de salina. O último grupo serviu de controlo e teve a duração de 28 dias, tendo sido todas as preparações administradas por via IV. Ao grupo 1 foi administrado BEVA duas vezes por semana em doses de 5mg/kg. Os resultados, mostrados na figura 6.5, demonstraram que nos grupos 1 e 2 em que foi administrado BEVA livre e o sistema B-NP-PEG, respetivamente, houve uma redução de 50% no tamanho dos tumores, comparando com o grupo de controlo. O valores dos grupos 3 e 4 foram semelhantes em termos de redução de crescimento tumoral, comparativamente aos do grupo controlo (93).

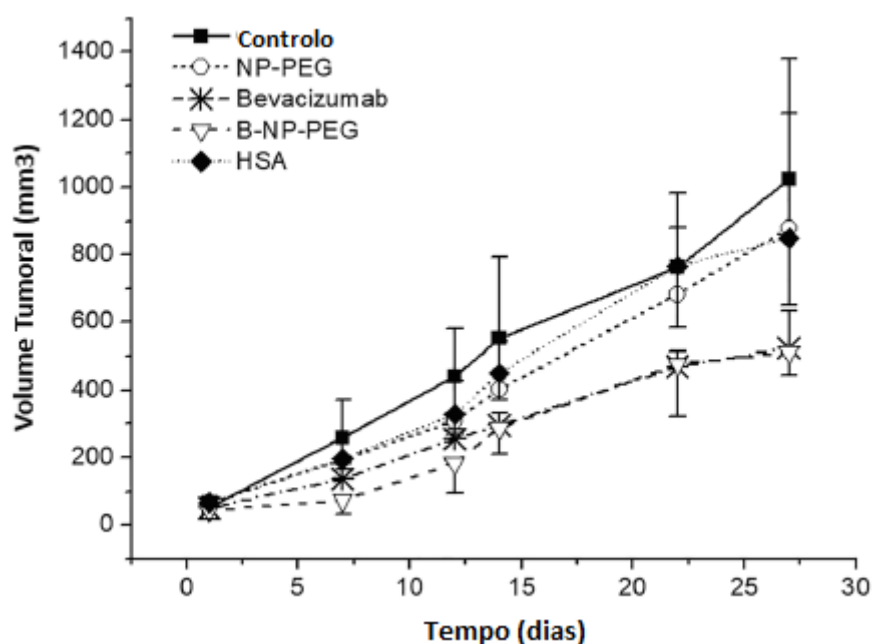


Figura 6.5 - Comparação da inibição de crescimento tumoral HT29, nos 5 grupos testados com bevacizumab livre, o sistema B-NP-PEG, o sistema NP-PEG, HSA-PEG e solução salina. Adaptado de (93).

Foram também testado os níveis de VEGF séricos nos ratinhos. Os grupos 1 e 2, foram tratados com bevacizumab livre e com os sistema B-NP-PEG, respetivamente, apresentaram valores mais baixos, cerca de 20% inferior comparando com o grupo controlo. Os grupos 3 e 4, foram tratados com NP-PEG e HSA-PEG, respetivamente, apresentaram o mesmo valor, cerca de 13% inferior, comparando com o grupo controlo como representado na figura 6.6 (93).

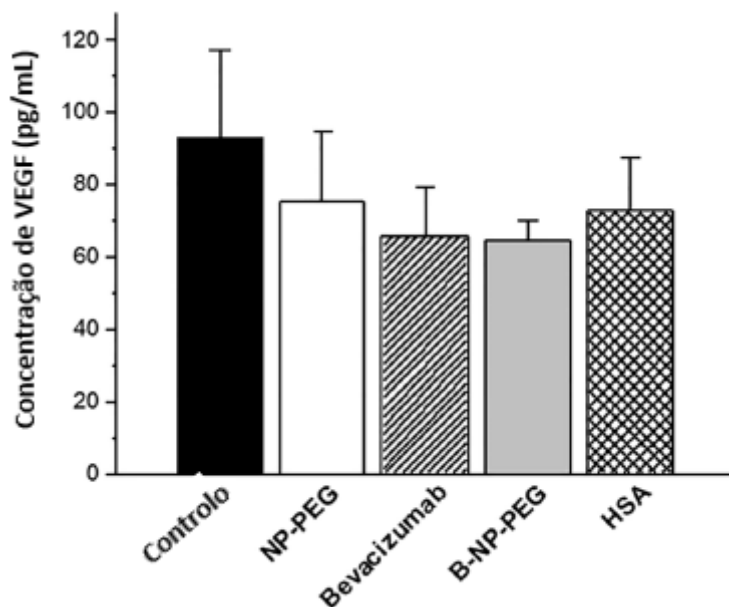


Figura 6.6 - Concentrações de VEGF séricas no ratinhos para cada grupo. Adaptado de (93).

Foram ainda testados os níveis de BEVA em circulação e intratumorais. Os resultados apresentados são apenas para o grupo 1, tratado com BEVA livre, e para o grupo 2, tratado com o sistema B-NP-PEG. Foi concluído que os níveis intratumorais de BEVA eram quatro vezes superiores nos animais tratados com o sistema B-NP-PEG do que com BEVA livre, o que indica que os valores séricos de BEVA eram superiores nos animais tratados com BEVA livre, como se verifica nas figuras 6.7 e 6.8 (93).

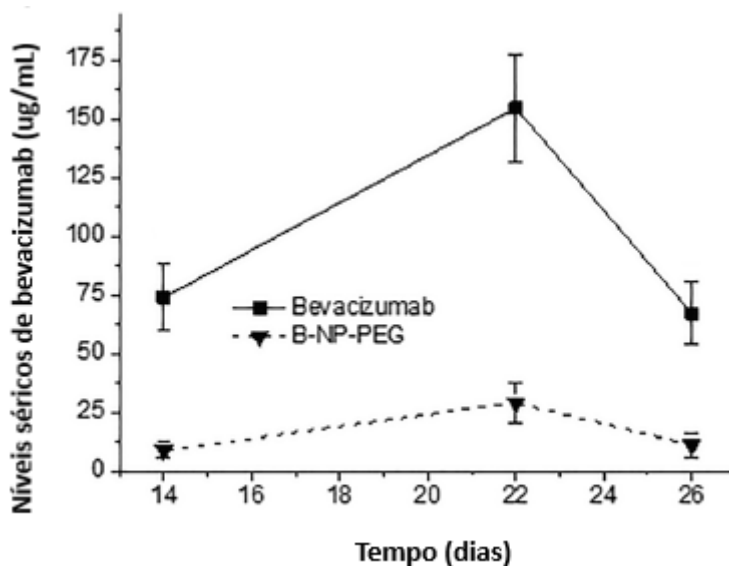


Figura 6.7 - Quantificação de bevacizumab sérica nos ratinhos para os grupos administrados com bevacizumab livre com uma dose administrada de 5mg/kg, por intravenoso, duas vezes por semana e com o sistema B-NP-PEG. Adaptado de (93).

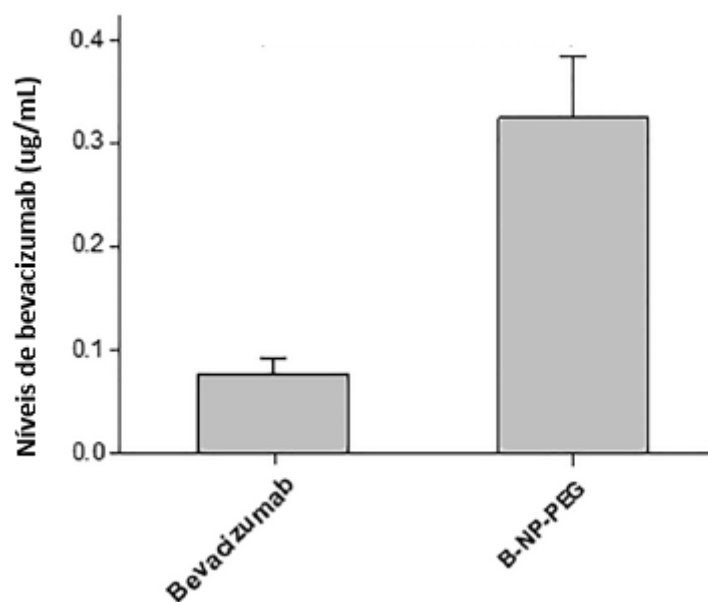


Figura 6.8 - Níveis de bevacizumab tumorais nos ratinhos para os grupos administrados com bevacizumab livre com uma dose administrada de 5mg/kg, por intravenoso, duas vezes por semana e com o sistema B-NP-PEG. Adaptado de (93).

Analisados todos os resultados, os autores concluíram que as nanopartículas de HSA aparentam ser um transportador adequado para promoverem a entrega de AbMo. O sistema com BEVA, B-NP-PEG demonstrou níveis inferiores de angiogénese do que o BEVA livre e demonstrou valores inferiores de BEVA em circulação, o que se traduz numa incidência menor de efeitos secundários indesejáveis. Isto deve-se à capacidade elevada deste nanossistema acumular AbMo no tumor.

6.2. Cetuximab

O CTX também foi testado em preparações compostas por diferentes nanossistemas. A primeira preparação utilizada foi criada com lipossomas, preenchidos com celecoxib (CLX) devido à sua capacidade de aumentar a expressão de EGFR das células cancerígenas em que se adicionaram posteriormente excertos de CTX. Os imunolipossomas (IL) correspondem à formulação com nanossistema preenchido com CLX enxertados com CTX. A escolha dos lipossomas também se deveu ao facto de serem um sistema de distribuição adequado para o CLX, que tem natureza lipofílica (94). Os lipossomas foram cobertos com uma associação de PEG e CTX, uma vez que o anticorpo monoclonal se liga com grande afinidade a células com sobre expressão de

EGFR. Por esta razão foram cobertas com PEG como polímero associado previamente a CTX, que se liga com grande afinidade, a células com sobre expressão de EGFR (95).

Todos os testes foram realizados em três tipos diferentes de células cancerígenas de CCR com diferentes níveis de sobre expressão de EGFR, HCT116 com 63.64%, HT29 com 24.42% e SW620 com 0.39%. Foram realizados dois testes *in vitro*, o primeiro demonstrou que cobrir a superfície dos IL com o polímero de PEG e CTX não afetou a sua integridade mantendo a eficácia de encapsulação de 43,9%. O segundo teste refere-se à eficácia de CLX livre, de forma a inibir em 50% a proliferação celular, num período de incubação de 24 horas a concentração 100 μM . Os resultados estão demonstrados na tabela 6.1 (96).

Tabela 6.1 - Concentração necessária de celecoxib para inibir 50% da proliferação celular de cada grupo. Adaptado de (94).

Grupo celular	IC50 de celecoxib (CLX) (μM)
HCT116	94
HT29	87
SW620	93

Os autores reportaram ainda um aumento da concentração de CTX para 125 μM , o que resultou em inibição de 90% da proliferação celular para os três grupos de células (96).

Para testar a eficácia da formulação, ao fim de 72 horas de incubação os lipossomas apresentavam ainda elevada capacidade de retenção de fármaco, acima de 70%. No que se refere à viabilidade celular, nas células HCT116 esta diminuiu em cerca 30%, quando comparadas com um grupo de controlo, nas células HT29 diminuiu 25% e nas células SW620 diminuiu 10%, ao fim de 72 horas de incubação e à concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Isto demonstra que quanto maior a expressão de EGFR maior será a eficácia e sugere também que os lipossomas são um candidato viável para distribuição de fármacos em células tumorais. No entanto, os resultados mais conclusivos apenas poderão ser obtidos em estudos *in vivo* (96).

O mesmo anticorpo foi associado a uma formulação de nanotubos de carbono de parede única (SWNT), os quais foram cobertos com PEG como polímeros associado previamente a CTX, designado como C225, e ao antineoplásico SN-38, que é um análogo da camptotecina. A figura 6.9 representa os vários componentes da formulação (97).

Os nanotubos de carbonos foram escolhidos por serem transportadores biológicos multifuncionais eficientes, os quais têm demonstrado ausência de toxicidade quer *in vitro* quer *in vivo* (98).

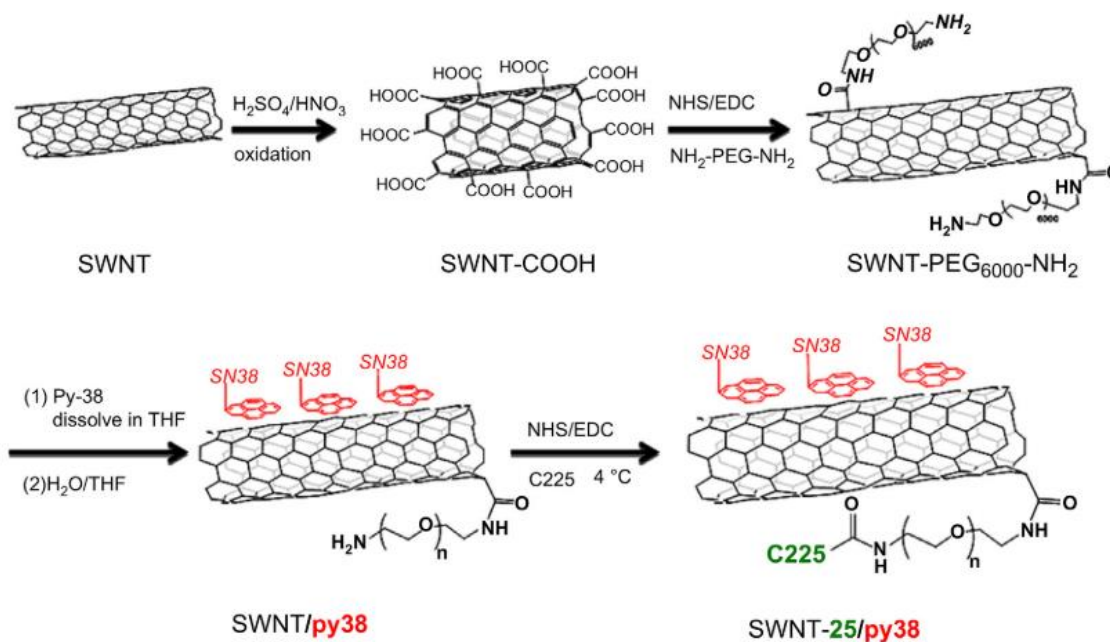


Figura 6.9 - Representação da construção da formulação. Aos nanotubos de carbono de parede única (SWNT) são adicionados grupos carboxílicos que possibilitam que sejam cobertos com PEG. Depois são adicionadas cadeias do antineoplásico SN-38 e de seguida são adicionadas cadeias de cetuximab (C225) Adaptado de (97).

Foram igualmente utilizados os mesmos três tipos de células referidos no estudo anterior, com diferentes níveis de expressão de EGFR. Inicialmente foi testada a absorção das células cancerígenas aos sistemas com e sem CTX. Posteriormente foi testada a eficácia da formulação completa versus o AbMo em forma livre. A capacidade de absorção de fármaco pelas células cancerígenas foi muito superior nos dois tipos de células com maior expressão de EGFR quando comparadas com o grupo de controlo, num período de 48 horas. Estes mesmos grupos de células também apresentaram valores de absorção de fármaco superiores quando comparadas com a preparação sem CTX, o que demonstrou que a capacidade de absorver o fármaco foi dependente da expressão de EGFR, sendo mais alta quanto maior o tempo de incubação e, nesse tempo, mais alta no sistema com CTX. Nas células SW620 os valores de absorção celular não sofrem alterações significativas, isto deve-se à baixa sobre expressão de EGFR, como se pode observar na figura 6.10 (97).

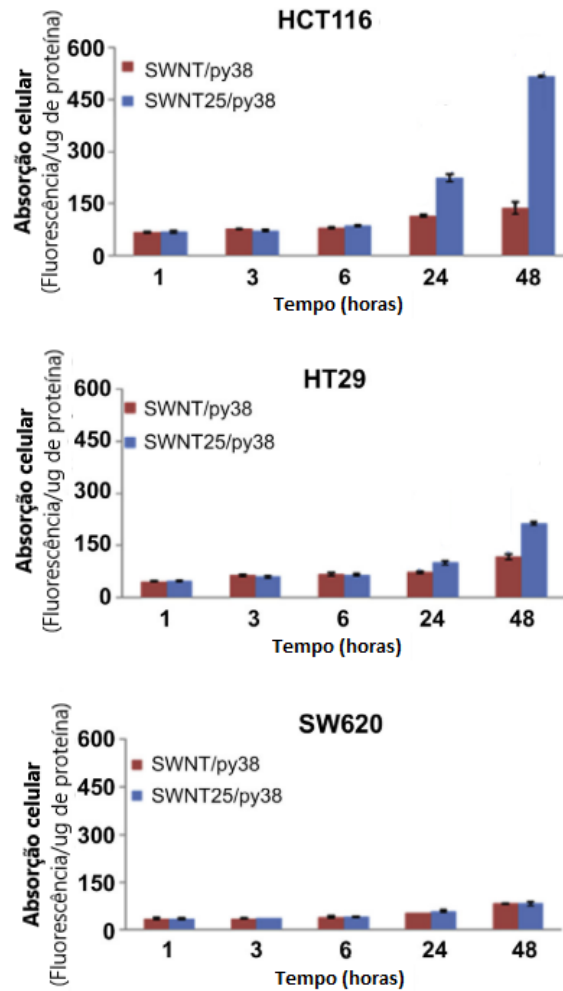


Figura 6.10 - Absorção celular em horas para os 3 tipos de células de cancro colorretal. Adaptado de (97).

No grupo de células HCT116 observam-se valores de 24,07% quando utilizado apenas o CTX e de 79,56% quando utilizada a preparação completa. O grupo de células HT29 apresentou valores de 20,14%, quando utilizado apenas o CTX, e de 62,24%, quando utilizada a preparação completa. O grupo SW620 apresentou valores de 25,65% quando utilizado apenas CTX, e de 41,00%, quando utilizada a preparação completa, demonstrado na figura 6.11 Em todos os grupos foi utilizado um grupo de controlo para confirmar a eficácia das preparações (97).

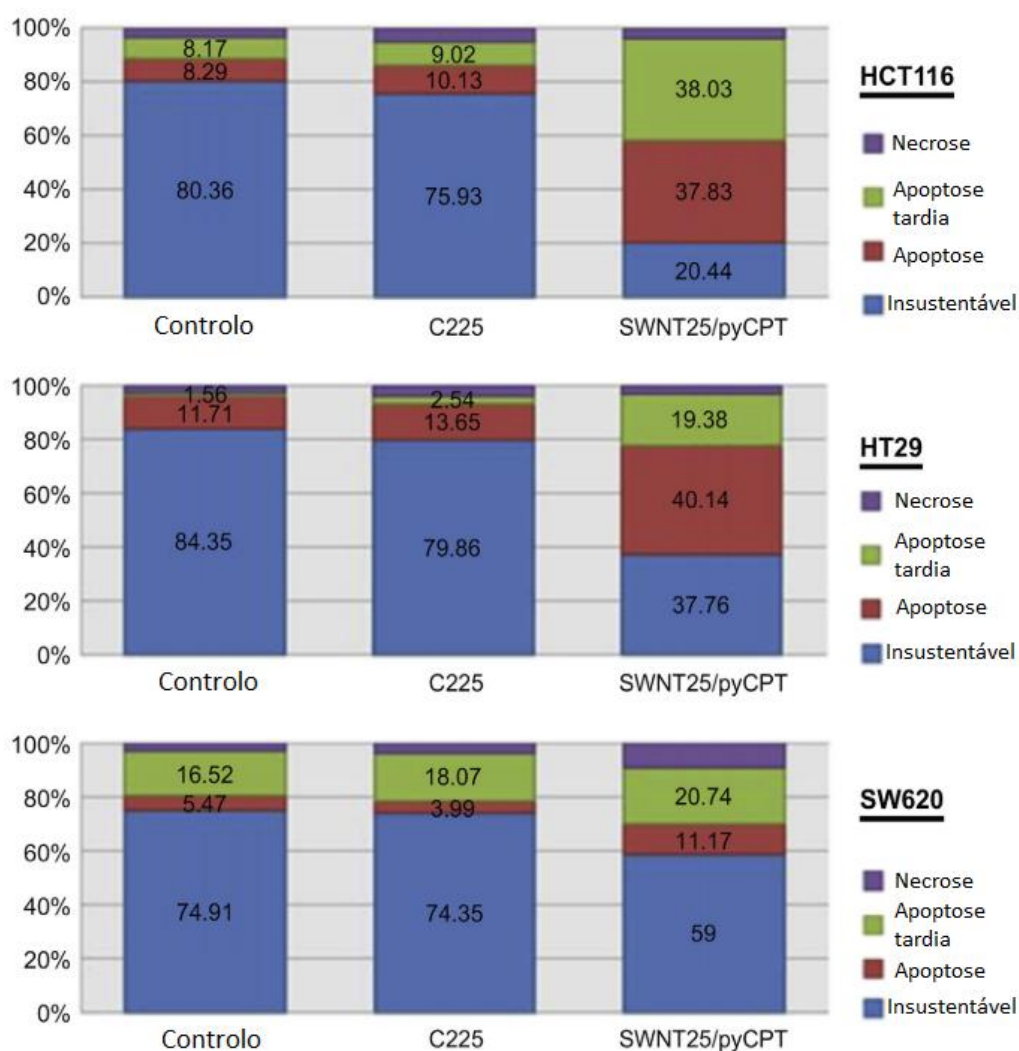


Figura 6.11 - Percentagens de necrose, apoptose e apoptose tardia para os três tipos de células de CCR, HCT116, HT29 e SW620, em três situações, grupo de controlo, apenas com cetuximab e nanossistema com cetuximab. Adaptado de (97).

Conclui-se deste modo que nanotubos de carbono com boa biocompatibilidade, absorção celular eficaz e uma associação estável entre nanocelas de carbono e CTX podem ser um tratamento futuro promissor e que devem continuar a desenvolver-se estudos com SWNT para aplicações médicas e não apenas para meios de diagnóstico.

A terceira preparação utilizada foi criada com AuNP, que serviram como o núcleo da preparação. As AuNP foram cobertas com PEG, de forma a melhorar a biocompatibilidade e a estabilidade, e foi anexado à superfície um composto à base de zinco e doxorrubicina (ZnD), que atua como antineoplásico, embebida em albumina de soro bovino (BSA), para ter um efeito semelhante ao HSA. Foi ainda anexado CTX de

modo a aumentara seletividade do sistema, que denominaram de NanoZnD. A figura 6.12 representa os vários componentes da formulação (99).

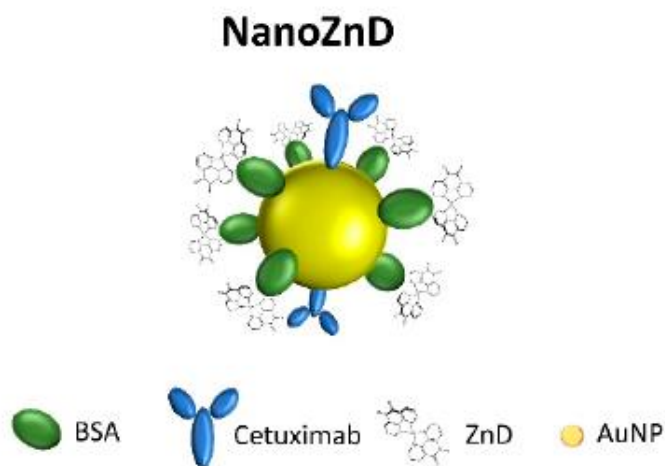


Figura 6.12 - Formulação do sistema NanoZnD que consiste num núcleo de nanopartículas de ouro cobertas com PEG com o composto antineoplásico de zinco e doxorrubicina (ZnD), embebidas com albumina de soro bovino (BSA) e cetuximab (CTX) acoplado. Adaptado de (99).

Realizaram testes *in vitro* e *in vivo*, em culturas de células HCT116 e em células HCT116 resistentes a doxorrubicina (HCT116DR), que foram injetadas em ratinhos.

O primeiro teste *in vitro* realizado foi para determinar a eficácia da preparação ZnD, com um tempo de incubação de 48 horas à concentração 0,60 μ M. Os valores obtidos das células HCT116 foi de cerca 20% na apoptose e cerca de 40% na apoptose tardia mas não se notaram diferenças significativas em termos de necrose, como demonstrado na figura 6.13 (99).

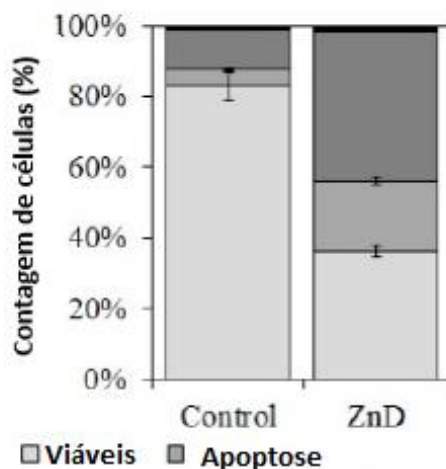


Figura 6.13 - Resultado da contagem de células para a preparação de zinco e doxorrubicina (ZnD) comparando com o grupo de controlo. Adaptado de (99).

O segundo teste *in vitro* realizado foi a eficácia das preparações o que se traduz em viabilidade celular. Foram testadas 5 preparações distintas nas células HCT116 e HCT116DR, num tempo de incubação de 24 horas e 48 horas à mesma concentração que no teste anterior, 0,60 μ M. A preparação 1 era apenas de CTX (controlo), a preparação 2 consistiu numa associação de AuNP com PEG e CTX, denominada de AuNP@PEG@CTX, a preparação 3 consistiu em ZnD livre, a preparação 4 era composta por uma associação de AuNP com PEG e ZnD, denominada AuNP@PEG@ZnD e a preparação 5 foi o nanossistema inicialmente proposto para estudo do NanoZnD (99).

Os resultados obtidos para as células HCT116 mostraram que a preparação 2 não apresentou qualquer alteração nos valores registados comparando com o grupo controlo. A preparação 3 demonstrou que ao fim de 24 horas a viabilidade celular tinha reduzido cerca de 38% e ao fim de 48 horas cerca de 45%, a preparação 4 apresentou ao fim de 24 horas uma redução de 57% da viabilidade celular e cerca de 68% às 48 horas e a preparação 5 que apresentou uma redução de 59% às 24 horas e uma redução 62% às 48 horas (99).

Os resultados obtidos para as células HCT116DR não tiveram diferenças significativas face às HCT116. Para as preparações 3 e 4 a redução foi ligeiramente mais baixa às 24 e 48 horas, o que é expectável devido à resistência apresentada pelas células e a preparação 5 obteve uma redução de viabilidade celular às 24 horas e às 48 horas semelhante, como representado na figura 6.14 (99).

O teste *in vivo* realizou-se após injeção de células HCT116DR injetadas nos ratinhos, com o tratamento a ser iniciado quando os tumores atingiram os 10 mm³, por duas injeções por via IV separadas por 4 dias à de 0,60 μ M. Foi utilizada uma solução salina (PBS), como controlo. Os resultados observados foram que nas preparações com solução salina e AuNP@PEG@CTX não se observaram reduções no crescimento tumoral. Na preparação com o composto ZnD livre observou-se uma redução de 26% no crescimento tumoral. Na preparação sem cetuximab, a AuNP@PEG@ZnD a redução foi mais acentuada, com valores de redução de 76%. A preparação com o sistema em estudo, a NanoZnD, reduziu completamente o crescimento tumoral quando comparado com o grupo de controlo (99).

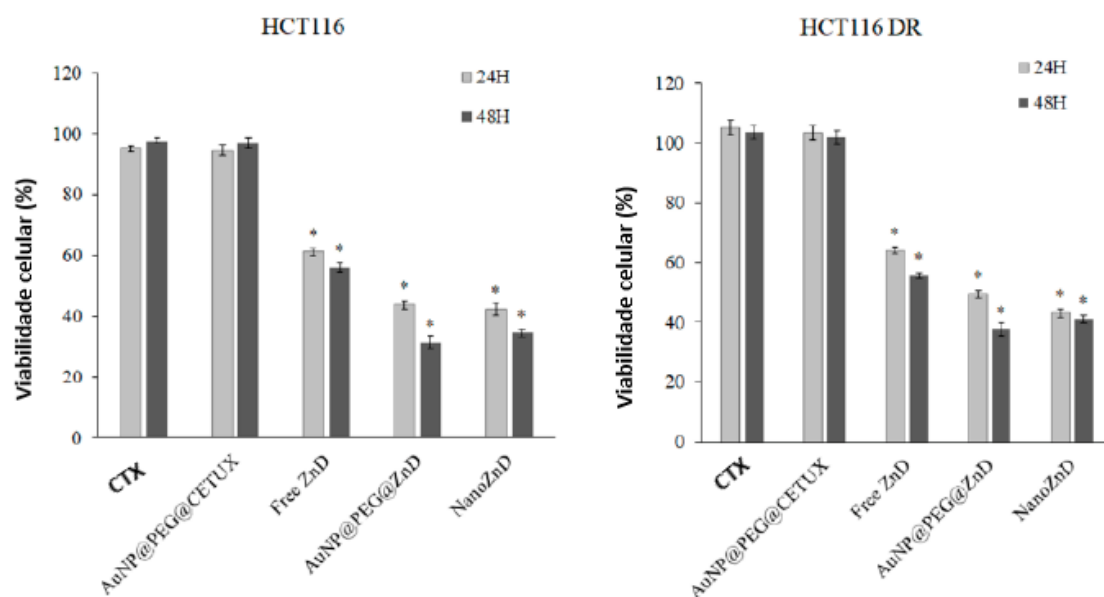


Figura 6.14 - Valores da viabilidade celular para as células HCT116 e HCT116DR nas 5 preparações, para incubações de 24 e 48 horas. Adaptado de (99).

Este estudo demonstrou que o CTX juntamente com o complexo NanoZnD resultava numa morte celular seletiva, com resultados positivos em células que apresentavam resistência a um antineoplásico sem atingir valores de toxicidade sistémica, o que foi demonstrado no teste *in vivo*.

6.3. Panitumumab

A utilização de PAN na terapia de CCR foi proposta por aplicação de um nanossistema composto por nanocelas de apoferritina. Este nanossistema compõe-se de ferritina não-ligada a iões de ferro, que possuem uma cavidade biorreativa que é sensível a pH ácido, estando as nanocelas preenchidas com oxaliplatina, um antineoplásico, em cuja superfície se ligou um conjugado de PEG e PAN, o qual se espera que medeie uma ligação especificamente às células alvo. A formulação do sistema com PAN, que está representada na figura 6.15, foi denominada de AFPO, enquanto o sistema sem PAN foi denominada AFO (100). Foram escolhidas nanocelas devido às suas dimensões, 8 a 12 nm, o que permite uma maior penetração nas barreiras fisiológicas das células tumorais. Além disso, as nanocelas apresentam também estabilidade térmica e sensibilidade a diferenças de pH, o que pode acelerar a distribuição de fármaco quando atingem as células alvo (101–103).

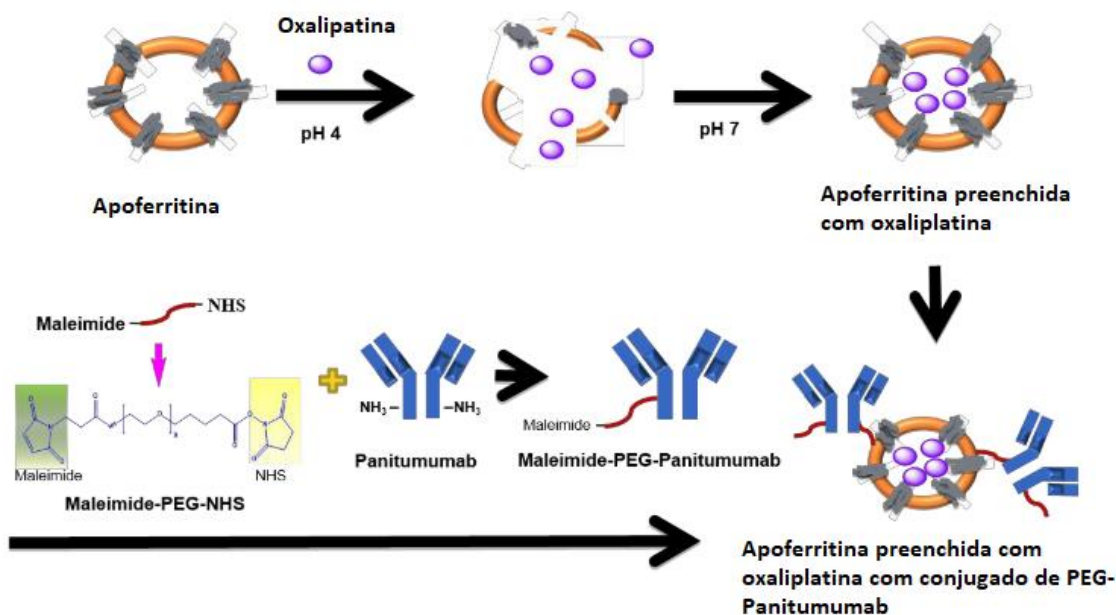


Figura 6.15 - Construção da formulação de nanocelas de apoferritina que foi preenchida com oxaliplatina e se acoplou à superfície um conjugado de PEG com panitumumab. Adaptado de (100).

O estudo demonstrou que a pH básico a libertação de fármaco foi sempre superior, entre 10 e 40%, comparando com libertação a pH ácido, ao longo de 7 dias. Foram utilizados três tipos de células cancerígenas com diferentes níveis de expressão de EGFR, mas apenas foram analisados os resultados de células HCT116 e SW620, respetivamente com maior e menor expressão. Após incubação das células com o sistema AFPO ou AFO durante 24 e 48 horas e à concentração de 10 μ M, verificou-se existirem alterações significativas de viabilidade celular nas células SW620 quando foram administradas preparações distintas, como se verifica na figura 6.16 (100).

Quando foi administrado apenas PAN, não houve grande alteração da viabilidade celular das células SW620, comparando com o grupo controlo, ao contrário dos resultados observados quando foi administrado o sistema AFPO, em que os valores de viabilidade celular rondaram os 40% em 24 horas e 30% em 48 horas. Quando foi administrado o sistema AFO os valores de viabilidade celular rondaram os 40% em 24 horas e os 35% em 48 hora. Quando foi administrada apenas oxaliplatina, os valores rondaram os 35% em 24 horas e os 17% em 48 horas, representado na figura 6.16 (100).

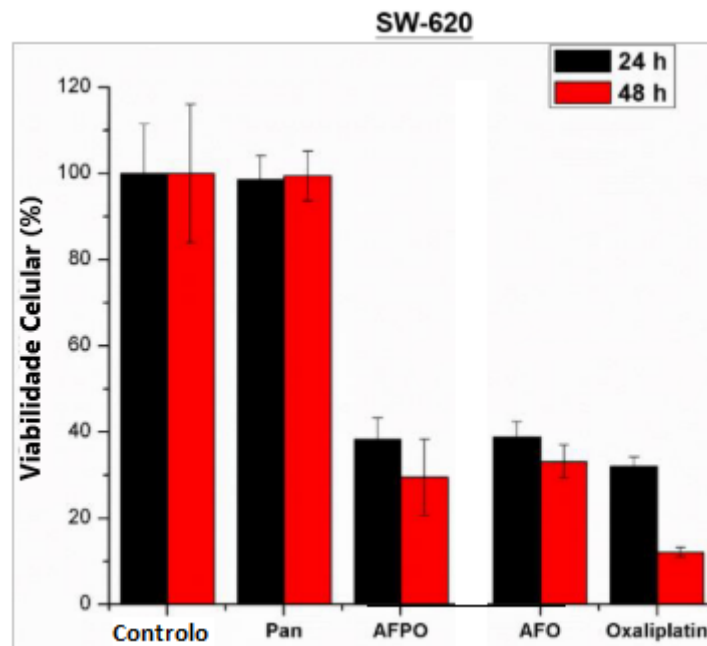


Figura 6.16 - Viabilidade celular no grupo SW620 em 5 grupos diferentes, grupo de controlo, grupo administrado com panitumumab (PAN), grupo com sistema de nanocelas de apoferritina com panitumab e oxaliplatina, grupo com o sistema sem panitumumab e grupo com oxaliplatina livre. Adaptado de (100).

No grupo de células HCT116, quando foi administrado apenas PAN mais uma vez observou-se que não houve grande alteração nos valores de viabilidade celular das células HCT116, ao contrário dos resultados observados quando foi administrado o sistema AFPO, em que a viabilidade celular rondou os 30% em 24 horas e os 20% em 48 horas. Quando foi administrado o sistema AFO os valores de viabilidade celular rondaram os 40% em 24 horas e os 38% em 48 horas. Quando foi administrada apenas oxaliplatina, os valores rondaram os 18% em 24 horas e os 3% em 48 horas representado na figura 6.17 (100).

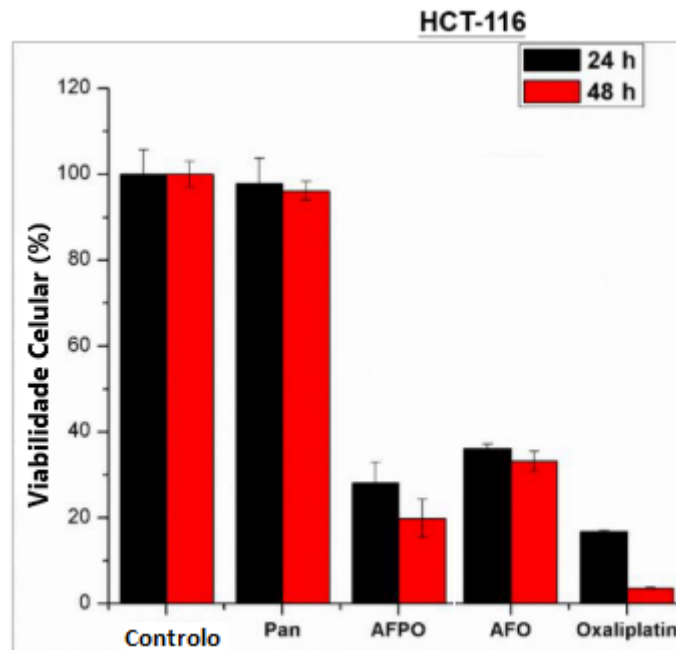


Figura 6.17 - Viabilidade celular no grupo HCT116 em 5 grupos diferentes, grupo de controlo, grupo administrado com panitumumab (PAN), grupo com sistema de nanocelas de apoferritina com panitumab e oxaliplatina, grupo com o sistema sem panitumumab e grupo com oxaliplatina livre.. Adaptado de (100).

Isto demonstra que quando é administrado apenas o antineoplásico oxaliplatina, os valores de viabilidade celular obtidos são inferiores em relação aos sistemas AFPO e AFO. No entanto, há que ter em conta que estes sistemas são mais seletivos do que o antineoplásico isolado, o que nos fornece uma maior segurança, pois a falta de seletividade do antineoplásico pode levá-lo a outras células que não as células cancerígenas de CCR, que são as células-alvo. Isso representa consequências para a saúde do doente e não depende apenas do antineoplásico, senão também do tempo exposição, ou seja, o número de ciclos e dias de tratamento. Os resultados obtidos em termos de apoptose das células cancerígenas do grupo SW620 indicaram 4,7% e de 6,6% para 24 e 48 horas, respetivamente, e o grupo HCT116, apresentou valores de 13,3% e 15,5% para 24 e 48 horas, respetivamente, como representado na figura 6.18 (100).

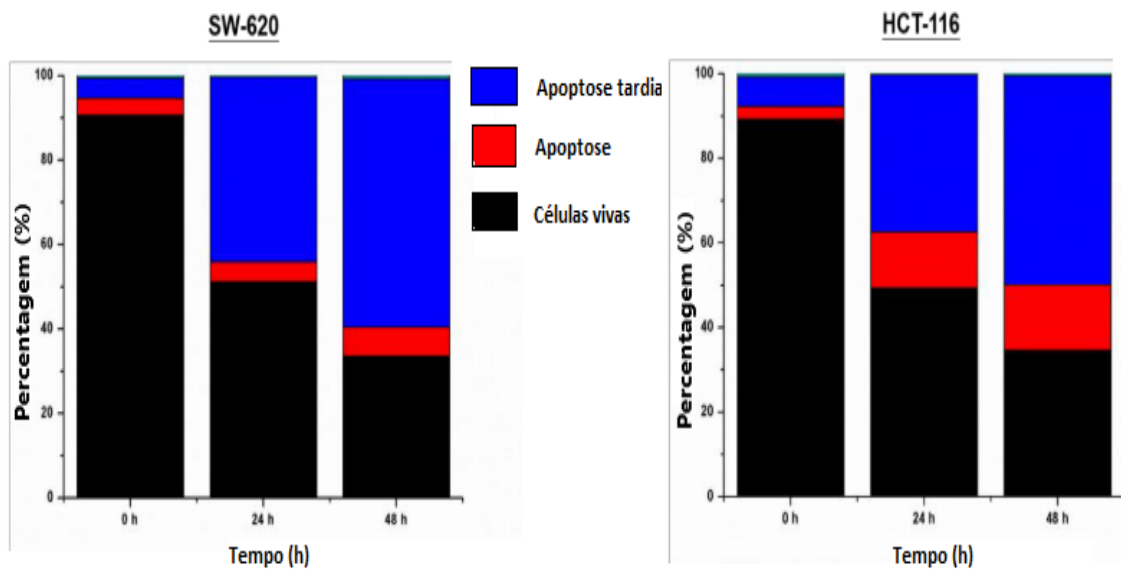


Figura 6.18 - Percentagem de apoptose, apoptose tardia e de células vivas dos grupos SW 620 e HCT 116 em incubações de 24 e 48 horas. Adaptado de (100).

O estudo demonstrou que as nanocelas AFPO possuem a capacidade de encapsular agentes neoplásicos solúveis em água e conjugá-los com AbMo e que a cavidade biorreativa existente na apoferritina, a qual é sensível a pH ácido, leva a que a entrega de fármaco só ocorra nas células cancerígenas de CCR, beneficiando do pH ácido destas (100).

Conclusão

A realização desta dissertação tinha como objetivo principal observar os efeitos da associação entre AbMo e nanossistemas aplicados na terapia de cancro colorretal. Os estudos analisados e descritos permitiram estabelecer que uma das funções dos AbMo é direcionar especificamente as preparações, com fármacos antineoplásicos, para as células alvo.

Existem vários tipos de células cancerígenas de CCR como HCT116, SW620, HT29 que apresentam valores diferentes de expressão dos fatores EGFR e VEGF.

A análise dos vários estudos disponíveis na literatura permitiu verificar que a sua maioria foca a utilização de nanossistemas de base inorgânica, o que foi algo surpreendente, visto haver uma noção generalizada de que estes sistemas são comumente utilizados a nível de diagnóstico e imagem, mas não a nível da terapêutica que tipicamente tem maior prevalência dos nanossistemas orgânicos. Isto indica-nos um potencial futuro no tratamento, não só de CCR, mas também em outras neoplasias e doenças.

Com base nos resultados descritos, observa-se que a associação entre AbMo e nanossistemas é de facto bastante benéfica. Esta associação induz uma diminuição da viabilidade celular, embora essa diminuição seja menor nas células com menor expressão dos fatores e com resistência a fármacos antineoplásicos, e um aumento da apoptose, necrose ou apoptose tardia das células cancerígenas, que é mais alta no tipo de células com maior expressão dos fatores. Isto é devido à afinidade dos AbMo por estes fatores de crescimento. Demonstram também que esta associação permite uma maior entrega de fármaco de forma controlada, o que leva a um aumento na eficácia da terapêutica. Como ainda não existem muitos estudos, apesar das indicações serem boas nos ensaios realizados em animais, ainda existem um longo caminho a percorrer e a necessidade de mais estudos, em especial estudos *in vivo* para se poder prosseguir para ensaios clínicos.

No futuro, espera-se que o melhor conhecimento molecular das vias de ativação, proliferação tumoral e expressão de fatores de crescimento, como dos mecanismos de resistência aos fármacos e dos biomarcadores preditivos de resposta terapêutica, possa levar ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos e melhor utilização dos já existentes, de forma a garantirmos a melhor qualidade possível aos doentes e chegar a soluções que permitam prolongar a sua sobrevivência.

Referências Bibliográficas

1. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Mosconi S, Mandalà M, Cervantes A, et al. Early colon cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013;24(SUPPL.6).
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359–86.
3. Roy Chowdhury M, Schumann C, Bhakta-Guha D, Guha G. Cancer nanotheranostics: Strategies, promises and impediments. *Biomed Pharmacother*. 2016;84:291–304.
4. Luengo-Fernandez R, Leal J, Gray A, Sullivan R. Economic burden of cancer across the European Union: A population-based cost analysis. *Lancet Oncol*. 2013;14:1165–74.
5. Friberg S, Nyström AM. Nanotechnology in the war against cancer: New arms against an old enemy - A clinical view. *Futur Oncol*. 2015;11:1961–75.
6. Kamaly N, Xiao Z, Valencia P, Radovic-Moreno A, Farokhzad O. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Natl Institutes Heal*. 2012;41(7):75.
7. Spasevska I, Duong MN, Klein C, Dumontet C. Advances in bispecific antibodies engineering: Novel concepts for immunotherapies. *J Blood Disord Transfus*. 2015;06:1–8.
8. Kratz F, Senter P, Steinhagen H. Anticancer therapeutics delivery technologies for biopharmaceuticals handbook of therapeutic antibodies modern biopharmaceuticals. 2012. 84 p.
9. American Cancer Society. Colorectal cancer facts & figures 2017-2019. 2019;
10. Pickhardt PJ, Kim DH, Pooler BD, Hinshaw JL, Barlow D, Jensen D, et al. Assessment of volumetric growth rates of small colorectal polyps with CT colonography: A longitudinal study of natural history. *Lancet Oncol*. 2013;14:711–20.
11. Half E, Bercovich D, Rozen P. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis*. 2009;4:1–23.
12. Risio M. The natural history of adenomas. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2010;24:271–80.
13. VanPutte C, Regan J, Russo A, Seeley R, Stephens T, Tate P. Digestive system; Seeley's anatomy & physiology. 10th ed. New York: McGraw-Hill; 2014.

- 859–97 p.
14. National Cancer Institute. Colon cancer treatment – Patient version [Internet]. 2019 [cited 2020 Jan 6]. Available from: <https://www.cancer.gov/types/colorectal/patient/colon-treatment-pdq>
 15. Fearon E, Vogelstein B. A genetic model for colorectal Tumorigenesis. *Cell Press*. 1990;61:759–67.
 16. Morán A, Ortega P, de Juan C, Fernández-Marcelo T, Frías C, Sanchez-Pernaute A, et al. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol*. 2010;2(3):151.
 17. Annie Y, Kerr D, Hobbs R. ABC of colorectal cancer. 2nd ed. 2011. 88 p.
 18. ESMO. Cancro colorretal: Um guia para o doente. 2016;1:53.
 19. Direção-Geral da Saúde. Programa nacional para as doenças oncológicas. *Saúde em Números*. 2017;24.
 20. National Cancer Institute. Cancer stat facts: Colorectal cancer [Internet]. 2016 [cited 2019 Dec 20]. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>
 21. Barroso S, Carvalho M. Plano regional de oncologia do Alentejo - PROA. 2013;1–29.
 22. NHS. Bowel cancer - Symptoms [Internet]. 2019 [cited 2019 Nov 11]. Available from: <https://www.nhs.uk/conditions/bowel-cancer/symptoms/>
 23. Thélin C, Sikka S. Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, lifetime risk factors statistics and temporal trends. *Intech*. 2015;
 24. American Cancer Society. Colorectal cancer risk factors [Internet]. 2018 [cited 2019 Nov 14]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>
 25. Libutti S, Willett C, Salz L, Levine R. *Cancer - Principles and practice of Oncology*. 10th ed. Vincent D, Theodore L, Steven R, editors. Vol. 73. 2015. 2275 p.
 26. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. *Lancet*. 2010;375(9719):1030–47.
 27. Rotimi A, Hamza A, Evan B, Muhammed S, Humberto S. Screening and surveillance colonoscopy. *Intech*. 2015;19.
 28. Edge SB, Compton CC. The american joint committee on cancer: The 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010;17:1471–4.
 29. Bowel Cancer Australia. What is bowel cancer. 2020.
 30. Silva J, Fernandes A, Baptista P. Application of nanotechnology in drug delivery.

- AD S, editor. 2014. 153 p.
31. Fang Z, Bhandari B. Encapsulation of polyphenols. *Trends Food Sci Technol.* 2010;21(10):510–23.
 32. Kumar A, Mansour HM, Friedman A, Blough ER. *Nanomedicine in drug delivery.* New York; 2013. 446 p.
 33. Cancino J, Marangoni VS, Zucolotto V. Nanotechnology in medicine: concepts and concerns. *Quim Nova.* 2014;37(3):521–6.
 34. Freitas RA. What is nanomedicine? *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2005;1(1):2–9.
 35. Duncan R, Gaspar R. Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol Pharm.* 2011;8(6):2101–41.
 36. Allen TM, Chonn A. Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Lett.* 1987;223(1):42–6.
 37. Ahmad J, Akhter S, Rizwanullah M, Amin S, Rahman M, Ahmad MZ, et al. Nanotechnology-based inhalation treatments for lung cancer: State of the art. *Nanotechnol Sci Appl.* 2015;8:55–66.
 38. Mirza AZ, Siddiqui FA. Nanomedicine and drug delivery. *Int Nano Lett.* 2014;4(1).
 39. Deda DK, Araki K. Nanotechnology, light and chemical action: An effective combination to kill cancer cells. *J Braz Chem Soc.* 2015;26(12):2448–70.
 40. Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas L de L, Pohlmann AR. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim Nova.* 2003;26(5):726–37.
 41. Steichen SD, Caldorera-Moore M, Peppas NA. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *Eur J Pharm Sci.* 2013;48(3):416–27.
 42. Grenha A, Carrión-Recio D, Teijeiro D, Seijo B. *Handbook of Particulate Drug Delivery.* American Scientific Publishers; 2008. 1–28 p.
 43. Komiya K, Nakamura T, Nakashima C, Takahashi K, Umeguchi H, Watanabe N, et al. SPARC is a possible predictive marker for albumin-bound paclitaxel in non-small-cell lung cancer. *Onco Targets Ther.* 2016;9:6663–8.
 44. Akbarzadehlaleh P, Mirzaei M, Mashahdi-Keshtiban M, Shamsasenjan K, Heydari H. PEGylated human serum albumin: Review of pegylation, purification and characterization methods. *Adv Pharm Bull.* 2016;6(3):309–17.
 45. Bhaskar S, Lim S. Engineering protein nanocages as carriers for biomedical applications. *NPG Asia Mater.* 2017;9(4):1–18.
 46. Dai Z, Tu Y, Zhu L. Multifunctional micellar nanocarriers for tumor-targeted

- delivery of hydrophobic drugs. *J Biomed Nanotechnol.* 2016;12(6):1199–210.
47. Jhaveri AM, Torchilin VP. Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA. *Front Pharmacol.* 2014;1–26.
 48. Huang Y, Cole SPC, Cai T, Cai Y. Applications of nanoparticle drug delivery systems for the reversal of multidrug resistance in cancer. *Oncol Lett.* 2016;12(1):11–5.
 49. Li Z, Tan S, Li S, Shen Q, Wang K. Cancer drug delivery in the nano era: An overview and perspectives. *Oncol Rep.* 2017;38(2):611–24.
 50. Zhang X, Zhang P. Polymersomes in Nanomedicine - A Review. *Curr Nanosci.* 2016;13(2):124–9.
 51. Meng F, Zhong Z, Feijen J. Stimuli-responsive polymersomes for programmed drug delivery. *Biomacromolecules.* 2009;10(2):197–209.
 52. Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(SUPPL.):72–82.
 53. Irimie AI, Sonea L, Jurj A, Mehterov N, Zimta AA, Budisan L, et al. Future trends and emerging issues for nanodelivery systems in oral and oropharyngeal cancer. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:4593–606.
 54. Zhang XY, Zhang PY. Nanotechnology for multimodality treatment of cancer. *Oncol Lett.* 2016;12(6):4883–6.
 55. Weiss J, Decker EA, McClements DJ, Kristbergsson K, Helgason T, Awad T. Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. *Food Biophys.* 2008;3(2):146–54.
 56. Naseri N, Valizadeh H, Zakeri-Milani P. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Structure preparation and application. *Adv Pharm Bull.* 2015;5(3):305–13.
 57. Li Z, Barnes JC, Bosoy A, Stoddart JF, Zink JI. Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications. *Chem Soc Rev.* 2012;41(7):2590–605.
 58. Song Y, Li Y, Xu Q, Liu Z. Mesoporous silica nanoparticles for stimuli-responsive controlled drug delivery: Advances, challenges, and outlook. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:87–110.
 59. Moreno-Vega AI, Gómez-Quintero T, Nuñez-Anita RE, Acosta-Torres LS, Castaño V. Polymeric and ceramic nanoparticles in biomedical applications. *J Nanotechnol.* 2012;2012.
 60. Duncan R, Gaspar R. Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol Pharm.* 2011;8:2101–41.
 61. Cho K, Wang X, Nie S, Chen Z, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(5):1310–6.

62. Terranova ML, Sessa V, Rossi M. The world of carbon nanotubes: An overview of CVD growth methodologies. *Chem Vap Depos.* 2006;12(6):315–25.
63. Leslie A, Desheng Z, Fei Z, Zhi-Yuan L, Xingde L, Younan X. A Quantitative Study on the Photothermal Effect of Immuno Gold Nanocages Targeted to Breast Cancer Cells. *ACS Nano.* 2008;2(8):1645–52.
64. Zheng H, Li X, Chen C, Chan J, Sun S, Jin L, et al. Quantum dot-based immunofluorescent imaging and quantitative detection of TOP2A and prognostic valve in triple-negative breast cancer. *Int J Nanomedicine.* 2016;5519–29.
65. Chen H, Cheng X. Tumor heterogeneity and resistance to EGFR-targeted therapy in advanced nonsmall cell lung cancer: challenges and perspectives. *Onco Targets Ther.* 2014;7:1689–704.
66. Burrell R a., Swanton C. Tumour heterogeneity and the evolution of polyclonal drug resistance. *Mol Oncol.* 2014;1095–111.
67. Rebucci M, Michiels C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochem Pharmacol.* 2013;1219–26.
68. Minko T, Rodriguez-Rodriguez L, Pozharov V. Nanotechnology approaches for personalized treatment of multidrug resistant cancers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;1880–95.
69. Guo H, Lai Q, Wang W, Wu Y, Zhang C, Liu Y, et al. Functional alginate nanoparticles for efficient intracellular release of doxorubicin and hepatoma carcinoma cell targeting therapy. *Int J Pharm.* 2013;1–11.
70. Kennett RG. Monoclonal antibodies. Hybrid myelomas--a revolution in serology and immunogenetics. *Am J Hum Genet.* 1979;539–47.
71. Ryman JT, Meibohm B. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* 2017;6(9):576–88.
72. Khiavi MA, Safary A, Somi MH. Recent advances in targeted therapy of colorectal cancer: Impacts of monoclonal antibodies nanoconjugates. *BiolImpacts.* 2019;9(3):123–7.
73. Smith BT. Introduction to Diagnostic and Therapeutic. *Univ New Mex Heal Sci Cent.* 2012;1–34.
74. Chen LF, Cohen EEW, Grandis JR. New strategies in head and neck cancer: understanding resistance to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Clin Cancer Res.* 2010;16:2489–96.
75. Pandey JP. Mechanism of resistance to cetuximab therapy in colorectal cancer: Possible role of antibodies to immunoglobulin allotypes. *MAbs.* 2012;4:553–4.
76. Labrijn AF, Buijsse AO, Van Den Bremer ETJ, Verwilligen AYW, Bleeker WK, Thorpe SJ, et al. Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with

- endogenous human IgG4 in vivo. *Nat Biotechnol.* 2009;27(8):767–71.
77. Agency IAE. Clinical translation of radiolabelled monoclonal antibodies and peptides. 2009;8:58.
 78. Owen J, Punt J, Stranford S. *Kuby Immunology*. W. H. Freeman and Company; 2013. 49 p.
 79. Fernandes E, Ferreira JA, Peixoto A, Lima L, Barroso S, Sarmiento B, et al. New trends in guided nanotherapies for digestive cancers. *J Control Release.* 2015;
 80. European Medicines Agency. Avastin - EMEA. 2007;13.
 81. European Medicines Agency. Herceptin - EMEA. 2010;4.
 82. European Medicines Agency. Cimzia - EMEA. 2013;4.
 83. European Medicines Agency. Lemtrada - EMEA. 2019;3.
 84. European Medicines Agency. Benlysta - EMEA. 2019;3.
 85. European Medicines Agency. Erbitux - EMEA. 2014;4.
 86. European Medicines Agency. Vectibix - EMEA. 2019;3.
 87. Mamot C, Ritschard R, Küng W, Park JW, Herrmann R, Rochlitz CF. EGFR-targeted immunoliposomes derived from the monoclonal antibody EMD72000 mediate specific and efficient drug delivery to a variety of colorectal cancer cells. *J Drug Target.* 2006;14(4):215–23.
 88. Matuzumab discontinued [Internet]. 2008. Available from: <https://www.zenopa.com/news/18473299/takeda-and-merck-kгаа-discontinue-development-of-matuzumab>
 89. Kaplan-Lefko PJ, Graves JD, Zoog SJ, Pan Y, Wall J, Branstetter DG, et al. Conatumumab, a fully human agonist antibody to death receptor 5, induces apoptosis via caspase activation in multiple tumor types. *Cancer Biol Ther.* 2010;9(8):618–31.
 90. Conatumumab discontinued [Internet]. Available from: <https://adisinsight.springer.com/drugs/800024319>
 91. Li Y, Duo Y, Zhai P, He L, Zhong K, Zhang Y, et al. Dual targeting delivery of miR-328 by functionalized mesoporous silica nanoparticles for colorectal cancer therapy. *Nanomedicine.* 2018;13(14):1753–72.
 92. Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014;66:2–25.
 93. Luis de Redín I, Expósito F, Agüeros M, Collantes M, Peñuelas I, Allemandi D, et al. In vivo efficacy of bevacizumab-loaded albumin nanoparticles in the treatment of colorectal cancer. *Drug Deliv Transl Res.* 2020;10(3):635–45.
 94. Kashiwagi E, Shiota M, Yokomizo A, Inokuchi J, Uchiumi T, Naito S. EP2

- signaling mediates suppressive effects of celecoxib on androgen receptor expression and cell proliferation in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2014;17(1):10–7.
95. Erdoğ A, Putra Limasale YD, Keskin D, Tezcaner A, Banerjee S. In vitro characterization of a liposomal formulation of celecoxib containing 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine, Cholesterol, and Polyethylene Glycol and its functional effects against colorectal cancer cell lines. *J Pharm Sci.* 2013;102(10):3666–77.
 96. Limasale YDP, Tezcaner A, Özen C, Keskin D, Banerjee S. Epidermal growth factor receptor-targeted immunoliposomes for delivery of celecoxib to cancer cells. *Int J Pharm.* 2015;479(2):364–73.
 97. Lee PC, Chiou YC, Wong JM, Peng CL, Shieh MJ. Targeting colorectal cancer cells with single-walled carbon nanotubes conjugated to anticancer agent SN-38 and EGFR antibody. *Biomaterials.* 2013;34(34):8756–65.
 98. Kam NWS, O'Connell M, Wisdom JA, Dai H. Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(33):11600–5.
 99. Pedrosa P, Corvo ML, Ferreira-Silva M, Martins P, Carvalheiro MC, Costa PM, et al. Targeting cancer resistance via multifunctional gold nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 2019;20(21):1–17.
 100. Lin CY, Yang SJ, Peng CL, Shieh MJ. Panitumumab-Conjugated and Platinum-Cored pH-Sensitive Apoferritin Nanocages for Colorectal Cancer-Targeted Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018;10(7):6096–106.
 101. Ghosh S, Mohapatra S, Thomas A, Bhunia D, Saha A, Das G, et al. Apoferritin Nanocage Delivers Combination of Microtubule and Nucleus Targeting Anticancer Drugs. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(45):30824–32.
 102. Chauhan VP, Stylianopoulos T, Martin JD, Popovič Z, Chen O, Kamoun WS, et al. Normalization of tumour blood vessels improves the delivery of nanomedicines in a size-dependent manner. *Nat Nanotechnol.* 2012;7(6):383–8.
 103. Schoonen L, Van Hest JCM. Functionalization of protein-based nanocages for drug delivery applications. *Nanoscale.* 2014;6(13):7124–41.