

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Departamento de Química e Farmácia



Aplicação de Nanossistemas na Terapêutica do Cancro do Pulmão

Helena Isabel Viegas Horta

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob orientação de
Professora Doutora Ana Margarida Grenha

2015

Aplicação de nanossistemas na terapêutica do cancro do pulmão

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Departamento de Química e Farmácia



Aplicação de Nanossistemas na Terapêutica do Cancro do Pulmão

Helena Isabel Viegas Horta

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:
Professora Doutora Ana Margarida Grenha

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2015

Aplicação de Nanossistemas na Terapêutica do Cancro do Pulmão

Declaração de autoria de trabalho

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

(Assinatura do Autor)

Copyright© Helena Horta.

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 objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Começo por agradecer à minha orientadora, a professora Doutora Ana Margarida Grenha, por todo o apoio, dedicação e disponibilidade que empregou ao longo da formulação da presente monografia. E também por todos os ensinamentos que me transmitiu, não só na orientação da monografia, mas também nas várias disciplinas que lecionou.

À professora Doutora Isabel Ramalinho agradeço por toda a sua dedicação, com os alunos e com o curso, não só nas suas aulas, mas também em relação aos estágios curriculares, esforçando-se para garantir locais de estágio para todos os alunos e estando sempre à disposição para qualquer eventualidade.

Agradeço também a todos os docentes que contribuíram com a sua dedicação e ensinamentos para o meu percurso académico e formação como futura farmacêutica e profissional de saúde.

À equipa dos serviços farmacêuticos do Hospital CUF Infante Santo e do Hospital CUF Descobertas, agradeço por toda a disponibilidade e ensinamentos que foram realmente importantes para o meu enriquecimento profissional.

À equipa da farmácia da Penha, agradeço bastante por toda a disponibilidade, todos os ensinamentos que me transmitiram e pelo companheirismo e integração na equipa.

Aos meus pais, agradeço imenso por toda a dedicação, apoio, carinho, reconhecimento, por estarem sempre presentes e dispostos a apoiar-me e acompanhar-me em todo o meu percurso e por tudo o que depositaram em mim, confiando sempre no meu empenho e sucesso académico.

Ao meu namorado, Aleksandar, agradeço bastante por toda a dedicação, compreensão, apoio, afeto, por estar sempre ao meu lado e me apoiar em qualquer circunstância e acreditar sempre em mim e nas minhas capacidades.

Aos meus restantes familiares, agradeço pelo apoio e reconhecimento ao longo de todo o meu percurso académico.

Aos meus amigos, aos que se tornaram ao longo deste percurso e aos que já eram e se mantiveram, especialmente aos mais próximos, agradeço por toda a amizade e apoio, pelos bons momentos e memórias que me proporcionaram nestes cinco anos.

A todos que de alguma forma contribuíram para que concluísse a minha dissertação e para o meu percurso académico, o meu muito obrigada!

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| ÍNDICE DE FIGURAS | v |
| ÍNDICE DE GRÁFICOS | vi |
| ÍNDICE DE TABELAS | vii |
| LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS | viii |
| RESUMO | xi |
| ABSTRACT | xii |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. METODOLOGIA | 3 |
| 3. CANCRO DO PULMÃO | 4 |
| 3.1. Epidemiologia – incidência e mortalidade | 4 |
| 3.2. Sintomas | 6 |
| 3.3. Fisiopatologia – etiologia do cancro do pulmão | 6 |
| 3.3.1. Fatores ambientais | 7 |
| 3.3.2. Fatores genéticos | 10 |
| 3.4. Carcinogénese | 11 |
| 3.5. Crescimento tumoral | 13 |
| 3.6. Angiogénese e metastização | 13 |
| 3.7. Diagnóstico e estadiamento | 15 |
| 3.8. Tratamento convencional | 15 |
| 3.8.1. Cirurgia | 16 |
| 3.8.2. Radioterapia | 16 |
| 3.8.3. Quimioterapia | 17 |
| 3.8.4. Terapêuticas biológicas dirigidas | 18 |
| 4. NANOSSISTEMAS | 19 |
| 4.1. Tipos de nanossistemas | 20 |
| 4.2. Vetorização de agentes terapêuticos | 22 |
| 4.2.1. Vetorização passiva | 22 |
| 4.2.2. Vetorização ativa | 23 |
| 4.3. Vias de administração de terapêuticas que utilizam nanossistemas | 24 |
| 4.3.1. Via de administração oral | 25 |
| 4.3.2. Via de administração inalatória | 25 |

| | |
|---|----|
| 4.3.3. Via de administração intravenosa | 27 |
| 4.4. Desenho de nanossistemas para o transporte de fármacos | 28 |
| 4.5. Aplicação de nanossistemas no tratamento do cancro..... | 30 |
| 5. NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS E SUA APLICAÇÃO NA TERAPÊUTICA DO CANCRO DO PULMÃO DE NÃO-PEQUENAS CÉLULAS | 33 |
| 5.1. Interação com as células | 35 |
| 5.2. Aplicação de nanopartículas poliméricas no cancro do pulmão de não- pequenas células | 38 |
| 5.2.1. Ácido hialurónico | 40 |
| 5.2.2. Aminoácidos | 42 |
| 5.2.3. Policaprolactona | 44 |
| 5.2.4. Polissilsesquioxano | 45 |
| 5.2.5. Quitosano | 46 |
| 5.2.6. Ácido polilático-co-glicólico | 50 |
| 5.2.7. Ácido polilático | 55 |
| 5.2.8. Ciclodextrinas | 57 |
| 5.2.9. Albumina | 58 |
| 6. CONCLUSÃO | 59 |
| 7. BIBLIOGRAFIA | 61 |
| 8. ANEXOS | 69 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 3.1 | Esquema geral da carcinogénese química | 8 |
| Figura 3.2 | Desenvolvimento de um tumor para além do tamanho máximo limitado por difusão | 14 |
| Figura 4.1 | Evolução dos nanossistemas ao longo do tempo | 20 |
| Figura 4.2 | Tipos de nanossistemas inorgânicos | 21 |
| Figura 4.3 | Tipos de nanossistemas lipídicos | 21 |
| Figura 4.4 | Tipos de nanossistemas poliméricos | 22 |
| Figura 4.5 | Representação dos mecanismos de vetorização passiva e ativa | 23 |
| Figura 4.6 | Esquema demonstrativo das propriedades físico-químicas e requisitos das nanopartículas, <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , para aplicações médicas | 30 |
| Figura 5.1 | Esquema representativo de uma nanoesfera e de uma nanocápsula ... | 33 |
| Figura 5.2 | Interações num nanotransportador de quitosano sensível ao pH | 36 |
| Figura 5.3 | Nanopartículas de PLGA cobertas com membrana de eritrócitos | 37 |
| Figura 5.4 | Estudos <i>ex vivo</i> | 48 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 5.1 (A) Volume do tumor e (B) alteração do peso corporal em ratinhos xenotransplantados com tumor A549 do pulmão após tratamento com diferentes formulações | 44 |
| Gráfico 5.2 (A) Inibição da atividade da telomerase pelo transporte de 2'-O-metilARN (OMR), através de nanopartículas para as células do cancro do pulmão primário após tratamento de 72 horas com O-metil-ARN-nanoplexos (OMR+NP) ou OMR-nanoplexos não compatíveis (Mis+NP) | 51 |
| Gráfico 5.3 Percentagem de alteração do volume dos esferóides tumorais subsequente à aplicação de várias formulações de DOX e na solução salina | 54 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|---|
| Tabela 3.1 Taxas de incidência e mortalidade dos tumores malignos por patologia em Portugal (2009) | 5 |
| Tabela 3.2 Indicadores de mortalidade do tumor maligno da traqueia, brônquios e pulmão em Portugal continental (2008 a 2012) | 6 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|--------------|---|
| AA | Anisamida |
| ACm | Anticorpo monoclonal |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ALK | Cinase do linfoma anaplástico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| BAT | Biópsia aspirativa transtorácica |
| BRF | Broncofibroscopia |
| CAM | Sistema de membrana cório-alantóide de ovo de galinha |
| CMC | Carboximetilcelulose |
| CPPC | Cancro (ou carcinoma) do pulmão de pequenas células |
| CPNPC | Cancro (ou carcinoma) do pulmão de não-pequenas células |
| Cet | Cetuximab |
| CT | Tomografia computadorizada |
| CTS | Quitosano |
| DGS | Direção Geral da Saúde |
| DOX | Doxorubicina |
| DPI | Inaladores de pó seco |
| DPOC | Doença pulmonar obstrutiva crónica |
| DTXL | Docetaxel |
| GEN | Gencitabina |
| EBV | Vírus Epstein-Barr |
| EGF | Fator de crescimento epidérmico |
| EGFR | Recetor do fator de crescimento epidérmico |
| EMA | <i>European Medicine Agency</i> |
| EPR | Fenómeno de permeabilidade e retenção aumentada |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína |
| GATA2 | Proteína ligante GATA 2 |
| gpP | Glicoproteína P |
| HA | Ácido hialurónico |
| HER 2 | Recetor epidérmico humano do tipo 2 |

| | |
|--------------|---|
| Hp | <i>Helicobacter pylori</i> |
| HPV | Vírus do papiloma humano |
| IV | Intravenosa |
| MDI | Inaladores pressurizados com válvula doseadora |
| MDR | Resistência multifármaco |
| MEC | Matriz extracelular |
| NC | Nanocápsula |
| NP | Nanopartícula |
| OCA | Oleil cisteinamida |
| ODA | 1,8-diaminooctano |
| OMR | 2'-O-metil-ARN |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PAH | Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos |
| PCL | Policaprolactona |
| pcpl | Pró-fármaco lipofólico palmitato de paclitaxel |
| PGA | Ácido poliglutâmico |
| PEG | Polietilenoglicol |
| PEI | Polietilenimina |
| PLA | Ácido polilático |
| PLGA | Ácido polilático-co-glicólico |
| PSMA | Antigénio específico de membrana da próstata |
| PSQ | Polisilsesquioxano |
| PTX | Paclitaxel |
| QRT | Quimioradioterapia |
| QT | Quimioterapia |
| RES | Sistema reticuloendotelial |
| ROS | Espécies reativas de oxigénio |
| RRM2 | Subunidade M2 da enzima ribonucleótido redutase |
| RT | Radioterapia |
| siRNA | <i>small interfering RNA</i> |
| SPP | Sociedade Portuguesa de Pneumologia |
| TAC | Tomografia axial computadorizada |
| TGI | Trato gastrointestinal |
| TEM | Microscopia de transmissão eletrónica |

| | |
|---------------|--|
| TMN | <i>Tumor-Node-Metastasis</i> |
| TPP | Tripolifosfato |
| tetrac | Ácido tetraiodotiroacético |
| TF | Transferrina |
| TPGS | α -tocoferol PEG 1000 succinato (vitamina E TPGS) |
| VATS | Cirurgia torácica videoassistida |
| VEGF | Fator de crescimento endotelial vascular |

RESUMO

O cancro é uma importante causa de morte e um grave problema de saúde pública a nível mundial. Apesar de todos os esforços para desenvolver novos tratamentos e fármacos antitumorais, em 2012 as doenças oncológicas provocaram cerca de 8,2 milhões de mortes em todo o mundo.

Para além de uma grande incidência, o cancro do pulmão apresenta geralmente uma evolução particularmente rápida e uma elevada letalidade, representando a segunda causa de morte por cancro em Portugal e a primeira a nível mundial.

A maioria dos cancros do pulmão são carcinomas. Esta patologia pode dividir-se principalmente em cancro do pulmão de pequenas células e cancro do pulmão de não-pequenas células. Este último apresenta maior incidência, sendo o tipo de cancro do pulmão mais frequente e o que será abordado na presente monografia. Este subdivide-se em adenocarcinoma, carcinoma de grandes células e carcinoma de células escamosas.

Na monografia será inicialmente abordada a patologia do cancro do pulmão, particularmente do cancro do pulmão de não-pequenas células, contemplando os principais tópicos relacionados com a doença, como a sua epidemiologia, fisiopatologia e respetiva terapêutica convencional aplicada.

Tendo em conta as particularidades desta patologia, torna-se ainda mais urgente a sua deteção precoce e uma intervenção rápida e eficaz, recorrendo a terapêuticas cada vez mais eficazes e seguras. Nesse sentido, o desenvolvimento de novas formulações de anticancerígenos recorrendo à encapsulação em nanossistemas apresenta grande potencial. Estes permitem aumentar a eficácia dos fármacos e reduzir a sua toxicidade e consequentes efeitos secundários severos, com vista a aumentar a sobrevivência e qualidade de vida dos doentes.

Serão abordados de forma genérica os principais tipos de nanossistemas propostos na terapêutica anticancerígena do cancro do pulmão de não-pequenas células. Por fim, será apresentada uma revisão das propostas terapêuticas mais recentes com aplicação nesta neoplasia, com particular incidência nas nanopartículas poliméricas.

Palavras-chave: cancro do pulmão de não-pequenas células; encapsulação de fármacos; nanopartículas poliméricas; quimioterapia; transporte de fármacos.

ABSTRACT

Cancer is an important cause of death and a serious problem of public health worldwide. Despite all efforts made to develop new treatments and anti-tumoral drugs, in 2012 oncologic diseases resulted in about 8,2 million deaths worldwide.

Apart from the high incidence, lung cancer usually presents a particularly fast evolution and a big letality, representing the second cause of death due to cancer in Portugal, and the first in the world.

The majority of cases of lung cancer are carcinomas. This pathology can be mainly divided in small-cells lung cancer and non-small cells lung cancer. The latter group presents higher incidence, being the most frequent type of lung cancer and the one that will be addressed in this dissertation. It can be subdivided essentially in adenocarcinoma, big cells carcinoma and squamous carcinoma.

Initially, this work will address the lung cancer disease, particularly non-small cells lung cancer, including the main topics related to the disease, as its epidemiology, physiopathology and the respective conventional therapy.

Considering the particularities of the pathology, it is essential to ensure early detention, as well as a fast and efficient intervention, with effective and safe therapeutics. In this sense, the development of new anti-tumoral medicines, using drug encapsulation through nanossystems presents great potential. These are expected to improve drug efficacy and reduce its toxicity and consequent side effects, thus increasing patients survival and life quality.

The main types of nanocarriers with application in anti-tumoral therapy of non-small cells lung cancer will be addressed. Finally, it is intended to approach the most recent and innovative therapies presented in the ambit of this tumor type, with a particular focus on polymeric nanoparticles.

Key-words: chemotherapy; drug delivery; drug encapsulation; lung cancer; polymeric nanoparticles.

1. INTRODUÇÃO

As doenças oncológicas englobam um vasto conjunto de cancros, entre os quais se destacam o cancro da mama, da próstata, coloretal, do estômago e do pulmão como neoplasias com maior incidência na população mundial.^{1,2} Para além de muito frequentes, representam também uma das mais importantes causas de morte em todo o mundo, tendo-se verificado cerca de 8,2 milhões de mortes relacionadas com o cancro, em 2012.³ As neoplasias ou tumores caracterizam-se pela proliferação rápida e descontrolada de células anormais e podem ser classificados como benignos ou malignos. Quando a neoplasia é benigna, as células anormais permanecem no local onde surgiram, crescendo apenas até aos limites do tecido ou órgão. Porém, no cancro, também designado por neoplasia maligna ou tumor maligno, as células neoplásicas continuam a multiplicar-se descontroladamente, podendo invadir os tecidos e órgãos circundantes e/ou disseminar para outras partes do organismo, formando metástases distantes.^{2,4,5}

Para além de ser um dos mais incidentes, o cancro do pulmão apresenta uma elevada letalidade, sendo a primeira causa de morte por cancro a nível mundial. Naturalmente, o tabagismo surge como principal fator etiológico responsável pelo seu aparecimento. Tal como todas as neoplasias, o cancro do pulmão é uma neoplasia bastante temida pela população em geral, sobretudo devido à sua elevada letalidade e à progressão particularmente rápida. Esta progressão depende de vários fatores como a sua localização, o estado da doença quando diagnosticada e a existência de metástases. Porém, o prognóstico não é animador na maior parte dos casos. Para tal também contribui bastante a ausência de fármacos realmente eficazes, capazes de eliminar as células cancerígenas de forma seletiva e definitiva, sem afetar as células saudáveis. É, por isso, essencial o desenvolvimento de formulações seguras e eficazes, capazes de eliminar efetivamente esta neoplasia e de proporcionar prognósticos mais animadores aos doentes que padecem da mesma, nomeadamente aumentando a sua qualidade de vida e sobrevivência.⁶⁻⁸

Nesse sentido, a nanomedicina, que consiste na aplicação da nanotecnologia à medicina, apresenta-se como uma ciência emergente e com grande potencial para o desenvolvimento de fármacos para este tipo de doenças. Através da aplicação de nanotecnologia aos fármacos anticancerígenos, nomeadamente encapsulando-os em nanossistemas, é possível aumentar a eficácia terapêutica, bem como reduzir a sua toxicidade e consequentes efeitos adversos, quase sempre severos. Este efeito de melhoria

da eficácia terapêutica deve-se ao facto dos nanossistemas permitirem, sob determinadas condições, aumentar a seletividade dos fármacos anticancerígenos, pelo que estes vão atingir sobretudo as células tumorais. As células tumorais apresentam características particulares, o que permite dirigir os nanossistemas para as mesmas. Pode então dizer-se que os nanossistemas vão funcionar como transportadores, dirigindo os fármacos especificamente para o alvo terapêutico. Devido ao seu tamanho reduzido, na ordem dos nanómetros, estes são capazes de interagir diretamente com as células e biomoléculas. Os nanossistemas permitem ainda ultrapassar um importante mecanismo de resistência das células cancerígenas aos fármacos antitumorais, designado por resistência multifármaco (MDR), no qual as células expulsam o fármaco para o meio exterior através de bombas de efluxo da membrana celular, o que contribui para a ineficácia terapêutica.^{1,9,10}

Nos últimos anos, têm-se verificado progressos no desenvolvimento de fármacos anticancerígenos para o tratamento do cancro do pulmão recorrendo ao uso de sistemas nanoestruturados, tais como os lipossomas, as nanopartículas inorgânicas, os dendrímeros, as micelas e as nanopartículas poliméricas. Apesar de grande parte ainda se encontrar em fase de investigação, em ensaios pré-clínicos ou ensaios clínicos, muitos destes apresentam resultados promissores, nomeadamente ao nível do aumento de concentração do fármaco no interior das células tumorais e, conseqüentemente, da sua eficácia e redução da toxicidade associada.^{10,11}

A presente monografia tem como principais objetivos proporcionar, inicialmente, uma visão geral e introdutória sobre o cancro do pulmão de não-pequenas células, contextualizando esta patologia quanto ao estado da arte, principal sintomatologia, fisiopatologia e uma síntese dos principais tratamentos convencionais aplicados. Posteriormente, o foco da monografia recai totalmente nos aspetos relacionados com a aplicação de nanossistemas na terapêutica anticancerígena desta neoplasia, como alternativa para contornar as limitações apresentadas pela terapêutica convencional. Dos vários nanossistemas com aplicação no cancro do pulmão de não-pequenas células será particularmente abordada a aplicação de nanopartículas poliméricas na neoplasia em estudo, tendo em conta o considerável volume de informação.

Assim, será realizada uma revisão das abordagens mais recentes descritas na literatura sobre a encapsulação de fármacos e genes e aplicação dos mesmos na terapêutica do cancro do pulmão de não-pequenas células, recorrendo ao uso de nanopartículas poliméricas, constituídas por polímeros como o quitosano, o ácido polilático-co-glicólico (PLGA), o ácido polilático (PLA), entre outros.

2. METODOLOGIA

Para a realização da presente monografia, de acordo com os objetivos indicados foram consultadas diversas fontes bibliográficas.

Inicialmente procedeu-se à recolha de informação científica relevante através de pesquisa bibliográfica, tendo sido utilizadas para tal as bases de dados PubMed e Google Scholar. A pesquisa foi efetuada utilizando os termos “lung cancer”, “lung cancer and nanoparticles”, “lung cancer and nanocarriers” e “drug delivery in lung cancer”. Esta pesquisa bibliográfica permitiu o acesso a diversos artigos científicos originais, de revisão e monografias sobre o tema. Foram ainda incluídas referências adicionais dos artigos consultados. Dos artigos obtidos na pesquisa foram considerados para estudo os artigos que se encontravam na língua portuguesa e inglesa, publicados desde 2010 até Dezembro de 2015.

Foram também consultadas algumas páginas da internet de instituições/organizações consideradas de reconhecido mérito para a recolha de informação sobre a patologia, tais como a Organização Mundial de Saúde (OMS), a Direção Geral de Saúde (DGS) e a Sociedade Portuguesa de Pneumologia (SPP).

Posteriormente, foram ainda consultados alguns livros, tendo sido realizadas pesquisas na Biblioteca Central de Gambelas e na Biblioteca do Campus da Penha, pertencentes à Universidade do Algarve, e nas Bibliotecas dos Hospitais CUF Infante Santo e CUF Descobertas.

De toda a informação recolhida foi selecionada para constar na monografia a informação científica mais atual e/ou relevante sobre o tema, estando devidamente referenciada.

3. CANCRO DO PULMÃO

Os pulmões, inseridos no sistema respiratório, são os principais responsáveis pela respiração, uma função característica da vida.¹² O cancro do pulmão é um termo que se refere aos tumores com origem nas células do epitélio das vias aéreas respiratórias. Este surge quando ocorre uma desregulação celular numa célula epitelial da traqueia, brônquios ou pulmões, que começa a multiplicar-se de forma descontrolada, originando uma massa de células anormais ou tumor. O tumor original é designado por tumor primário e se as células tumorais atingirem a circulação sanguínea ou linfática podem disseminar-se para outros órgãos, originando novos tumores, designados por metástases. No cancro do pulmão as metástases surgem mais frequentemente no fígado, nos ossos, no cérebro e na glândula adrenal.^{12,13}

A grande maioria dos cancros do pulmão são carcinomas (cerca de 90 a 95% de todos os cancros do pulmão) que se dividem em dois grandes grupos: carcinoma do pulmão de pequenas células (CPPC) e carcinoma do pulmão de não-pequenas células (CPNPC). Estes diferem sobretudo ao nível da sua localização e evolução, portanto a abordagem terapêutica é também diferente e adequada a cada uma das situações.^{14,15}

O CPPC representa cerca de 15% dos carcinomas do pulmão, e possui uma forte relação com o tabagismo. Trata-se de um tumor muito indiferenciado, muito agressivo e que se multiplica muito rapidamente, metastizando muito cedo para outros órgãos. Este apresenta relativa radio- e quimiossensibilidade, sendo assim suscetível aos tratamentos por radioterapia (RT) e quimioterapia (QT). Ainda assim, a longa sobrevivência e a cura dos doentes são raras neste subtipo de cancro do pulmão, sobretudo devido à sua agressividade, rápida progressão e às recidivas da doença.¹⁴

O CPNPC representa cerca de 85% dos carcinomas do pulmão, sendo o mais frequente. De acordo com uma classificação histológica, este divide-se essencialmente em adenocarcinoma, carcinoma epidermóide ou de células escamosas e carcinoma de grandes células, apesar de também existirem carcinomas mistos e indiferenciados, que são mais raros. Estes três tipos principais de CPNPC também apresentam algumas diferenças a nível de localização, taxa de crescimento, metastização e relação com o tabagismo, sendo atualmente o adenocarcinoma o subtipo mais frequente.^{15,16}

3.1. Epidemiologia – incidência e mortalidade

O cancro do pulmão é a segunda neoplasia mais frequente e a primeira causa de morte

por cancro a nível mundial, tendo provocado cerca de 1,59 milhões de mortes em 2012. Estima-se que a sua incidência aumenta cerca de 0,5% todos os anos.¹⁷⁻¹⁹ Em 2015 são estimados cerca de 221200 novos casos de cancro do pulmão, o que representa aproximadamente 13% de todos os diagnósticos de cancro.²⁰

Em Portugal o cancro do pulmão é a quarta neoplasia com maior incidência, seguindo-se ao cancro da próstata, da mama e do cólon, sendo mesmo a segunda neoplasia com maior mortalidade, a seguir ao cancro do cólon (quadro 3.1.).^{17,21}

Tabela 3.1 Taxa de incidência e mortalidade dos tumores malignos por patologia em Portugal (2009)

| Tumores malignos | Incidência | Tumores malignos | Mortalidade |
|-------------------------------------|-------------|-------------------------------------|-------------|
| Próstata | 108,81 | Próstata | 34,1 |
| Mama | 57,94 | Traqueia, brônquios e pulmão | 32,2 |
| Cólon | 47,94 | Mama (feminina) | 29,4 |
| Traqueia, brônquios e pulmão | 33,6 | Cólon | 24,8 |
| Estômago | 28,22 | Estômago | 22,9 |
| Reto | 23,73 | Reto | 8,7 |
| Corpo do útero | 18,08 | Bexiga | 7,9 |
| Bexiga | 17,57 | Linfoma não-Hodgkin | 6,0 |
| Glândula tiroideia | 16,63 | Corpo do útero | 3,4 |
| Linfoma não-Hodgkin | 16,46 | | |

Taxa de incidência: por 100 000 habitantes. [Adaptado de (21)].

Esta neoplasia apresenta maior incidência nos homens do que nas mulheres, sendo a primeira causa de morte no sexo masculino e a quarta causa de morte no sexo feminino em Portugal (quadro 3.2.).²¹ Tal facto está relacionado com o maior consumo de tabaco por parte do sexo masculino e com o padrão histórico de hábitos tabágicos. Portugal encontra-se atualmente no terceiro estadió da epidemia tabágica, no qual a mortalidade por cancro do pulmão já se encontra a diminuir no sexo masculino, devido à tendência de diminuição do tabagismo. O mesmo ainda não se verifica no sexo feminino, uma vez que o pico de prevalência do tabagismo ocorreu cerca de duas décadas mais tarde, face ao sexo masculino e as variações nos hábitos tabágicos só se refletem na incidência da doença cerca de duas décadas depois e após três a quatro anos na mortalidade.^{14,22} Acompanhando esta tendência de alteração na mortalidade por cancro do pulmão, verifica-se uma tendência de mudança no tipo histológico de cancro do pulmão mais frequente. O adenocarcinoma é, atualmente, o subtipo mais frequente e que apresenta menor associação com o tabagismo, sendo mais frequente em mulheres, ex-fumadores e

não fumadores. Anteriormente o subtipo mais frequente era o carcinoma de células escamosas, que possui maior relação com o tabagismo, tal como o CPPC.^{14,23}

Tabela 3.2 Indicadores de mortalidade do tumor maligno da traqueia, brônquios e pulmão em Portugal continental (2008 a 2012)

| Tumor maligno da traqueia, brônquios e pulmão | | | | | |
|--|------|------|------|------|------|
| | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 |
| Ambos os sexos | | | | | |
| Nº de óbitos | 3130 | 3241 | 3443 | 3514 | 3446 |
| Taxa de mortalidade | 31,1 | 32,2 | 34,2 | 35,0 | 34,5 |
| Sexo masculino (♂) | | | | | |
| Nº de óbitos | 2469 | 2543 | 2727 | 2730 | 2672 |
| Taxa de mortalidade | 51,2 | 52,8 | 56,7 | 56,9 | 56,1 |
| Sexo feminino (♀) | | | | | |
| Nº de óbitos | 661 | 698 | 716 | 784 | 774 |
| Taxa de mortalidade | 12,6 | 13,3 | 13,6 | 14,9 | 14,8 |

Taxa de mortalidade: por 100 000 habitantes. [Adaptado de (21)].

3.2. Sintomas

A doença pode permanecer assintomática, sobretudo nos estadios iniciais. Quando sintomática, sobretudo nas fases mais avançadas da doença, os principais sintomas são tosse persistente, hemoptise (expetoração de sangue com origem no trato respiratório acompanhada de tosse), dor no tórax, dispneia, rouquidão, alterações na voz, disfagia, anorexia ou perda de peso, pneumonias ou bronquites recorrentes e derrame pleural. A tosse é o sintoma mais frequente, mas esta é muitas vezes desvalorizada, quer por ser um sintoma associado a muitas outras patologias, quer porque os fumadores (85% dos doentes de cancro do pulmão) já apresentam geralmente tosse associada ao tabagismo. Contrariamente, a hemoptise é o sintoma que mais preocupa os doentes, levando-os a consultar o médico. Podem ainda manifestar-se dores de cabeça e dores ósseas, devido ao crescimento local do tumor ou à invasão de outros órgãos. Por exemplo, as dores ósseas podem indicar a presença de metástases distantes no sistema esquelético.^{14,20,23,24}

3.3. Fisiopatologia – etiologia do cancro do pulmão

À semelhança das restantes neoplasias, o cancro do pulmão apresenta uma etiologia multifatorial. Este pode surgir devido à ação de agentes ambientais, como a exposição a carcinogéneos (químicos, físicos ou biológicos), ou de fatores endógenos, como a predisposição genética (mutações na linhagem germinal).²⁵ As causas de cancro do pulmão são maioritariamente ambientais. Os carcinogéneos ambientais aumentam a

possibilidade de ocorrência de mutações ou provocam diretamente lesões no ácido desoxirribonucleico (ADN). No entanto, existe uma certa variação na suscetibilidade aos carcinogéneos, pelo que o risco de cancro do pulmão depende da interação entre a exposição aos carcinogéneos e a suscetibilidade individual para os mesmos. Quando um indivíduo geneticamente suscetível sofre exposição prolongada aos carcinogéneos, estes provocam lesões celulares, que podem desencadear a carcinogénese.²⁶⁻²⁸

Para além dos habituais fatores de risco para o cancro, como a idade e a dieta, contribuem particularmente para o risco de cancro do pulmão o número de cigarros consumidos, o grau de inalação, o conteúdo em nicotina do tabaco e a duração dos hábitos tabágicos, sendo maior o risco quanto mais precoce for a idade de início.^{14,17}

Algumas doenças pulmonares não malignas também aumentam a predisposição para a doença, tais como a doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), o enfisema pulmonar e as patologias que provocam lesões fibróticas, como a tuberculose.^{17,29}

3.3.1. Fatores ambientais

3.3.1.1. Agentes químicos

Existem diversas substâncias químicas carcinogénicas capazes de originar cancro do pulmão, mediante exposição prolongada aos mesmos. A carcinogénese química divide-se em duas etapas: iniciação e promoção. A fase de iniciação consiste na exposição a um carcinogéneo químico em dose suficiente para provocar uma lesão genética irreversível, que é necessária, mas não suficiente, para desenvolver carcinogénese. Posteriormente, na fase da promoção atuam agentes promotores, que estimulam, de forma reversível, a proliferação de células previamente danificadas.²⁷

Os carcinogéneos químicos apresentam uma elevada reatividade química e na fase de iniciação atuam de forma direta ou através dos seus metabolitos reativos, (por ativação metabólica através de reações enzimáticas de fase I, como a hidroxilação e a epoxidação), produzindo radicais livres de oxigénio (ROS). Geralmente, estes apresentam como característica comum o facto de serem compostos eletrofílicos, logo, podem reagir com os locais nucleofílicos da célula, provocando lesões nos seus alvos: o ADN, o ácido ribonucleico (ARN) e proteínas celulares.²⁷ Assim, o principal mecanismo de indução da carcinogénese é a formação de adutos com o ADN (figura 3.1). O desenvolvimento ou não do tumor vai depender da capacidade do organismo destoxificar o carcinogéneo químico ao qual foi exposto, ou seja, do balanço entre a ativação e a dextoxificação metabólica e dos mecanismos de reparação do ADN.^{25,27}

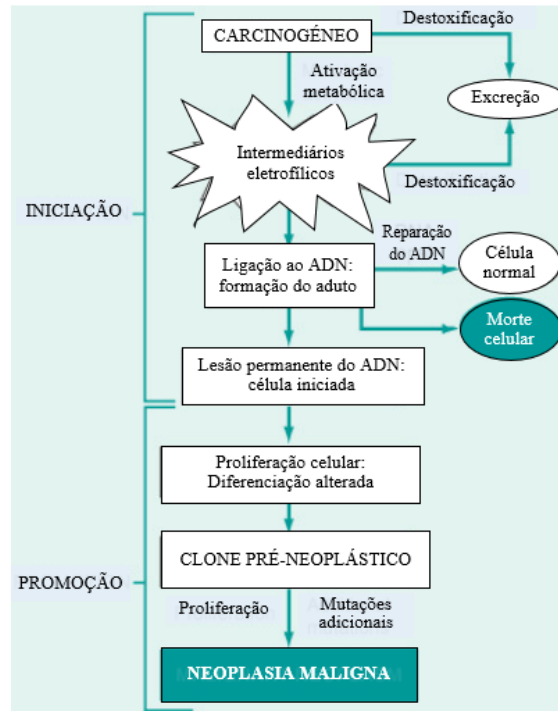


Figura 3.1 Esquema geral da carcinogênese química. [Adaptado de (25)].

São exemplos de carcinogéneos químicos o amianto, a sílica, os metais pesados como o arsénio, o crómio e o níquel, sendo a exposição ocupacional aos mesmos responsável por cerca de 9 a 15% dos casos de cancro do pulmão.^{26,28}

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH), de que é exemplo o benzo(a)pireno, também constituem um importante carcinogéneo no desenvolvimento de cancro do pulmão. Estes estão presentes nos gases resultantes da combustão de combustíveis fósseis, que contribuem para a poluição ambiental, responsável por cerca de 1 a 2% dos cancros do pulmão. Para além disso, os PAH estão ainda presentes no fumo produzido pela combustão do tabaco. O tabagismo é responsável por cerca de 85% e 90% dos casos de cancro do pulmão em Portugal e nos Estados Unidos da América, respetivamente, tal como noutros países onde o tabagismo também é muito comum.^{25,26,28} Para além dos PAH, o fumo do tabaco é constituído por cerca de 4000 compostos químicos, dos quais mais de 400 são tóxicos e cerca de 43 são carcinogénicos. Estes compostos provocam stress oxidativo nas células, através de radicais livres de oxigénio e da indução de resposta inflamatória. Estes compostos são ainda responsáveis pela peroxidação lipídica das membranas celulares, desordens lipometabólicas e lesões oxidativas em moléculas como o ADN, promovendo efeitos mutagénicos.^{26,28}

3.3.1.2. Agentes físicos

Os agentes carcinogêneos físicos compreendem vários tipos de radiação, tais como a radiação ultravioleta e a radiação ionizante, sendo esta última a mais significativa na etiologia do cancro do pulmão. A radiação ionizante inclui a radiação eletromagnética (raios X e raios γ) e a radiação de partículas (partículas α , β , prótons e neutrões). A radiação ionizante é capaz de provocar mutações genéticas, através do efeito direto da radiação no material genético, pois a energia absorvida pelo ADN leva à rotura das cadeias de nucleótidos, afetando toda a sua estrutura ou devido à produção de ROS que vão reagir com o mesmo, provocando inflamação, lesão e morte celular.^{25,27}

A exposição à radiação é responsável por cerca de 10% dos casos de cancro do pulmão, podendo verificar-se exposição ocupacional no caso dos mineiros expostos a urânio radioativo em minas de urânio e nos trabalhadores de centrais nucleares.^{26,28}

3.3.1.3. Agentes biológicos

As infeções por agentes biológicos como vírus, bactérias e fungos, podem ter um importante papel na indução da carcinogénese. Apesar de ainda não ter sido comprovado, a infeção por vírus como o vírus do papiloma humano (HPV) e o vírus Epstein-Barr (EBV) pode estar envolvida na carcinogénese de alguns casos de cancro do pulmão. Pensa-se que estes podem induzir carcinogénese transmitindo oncogenes víricos, ao integrar o seu genoma no do hospedeiro, que podem levar à conversão de proto-oncogenes em oncogenes, ou através da sobre expressão das proteínas virais E6 e E7. Estas proteínas são capazes de inibir os produtos dos genes supressores de tumor, p53 e Rb, o que permite a ativação da replicação celular.^{17,25}

Atualmente também se encontra em estudo a hipótese de uma possível associação entre a bactéria *Helicobacter pylori* (Hp) e o cancro do pulmão.³⁰ Já em 1863, Virchow tinha proposto que o cancro se desenvolve em locais de inflamação crónica, o que é demonstrado pelo risco aumentado de cancro em pacientes afetados por várias inflamações crónicas do trato gastrointestinal (TGI), como a gastrite por Hp. O mecanismo preciso que liga a inflamação ao desenvolvimento do cancro ainda não foi estabelecido, no entanto, as reações de inflamação crónica podem resultar da produção de citocinas, que estimulam o crescimento de células transformadas. A inflamação crónica também pode promover diretamente instabilidade genómica nas células através da produção de ROS, que predispõem para a transformação maligna.²⁵ Segundo uma meta-análise, foram realizados 5 casos-controlo entre 2000 e 2010 que reportaram uma

associação entre a infeção por Hp e o cancro do pulmão, dos quais três apresentaram significado estatístico (OR significante). Segundo citado por Deng, Zhuo e os seus colaboradores notaram que o risco de cancro do pulmão em indivíduos com infeção por Hp era 3,24 vezes superior à dos indivíduos não infetados pela bactéria (controlos). No entanto, estes estudos apresentam várias limitações, tais como a utilização de amostras pequenas e o facto de não ter sido considerado o tabagismo como fator de risco para a doença, pelo que são necessários mais estudos para comprovar esta associação.³⁰

3.3.2. Fatores genéticos

O cancro é considerado cada vez mais uma doença genética, pois a ocorrência de mutações que provocam lesões genéticas está na base do processo de carcinogénese. No entanto, tal não implica que o cancro seja considerado hereditário, pois tal verifica-se numa pequena percentagem dos casos.²⁷ A interação entre os fatores genéticos e não genéticos é particularmente complexa quando o desenvolvimento do tumor depende de múltiplos genes envolvidos no processo. Mesmo nos tumores com uma componente hereditária bem definida, o risco de desenvolver esse tumor depende bastante da influência de fatores não genéticos.²⁵ A hereditariedade intervém na carcinogénese quando as células germinais dos progenitores possuem mutações que predis põem para o desenvolvimento do cancro, conferindo uma maior suscetibilidade genética para o cancro. Ainda assim, é necessário que ocorram mutações posteriores nas células somáticas, para que se desenvolva um tumor. Para além disso, podem herdar-se mutações ao nível dos genes supressores de tumor e dos genes reparadores do ADN, mas não nos proto-oncogenes, pois se uma célula germinal fosse portadora de uma mutação num proto-oncogene, o feto não seria viável, uma vez que tal iria afetar o crescimento celular.²⁷

O genótipo pode influenciar significativamente a probabilidade de desenvolver cancros de origem ambiental. Variações hereditárias podem alterar a atividade de enzimas que metabolizam pró-carcinogéneos na sua forma ativa, alterando a capacidade do organismo destoxificar esses carcinogéneos, tornando-o mais suscetível aos mesmos. A presença de polimorfismos nos genes que codificam proteínas da família de enzimas citocromo P450 confere maior suscetibilidade para o desenvolvimento de cancro do pulmão em fumadores. Isto porque a ativação metabólica de compostos carcinogénicos do fumo do tabaco (e.g. PAH) nos seus intermediários ativos é realizada através de reações metabolizadas por enzimas de fase I do citocromo P450. Posteriormente estes intermediários ativos vão formar adutos com o ADN causando lesões genéticas.^{25,28}

3.4. Carcinogénese

No tecido normal os mecanismos de controlo e regulação celular são responsáveis por assegurar o equilíbrio entre a divisão e a morte celular, permitindo a renovação celular, mas evitando um crescimento celular desmedido.³¹ No entanto, ao longo da nossa vida ocorrem diariamente mutações genéticas, na replicação do ADN, espontaneamente e/ou devido à exposição a carcinogénicos. A maioria destas mutações não afeta o normal funcionamento da célula ou são corrigidas pelos mecanismos de correção do ADN. Contudo, as mutações que escapam à reparação podem provocar danos permanentes no material genético. A acumulação de mutações nos genes responsáveis pela regulação celular numa célula pode levar à sua transformação maligna, dando início à carcinogénese. Este processo envolve múltiplas etapas e geralmente prolonga-se por vários anos, sendo um dos motivos pelo qual a incidência de cancro aumenta com a idade.²⁵ Os principais genes reguladores alvo de danos genéticos são os genes que regulam o crescimento celular, os genes que regulam a apoptose, os genes supressores de tumores e os genes reparadores do ADN.²⁷

Os proto-oncogenes são genes reguladores do crescimento celular, pois estes induzem fisiologicamente o crescimento e a diferenciação celular, codificando fatores de crescimento celular e respetivos recetores, fatores de transcrição e fatores reguladores do ciclo celular. Quando mutados estes designam-se oncogenes. Os oncogenes são considerados dominantes na carcinogénese, uma vez que a lesão de um dos alelos do gene correspondente é suficiente para que a produção excessiva da oncoproteína promova e acelere continuamente o crescimento celular de células transformadas. Estes oncogenes promovem o crescimento celular desregulado, independente dos fatores de crescimento e de sinais externos, ainda que o outro alelo do gene codifique a proteína normal.²⁷ Entre os vários proto-oncogenes que participam na carcinogénese, os genes da família RAS são os mais frequentes em tumores humanos, estando presentes em cerca de 30% dos adenocarcinomas do pulmão, sendo mais frequentes as mutações do gene K-ras. Este desempenha um papel fundamental no controlo da via de transdução de sinal, que regula a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular.^{25,32} Também é muito comum no cancro do pulmão a presença de mutações no gene que codifica o recetor do fator do crescimento epidérmico (EGFR) e, com menor frequência, no gene que codifica o recetor epidérmico humano do tipo 2 (HER 2 ou ErbB2). Ambos são recetores da tirosina cinase, que intervêm na via de transdução de sinal, implicada na regulação da proliferação e diferenciação celulares. Em contexto de neoplasia, o EGFR participa ainda na

neovascularização e metastização do tumor. Em alguns casos de cancro do pulmão verificam-se ainda rearranjos na cinase do linfoma anaplástico (ALK), estando a sua ativação relacionada com a proliferação celular e a inibição da apoptose, mediada nomeadamente pela via de sinalização do K-ras.³²

As mutações nos genes reguladores da apoptose, como o gene Bax, que favorece a apoptose e o gene Bcl-2, que é um gene antiapoptótico, também permitem prolongar a vida das células tumorais. Nestas células observar-se a sobre expressão do gene Bcl-2 em detrimento do gene Bax, evitando assim a apoptose.²⁷

Os genes supressores de tumores codificam proteínas que inibem a proliferação celular, como as proteínas Rb e p53. Assim, ao sofrerem mutações que levam à perda das suas funções, ou quando há um défice na transcrição destas proteínas, verifica-se perda do controlo na proliferação celular, permitindo a multiplicação descontrolada das células cancerígenas. Estes consideram-se recessivos na carcinogénese, pois se apenas um dos alelos for afetado, o outro continua a codificar a proteína normal.^{25,27}

Os genes que expressam proteínas reparadoras do ADN influenciam a capacidade do organismo reparar danos genéticos ocorridos na replicação do ADN de genes como os proto-oncogenes, os genes que regulam a apoptose e os genes supressores de tumores. Quando a correção desses erros não é possível verifica-se instabilidade genética, e portanto, uma maior predisposição para a ocorrência de mutações no genoma.^{25,27,33} Tal como nos genes supressores de tumores, ambos os alelos do gene têm que sofrer mutação para as proteínas expressas não serem funcionais.²⁷

Nas células humanas normais existe ainda outro mecanismo, relacionado com os telómeros, que determina a capacidade limitada de divisão celular. Os telómeros consistem em repetições da sequência 5'-TTAGGG-3' na extremidade dos cromossomas que vão encurtando com as divisões celulares. A sua ausência ativa os mecanismos celulares responsáveis pela apoptose. No entanto, nos tumores humanos foram detetados diversos mecanismos que evitam o encurtamento dos telómeros, levando assim à imortalidade celular das células cancerígenas. O mais frequente é a sobre expressão da enzima telomerase, que se traduz no aumento da sua atividade.^{27,34}

O conhecimento das alterações biomoleculares específicas que ocorrem no processo de carcinogénese da doença, como as descritas acima, é fundamental, para o desenvolvimento de fármacos seletivos para as células malignas.³⁵

3.5. Crescimento tumoral

No decorrer da transformação neoplásica a célula adquire malignidade, que se manifesta através de várias características típicas das células cancerígenas, tais como a capacidade de proliferação contínua e desregulada, a resistência à apoptose, a capacidade de desenvolver-se induzindo angiogénese e a capacidade de invadir e metastizar outros tecidos e órgãos.^{25,27,33} Como já mencionado, as células tumorais são capazes de ativar mutações ou a sobre expressão de genes, nomeadamente genes que codificam proteínas essenciais à replicação, como os fatores de crescimento celular. Assim, a célula que sofreu transformação maligna devido à acumulação de mutações apresenta uma taxa de replicação muito elevada, multiplicando-se com grande rapidez face às células normais circundantes, verificando-se proliferação clonal. Forma-se então uma pequena massa tumoral de células cancerígenas. Dado à sua rápida multiplicação e à morte das células normais, as células tumorais vão substituindo o tecido saudável, permitindo o crescimento do tumor. Verifica-se ainda a desregulação de diversos processos fisiológicos, uma vez que a substituição das células normais por células cancerígenas afeta o funcionamento do órgão, afetando consequentemente a respiração, no caso do cancro do pulmão.^{25,27}

As novas células cancerígenas necessitam ser abastecidas com oxigénio e nutrientes, fornecidos através do sangue, para subsistirem e para se continuarem a multiplicar. Assim, o tumor cresce junto dos vasos sanguíneos, uma vez que a difusão do oxigénio pelos tecidos (que acontece por difusão passiva em tumores até 1-2 mm³) só tem lugar até uma distância máxima de 180µm, até este ser completamente metabolizado. Por este motivo, se a distância entre as células e o vaso sanguíneo ultrapassar este valor, as células entram em necrose. Quando o tumor atinge os 2mm³, começa a verificar-se hipóxia nas células centrais do tumor, pois o aporte nutricional e de oxigénio já não é suficiente para satisfazer as necessidades de todas as células tumorais. Assim, estas podem entrar em necrose, permanecendo o tumor num estado estático, em que se mantém com as mesmas dimensões, ou podem induzir a angiogénese, formando novos vasos sanguíneos, sendo este um passo fundamental para o crescimento do tumor.^{36,37}

3.6. Angiogénese e metastização

A formação de novos vasos sanguíneos tem início com a segregação de fatores angiogénicos, pelas células cancerígenas e outras (e.g. macrófagos e células da matriz extracelular). Geralmente verifica-se um balanço entre fatores angiogénicos e fatores anti-angiogénicos. No entanto, a angiogénese pode ser induzida, nomeadamente em

estados de *stress* celular, como hipóxia. Assim, nas células cancerígenas verifica-se um *switch* angiogénico, que se traduz numa maior expressão de fatores angiogénicos, como o fator de crescimento endotelial (VEGF) e cinases libertadas por células endoteliais ativadas, em detrimento dos fatores anti-angiogénicos, como a angioestatina.^{25,27} Depois de induzido, o processo de angiogénese compreende várias etapas (figura 3.2). Inicialmente ocorre a degradação da membrana extracelular (MEC) de um vaso sanguíneo preexistente, através de processos proteolíticos catalisados por metaloproteínas, permitindo a migração das células endoteliais para o espaço intersticial, através de moléculas de adesão das células tumorais. Estas células endoteliais vão multiplicar-se, formando novos vasos na direção do tumor, que vão suprir as suas necessidades, verificando-se a reorganização da MEC.^{27,37} Estes novos vasos sanguíneos apresentam algumas particularidades face aos normais, uma vez que não são lineares, apresentando uma curvatura e possuem uma elevada permeabilidade, podendo verificar-se malformações na rede vascular decorrentes da neovascularização tumoral.^{9,36}

A angiogénese permite não só o crescimento do tumor, como também a sua invasão e metastização. Isto porque a formação de novos vasos sanguíneos permite às células cancerígenas penetrar nestes mais facilmente, quer pela sua proximidade, quer pelas suas características já descritas acima, o que possibilita o transporte destas células para outros órgãos, formando metástases distantes.^{36,38}

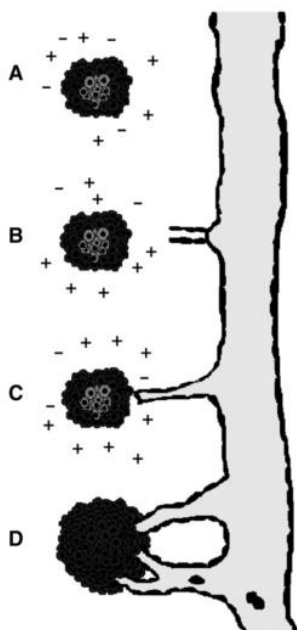


Figura 3.2 Desenvolvimento de um tumor além do tamanho máximo limitado por difusão. (A) Desenvolvimento tumoral até atingir o tamanho máximo de acordo com o limite de difusão. (B) Ocorrência do *switch* angiogénico criando alteração no balanço dos reguladores positivos face aos negativos, causando proliferação e migração das células endoteliais. Estas células endoteliais formam um novo vaso que se estende até ao tumor, fornecendo os nutrientes para sustentar a proliferação celular. (C) Tumor vascularizado. (D) O tumor vascularizado continua a multiplicar-se, apresentando potencial metastático devido à sua proximidade com a corrente sanguínea. [Adaptado de (37)].

3.7. Diagnóstico e estadiamento

O diagnóstico da doença pode ser realizado através de diferentes técnicas diagnósticas e complementado com um cuidadoso exame físico, a avaliação dos antecedentes pessoais, eventuais comorbilidades e ainda um estudo analítico e imagiológico.^{13,17,39}

Como já mencionado, os doentes com cancro do pulmão apresentam um mau prognóstico, que se deve principalmente à rápida progressão e elevada incidência e mortalidade desta neoplasia, mas também ao diagnóstico tardio da doença, que leva muitas vezes à falha do tratamento.⁶ Muitas vezes o tumor só manifesta evidências clínicas quando invade os órgãos e os nódulos linfáticos mais próximos, o que dificulta o diagnóstico. Como tal, cerca de 85% dos casos de CPNPC são diagnosticados nos estadios III e IV da doença.⁷ Torna-se assim necessário o diagnóstico precoce da doença, numa fase inicial, permitindo maior hipótese de cura e um melhor prognóstico.^{17,40}

Após o diagnóstico do tumor, com confirmação anatomopatológica, é importante determinar com rigor o estadiamento da lesão maligna, nomeadamente para determinar o prognóstico da doença e tomar decisões sobre o tratamento mais indicado.^{13,41}

O estadiamento divide-se em anatómico e fisiológico. O estadiamento fisiológico consiste na avaliação da capacidade do doente tolerar as diferentes opções terapêuticas, como a cirurgia, através de provas de determinação da função pulmonar e cardíaca. Devem ainda ser avaliadas as comorbilidades e tratados eventuais problemas de saúde, a fim de melhorar a condição do doente.^{29,35} O estadiamento anatómico consiste em avaliar e classificar os tumores em diferentes estadios, de acordo com a sua localização e o seu grau de extensão. Para tal, a American Joint Committee on Cancer desenvolveu um sistema internacional de classificação que permite determinar o estado atual da lesão maligna e acompanhar a sua progressão, designado por Classificação *Tumor-Node-Metastasis* (TMN). Esta classificação refere-se aos tumores primários não tratados por “T”, à sua disseminação regional para os nódulos linfáticos mais próximos por “N” e às metástases distantes por “M”. São atribuídos números a estes três componentes, que indicam a extensão do tumor, podendo agrupar-se em grupos de estadios, de acordo com as regras do sistema.^{13,35,41} O sistema TMN deve ser utilizado como sistema padrão, sendo adequado para a maioria dos cancros, podendo ser necessário recorrer a outros sistemas em alguns tumores, como o sistema de estadiamento histopatológico.¹³

3.8. Tratamento convencional

As principais opções terapêuticas no cancro do pulmão são a cirurgia, a radioterapia,

a quimioterapia e as terapêuticas dirigidas, podendo realizar-se associações destas, como a cirurgia com radioterapia ou quimioterapia adjuvante. Existem ainda outras terapêuticas anticancerígenas, tais como a hormonoterapia, no entanto, a sua aplicação limita-se a cancros hormonodependentes.^{13,17}

Os oncologistas, inseridos numa equipa oncológica multidisciplinar, devem considerar as várias opções terapêuticas, pesar o risco-benefício e selecionar a opção mais adequada para o doente, atendendo a fatores como a idade, condição física do doente as comorbilidades existentes e as características do tumor.^{13,42}

3.8.1. Cirurgia

A cirurgia consiste em remover cirurgicamente a porção pulmonar afetada pelo tumor. Como desvantagem, juntamente com a massa tumoral pode também ser removida uma porção de tecido saudável, o que pode levar a alterações no normal funcionamento dos pulmões. Por outro lado, esta é a única opção terapêutica que permite estudar o tumor em relação à sua anatomo-patologia. A cirurgia pode ser complementada com RT adjuvante ou com QT adjuvante, se necessário. Tal é particularmente vantajoso nos casos em que há forte possibilidade de recidivas, a fim de eliminar eventuais células cancerígenas dispersas que possam ter permanecido. Em alguns casos pode ainda administrar-se QT neoadjuvante, previamente à cirurgia, de modo a reduzir as dimensões do tumor, convertendo um tumor não operável em operável, permitindo a sua remoção cirúrgica. A cirurgia é o tratamento de escolha, com possibilidade de cura, para doentes com CPNPC localizado, nos estadios I e II. Esta apenas se encontra indicada para tumores localizados, pois permite remover a massa tumoral e não as células cancerígenas isoladamente. No entanto, a maioria dos casos é detetada quando o tumor já se encontra disseminado, o que impossibilita esta opção terapêutica.^{13,17,35,41}

3.8.2. Radioterapia

A radioterapia consiste na irradiação do tumor com raios X ou raios gama (γ), em que a energia ionizante provoca lesões nas células cancerígenas, nomeadamente ao nível do ADN, forçando-as a entrar em apoptose, levando à sua destruição, erradicando o tumor. No entanto, a resposta do tumor à radiação depende de vários fatores, tais como o número de células clorogénicas a erradicar, ou seja, a dimensão do tumor, a sua taxa de reprodução celular e, portanto, a velocidade do seu crescimento e ainda a sensibilidade das células à radiação ionizante. A RT encontra-se indicada para tumores pequenos e

confinados, podendo ser utilizada nos casos com invasão local não operáveis, porém, não está indicada na presença de metástases.¹³ A radiação também permite o controlo da doença quando aplicada como adjuvante da QT, utilizando a QT para erradicação das micrometástases distantes e a RT para controlar localmente o tumor primário.^{13,41}

Tal como na cirurgia, a radioterapia também pode afetar o tecido saudável circundante, pelo que a radiação ao nível dos pulmões deve ser aplicada com precaução e com as devidas proteções, evitando toxicidade pulmonar, que pode causar pneumonite por radiação e pode afetar também outros órgãos. A quantidade de radiação e a duração do tratamento devem ser cuidadosamente ponderadas, devido aos efeitos adversos e à toxicidade a longo prazo, pelo que deve ser pesado o risco-benefício para o doente.⁴¹

3.8.3. Quimioterapia

A quimioterapia é utilizada como primeira linha no tratamento de algumas neoplasias, encontrando-se indicada sobretudo nos estadios mais avançados do CPNPC, segundo as Guidelines da National Comprehensive Cancer Network.⁴³ Esta pode ser administrada isoladamente ou em associação com a cirurgia ou com a RT, como terapia adjuvante para diminuir a taxa de recidivas e melhorar o intervalo livre da doença, ou ainda usada como terapia paliativa, para prolongar a sobrevivência de doentes com tumores incuráveis.⁴¹

Atualmente, já existem diversos fármacos citotóxicos com aplicação na terapêutica antitumoral, sendo estes selecionados de acordo com vários fatores como o tipo de cancro e o estadio. Também o esquema de tratamento é selecionado e personalizado tendo em conta estes e outros fatores, nomeadamente ajustes de dose, se necessário. Estes fármacos apresentam diversos mecanismos de ação, que no geral, inibem a replicação celular, conduzindo à morte das células tumorais. No CPNPC, sobretudo na doença metastizada, são geralmente administrados dois fármacos em associação, um derivado da platina (cisplatina ou carboplatina), juntamente com gencitabina, paclitaxel, docetaxel, etopósido ou derivados da vinca (vinorelbina, vinblastina), entre outros. Mais recentemente começou a ser utilizado, também em associação com um derivado da platina, o pemetrexedo, na histologia não escamosa. Dependendo do tipo histológico e do estadio do tumor, podem ainda administrar-se isoladamente outros fármacos.^{8,17,35,42}

Devido à falta de seletividade dos fármacos citotóxicos utilizados a QT afeta não só o tecido tumoral, como também o tecido saudável. As células normais mais afetadas são as que apresentam renovação celular mais acelerada, tais como as células dos epitélios gastrointestinal e cutâneo, as células hematopoiéticas da medula óssea e os folículos

pilosos. Como consequência, observam-se os graves efeitos adversos frequentemente apresentados pelos doentes que se submetem a estes tratamentos, nomeadamente leucopénias, que podem ser bastante acentuadas, náuseas, vômitos, alopecia, entre outros. Estes efeitos adversos são um dos principais motivos que leva os doentes a abandonar o tratamento, diminuindo as suas hipóteses de sobrevivência. Assim, torna-se essencial encontrar alternativas aos fármacos citotóxicos disponíveis, que sejam igualmente ou até mais eficazes na erradicação do tumor, mas que não provoquem os graves efeitos adversos e toxicidade da quimioterapia.⁴⁴

3.8.4. Terapêuticas biológicas dirigidas

As terapêuticas biológicas dirigidas foram desenvolvidas através do conhecimento das características moleculares específicas dos tumores e baseiam-se na administração de anticorpos monoclonais e fármacos contra alvos específicos, como os inibidores tirosina cinase. Estas terapêuticas biológicas são particularmente úteis quando se utilizam marcadores biológicos para procurar mutações em determinados genes. Deste modo, estas terapêuticas vão atuar especificamente na ou nas mutações que deram origem à doença. São exemplo destas o Bevacizumab, que tem como alvo terapêutico o VEGF e o Crizotinib e mais recentemente o Ceritinib, que têm ambos como alvo o ALK. Quanto ao EGFR existem duas abordagens possíveis. Por um lado, pode administrar-se Cetuximab, que é um anticorpo monoclonal dirigido ao domínio extracelular do EGFR, que promove a degradação do recetor. Por outro lado, o Erlotinib e o Genfitinib, inibidores da angiogénese, que atuam como inibidores do EGFR. O Erlotinib é o único fármaco aprovado, sem restrições, como 3^a linha de tratamento em doentes com CPNPC.^{8,35,45}

Para além das terapêuticas já desenvolvidas para o CPNPC, existem atualmente inúmeros estudos a decorrer que exploram a aplicação de nanossistemas no tratamento da doença. Os nanossistemas permitem o transporte direcionado de agentes terapêuticos para o tumor, apresentando vantagens face às terapêuticas convencionais, pelo que estes serão abordados em detalhe no próximo capítulo.

4. NANOSSISTEMAS

Segundo a US National Nanotech Initiative a nanotecnologia consiste na compreensão e controlo da matéria em dimensões aproximadamente entre 1 e 100 nanómetros (nm). Nestas dimensões observam-se fenómenos únicos, que permitem explorar novas aplicações da matéria. A mesma entidade define a nanomedicina como a aplicação da nanotecnologia à medicina. A European Technology Platform on Nanomedicine acrescenta a esta definição que a nanomedicina explora a melhoria e as novas propriedades físicas, químicas e biológicas dos materiais à escala nanométrica.⁴⁶ Trabalhar nesta escala permite explorar propriedades da matéria que diferem das observadas à microescala, tais como a maior condutividade, as propriedades óticas, a maior razão área/volume e a interação biológica com biomoléculas.^{46,47}

As diferentes propriedades apresentadas pela matéria à nanoescala podem ou não ser favoráveis para aplicações médicas. Entre estas propriedades destacam-se a maior razão área/volume das nanopartículas, que possuem uma grande superfície para interações bioquímicas com as biomoléculas, o que também diminui o tempo de reação.⁴⁶

A nanotecnologia pode ser aplicada nas mais diversas áreas como as engenharias, biotecnologia, cosmética e medicina, entre muitas outras. A nanotecnologia na medicina ou nanomedicina pode ser aplicada no diagnóstico médico e imagiologia, na elaboração de implantes e sensores, no transporte e vetorização de fármacos para o tratamento de doenças e na medicina regenerativa. A nanotecnologia pode ainda ser aplicada no teranóstico, uma vertente emergente que combina o diagnóstico com o tratamento, utilizando os mesmos sistemas multifuncionais para desempenhar ambas as funções. Assim, estes são utilizados para diagnosticar a doença, proporcionando melhorias na imagiologia, geralmente associadas à presença de agentes de imagem, como sondas óticas ou agentes de contraste conjugados com fármacos, que são associados aos sistemas e depois libertados pelos mesmos no local, através de um estímulo externo. Deste modo, a nanotecnologia possui um grande potencial para revolucionar e melhorar todo o processo de cuidados de saúde, desde o diagnóstico ao tratamento, passando também pela monitorização e seguimento do doente.^{9,46,48}

São vários os sistemas nanométricos em uso e a sua aplicação na medicina não é propriamente uma área nova, pois os lipossomas, por exemplo, começaram a ser desenvolvidos na década de 60. Por outro lado, são já bastantes as formulações disponíveis no mercado que recorrem à nanotecnologia, entre as quais se encontram os

lipossomas e as nanopartículas. No entanto, através da modificação e manipulação das características dos sistemas, como a sua composição, tamanho, forma, carga, superfície e funcionalização, têm-se desenvolvido nanossistemas com estruturas cada vez mais complexas e eficazes. Estes podem ser dirigidos para tecidos específicos, libertar os fármacos de forma controlada e escapar a uma rápida eliminação do organismo, permanecendo no local de ação por mais tempo, o que se traduz numa maior eficácia.¹⁰

Assim, o objetivo do uso de nanossistemas na medicina consiste em desenvolver novos materiais e métodos ou melhorar os já existentes, para detetar e tratar doenças, atuando no local-alvo, de forma precisa, efetiva e prolongada, a fim de tornar as práticas médicas mais seguras, mais eficazes, menos invasivas e mais personalizadas.⁴⁸

4.1. Tipos de nanossistemas

O termo nanossistemas é genérico e inclui um grande grupo de sistemas, à escala nano, com uma grande variedade de formas, tamanhos e composição.¹⁰

Apesar da definição de nanotecnologia inicialmente mencionada considerar o intervalo entre 1 nm e 100 nm, na nanomedicina o termo nanossistema é mais flexível e inclui nanossistemas na ordem das centenas de nanómetros, até aos 1000 nm.^{10,49,50}

Os avanços da nanotecnologia têm permitido explorar novos nanomateriais e desenvolver nanossistemas mais complexos, como se pode observar na figura 4.1. Atualmente existe uma grande variedade de nanossistemas, que se podem classificar, de acordo com a natureza da sua composição, como inorgânicos, lipídicos ou poliméricos.¹⁰ Na monografia são referidos os principais nanossistemas, com particular foco nas nanopartículas poliméricas, que são amplamente utilizadas no CPNPC.

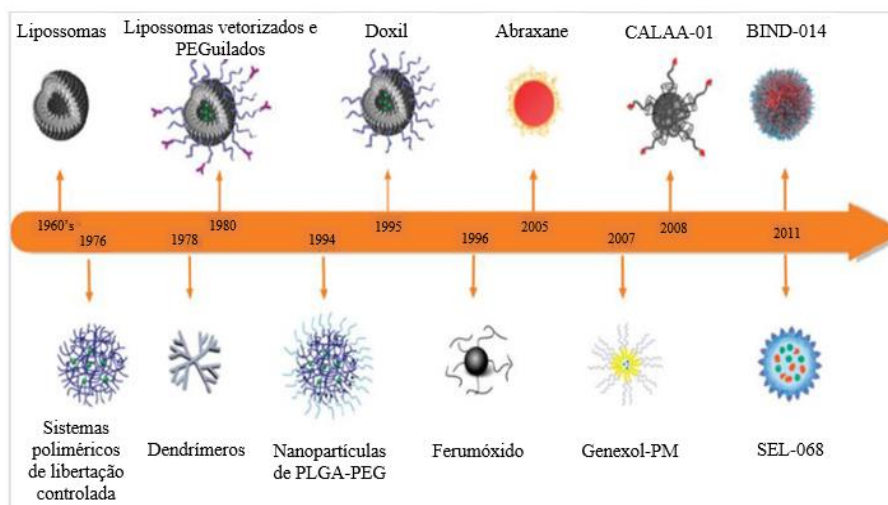


Figura 4.1 Evolução dos nanossistemas ao longo do tempo. [Adaptado de (51)].

Os nanossistemas inorgânicos (figura 4.2) incluem as nanopartículas de ouro, de prata e de outros metais, as nanopartículas de sílica mesoporosa, as nanopartículas magnéticas, os nanotubos de carbono e os *quantum dots*. Geralmente estes têm entre 5 e 40 nm e são rígidos, atendendo à sua composição. Os materiais com propriedades magnéticas podem ser utilizados na imagiologia, para diagnóstico de tumores, por serem visíveis através da ressonância magnética. Existem diversos estudos da utilização destes nanossistemas no CPNPC. Num estudo, Nazir e seus colaboradores demonstraram que as nanopartículas de prata possuem propriedades antitumorais eficazes contra a linha celular H157, de cancro do pulmão de células escamosas, um subtipo de CPNPC.^{52,53}

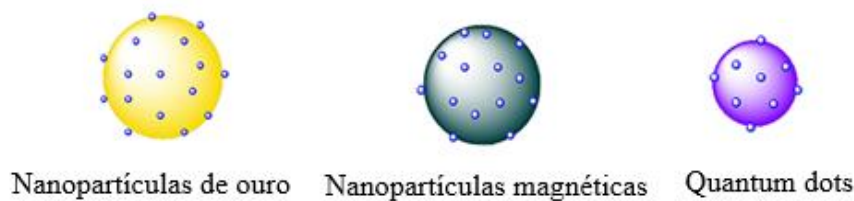


Figura 4.2 Tipos de nanossistemas inorgânicos. [Adaptado de (54)].

Existem diversos nanossistemas lipídicos, tais como os lipossomas, as nanoemulsões, as nanopartículas lipídicas sólidas, bem como outros nanolipocomplexos e sistemas lipídicos nanoestruturados, representados na figura 4.3. Os lipossomas foram os primeiros nanossistemas a ser desenvolvidos. Estes são constituídos por vesículas de bicamadas de fosfolípidos, naturais ou sintéticos, orientados de forma concêntrica, em torno de um compartimento aquoso. O seu tamanho pode variar entre os 80 aos 300 nm. Estes permitem o transporte de fármacos hidrofílicos, no compartimento aquoso e hidrofóbicos, incorporados nas camadas de fosfolípidos. Já foram aprovados vários sistemas lipossomais para várias doenças, como o Doxil[®], o Caelix[®], o DaunoXome[®] e o Myocet[®].^{11,49,55} Existem vários estudos sobre a aplicação de lipossomas no CPNPC. Um exemplo é a Lipoplatina[™] (cisplatina lipossomal), que apesar de demonstrar eficácia idêntica à cisplatina livre, apresentou menor toxicidade e efeitos adversos nos ensaios clínicos de fase I, II e III em vários tumores, nomeadamente no CPNPC.⁵⁶

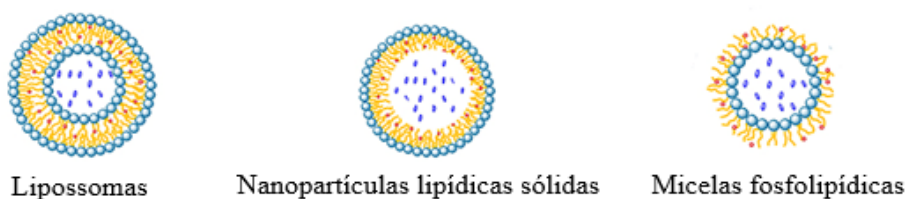


Figura 4.3 Tipos de nanossistemas lipídicos. [Adaptado de (54)].

Os nanossistemas poliméricos, ilustrados na figura 4.4, incluem os dendrímeros, as micelas, os conjugados fármaco-polímero e as nanopartículas poliméricas. Estes têm em comum o facto de serem compostos por polímeros, de origem natural ou sintética, com dimensões entre os 10 e os 100 nm. Porém, apresentam formas e estruturas bastante variáveis. Estes são o grupo de nanossistemas mais utilizado no CPNPC atualmente, do qual se podem destacar as nanopartículas poliméricas. Estas possuem propriedades favoráveis à encapsulação de fármacos e genes para o tratamento do CPNPC, sendo objeto de inúmeros estudos.⁴⁹ A monografia foca-se na sua aplicação no tratamento do CPNPC, pelo que estas serão abordadas em maior detalhe no próximo capítulo.



Figura 4.4 Tipos de nanossistemas poliméricos. [Adaptado de (54)].

4.2. Vetorização de agentes terapêuticos

Fruto da grande investigação na área da nanotecnologia aplicada à vetorização de fármacos, material genético (ADN, ARN) e proteínas, têm vindo a fazer-se grandes avanços, que se traduzem também no aumento de complexidade dos nanossistemas obtidos. Assim, os vetores podem dividir-se em três gerações:

- **Vetores de primeira geração:** nanoesferas e nanocápsulas;
- **Vetores de segunda geração:** nanossistemas cobertos com polímeros hidrofílicos, como polietilenoglicol (PEG, neste caso chamados peguilados);
- **Vetores de terceira geração:** nanossistemas com núcleo biodegradável coberto com um polímero (ex: PEG) e com ligandos de reconhecimento membranar.

Atualmente, os mais recentes projetos de pesquisa de nanossistemas para transporte e vetorização de fármacos estão focados nos vetores de terceira geração.⁴⁶

A vetorização de nanossistemas pode classificar-se como passiva ou ativa, sendo que ambas permitem aumentar a seletividade e eficácia da terapêutica antitumoral.⁴⁶

4.2.1. Vetorização passiva

A vetorização passiva pode realizar-se através do fenómeno de “permeabilidade e

retenção aumentada” (EPR). Devido ao seu reduzido tamanho e à sua elevada superfície, os nanossistemas conseguem, em certas condições, atravessar as paredes dos vasos sanguíneos para os tecidos. No desenvolvimento dos tumores ocorre angiogénese tumoral rápida e pouco regulada, que leva à formação de vasos sanguíneos imaturos, mais permeáveis, com uma arquitetura vascular aberrante. A camada endotelial destes vasos possui uma estrutura desorganizada, que permitem a entrada de material com dimensões inferiores a 200 nm, por extravasamento, para o tecido tumoral. Nos tumores a drenagem linfática também é disfuncional e insuficiente, pelo que os nanossistemas que entram para o tecido tumoral vão-se acumulando, não sendo praticamente eliminados. Estes fatores descrevem o referido EPR, no qual tem lugar a acumulação preferencial, de forma passiva, de nanossistemas no tecido tumoral. Desta forma, o fármaco citotóxico concentra-se no tecido tumoral, onde deve atuar, protegendo-se o tecido saudável. Adicionalmente, a acumulação de nanossistemas no tecido normal é reduzida, devido à sua estreita vasculatura, bem como à sua funcional drenagem linfática. Assim os efeitos adversos dos fármacos citotóxicos são largamente reduzidos.^{1,11,46,57} Esta estratégia é particularmente vantajosa nos tumores sólidos com vascularização elevada a moderada. Nos tumores pouco vascularizados esta acumulação pode não ser suficiente para gerar um efeito terapêutico, o que não se verifica no caso do CPNPC, pois ao nível pulmonar existe uma boa vascularização.⁹

4.2.2. Vetorização ativa

A vetorização ativa de nanossistemas permite direcionar o transporte de fármacos e outras moléculas para as células cancerígenas. Para tal, incorporam-se à superfície das nanopartículas ou outros sistemas ligandos específicos, como anticorpos e péptidos que vão ligar-se aos seus recetores correspondentes. As moléculas utilizadas na vetorização ativa de tumores possuem elevada afinidade e especificidade com os recetores sobre expressos pelas células tumorais, devido ao seu metabolismo, que difere das células normais. Estes ligandos permitem direcionar os nanossistemas de forma seletiva para as células tumorais e ainda internalizá-los para o interior da célula tumoral, por endocitose mediada por recetores, através de endossomas. Uma vez libertados dos endossomas no citosol os nanossistemas libertam o fármaco, que exercerá o seu efeito.^{1,9,46}

Na vetorização ativa de nanossistemas para os tumores podem utilizar-se fragmentos de fator de crescimento epidérmico (EGF), de transferrina, ácido fólico, bem como outros ligandos indicados no quadro do anexo I, pois os seus recetores são sobre expressos pelas

células tumorais, em muitos casos.^{1,9,57} Num estudo desenvolveram-se nanopartículas cobertas com péptidos do EGFR, para a vetorização ativa de tumores que sobre expressam EGFR. Estas revelaram-se mais eficazes do que as não vetorizadas, demonstrando benefícios da vetorização ativa de nanopartículas na terapia antitumoral.⁹

Na figura 4.5 estão representados os mecanismos de vetorização ativa e passiva.

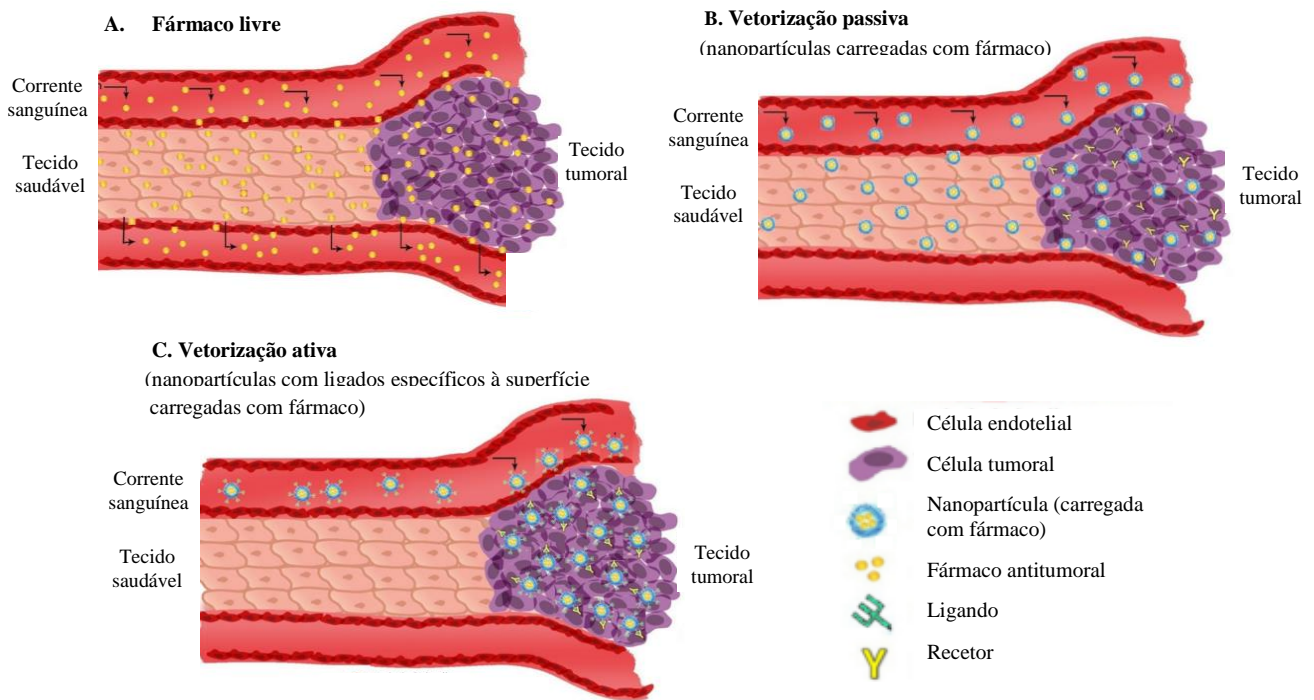


Figura 4.5 Representação dos mecanismos de vetorização passiva e ativa. (A.) O fármaco antitumoral livre, com reduzida seletividade e retenção, entra para o tecido saudável e para o tecido tumoral, mas volta para a corrente sanguínea. (B.) As nanopartículas carregadas com fármaco antitumoral acumulam-se de forma passiva no tecido tumoral, devido ao efeito EPR, mas também entram para o tecido saudável. (C.) As nanopartículas com ligandos específicos à superfície ligam-se seletivamente aos recetores das células tumorais. [Adaptado de (58)].

4.3. Vias de administração de terapêuticas que utilizam nanossistemas

Os fármacos e nanossistemas podem ser administrados por várias vias, como a via oral, subcutânea, intravenosa, intramuscular, retal, ocular, nasal, inalatória, tópica e subcutânea, entre outras.⁵⁹ No CPNPC as terapêuticas são administradas maioritariamente por via oral, inalatória ou intravenosa, sendo esta última a mais utilizada.^{10,57} Nesse sentido e atendendo ao elevado volume de informação, a monografia

foca-se nas terapêuticas para o CPNPC administradas por via intravenosa, embora todas sejam brevemente referidas.

4.3.1. Via de administração oral

A via oral é a via de administração mais utilizada e a mais conveniente para o doente. Esta via não é invasiva, permite auto-administração, é indolor e é uma das mais seguras. No entanto, há vários fatores que influenciam a absorção, distribuição, metabolização e eliminação e a biodisponibilidade dos fármacos, incluindo as suas propriedades físico-químicas. A absorção pode ser afetada por outros fármacos e alimentos. Existem fármacos que são degradados pelo pH gástrico ou pelas enzimas digestivas. Por outro lado, alguns fármacos provocam danos e irritação na mucosa gástrica e intestinal.^{50,59} A via oral utiliza o TGI e a absorção para a circulação sanguínea dá-se principalmente no intestino delgado. Porém, antes de chegar à circulação dita sistémica, o fármaco passa pelo fígado, onde chega através da veia porta e onde sofre metabolização, o que se designa por efeito de primeira passagem. A metabolização hepática altera o fármaco, tornando-o mais hidrofílico e fácil de eliminar pelos rins, permanecendo menos tempo em circulação. Consequentemente, o fármaco pode não atingir uma dose necessária para gerar efeito terapêutico. Tal não se verifica nos pró-fármacos, que são administrados na forma inativa, sendo ativados após metabolização no organismo.^{12,59}

Os métodos de administração de fármacos convencionais por via oral têm-se mostrado incapazes de proporcionar um tratamento eficaz para o CPNPC. Tal deve-se à difícil solubilização dos fármacos por esta via e à incapacidade dos fármacos em alcançar os pulmões em concentrações suficientemente elevadas para proporcionar um efeito terapêutico.¹¹ Nesse sentido, os nanossistemas apresentam um grande potencial para transportar os fármacos por via oral. Através da encapsulação por nanopartículas ou outros nanossistemas é possível administrar oralmente fármacos hidrofóbicos, que isoladamente seriam difíceis de solubilizar, e evitar que estes sejam degradados antes de atingir o local de ação.⁶⁰ Atualmente existem vários estudos de nanopartículas desenvolvidas para administração oral, como os três polímeros desenvolvidos por Jiang e colaboradores, compostos por policaprolactona (PCL) e cobertos com quitosano, para administração oral de fármacos para o tratamento do cancro do pulmão.¹¹

4.3.2. Via de administração inalatória

Os pulmões constituem um alvo particularmente interessante para a nanomedicina.

Estes possuem uma elevada superfície de absorção para fármacos e a administração pulmonar é bastante atrativa, cómoda, não invasiva, permite auto-administração e evita o efeito de primeira passagem. Através desta via é possível obter um efeito local para tratar doenças respiratórias ou um efeito sistémico, permitindo tratar outras doenças.^{10,50,61}

A deposição nos pulmões depende sobretudo da combinação entre o tamanho e a densidade das partículas, para além de outros fatores. O resultado dessa combinação traduz-se num parâmetro chamado diâmetro aerodinâmico, que pode ser determinado experimentalmente. A deposição na parte mais distal do pulmão (alvéolos) ocorre essencialmente para partículas com diâmetro aerodinâmico $\leq 5 \mu\text{m}$, sendo o diâmetro aerodinâmico ótimo assumido como sendo entre 1 e 3 μm .⁶¹⁻⁶³ As partículas maiores depositam-se nas zonas mais anteriores das vias aéreas por impacto inercial ($\geq 5 \mu\text{m}$) ou sedimentação ($\geq 1 \mu\text{m}$ e $\leq 5 \mu\text{m}$), enquanto as partículas mais pequenas se depositam por difusão ($\leq 1 \mu\text{m}$).^{61,64} Existem diversos fármacos para administração por inalação, no entanto a sua formulação à nanoescala poderia trazer benefícios face às partículas à microescala atualmente utilizadas. Embora esteja reportado que nanopartículas muito pequenas (à volta de 10 nm) poderão penetrar profundamente na árvore respiratória, entrando para a região alveolar, as nanopartículas de maiores dimensões têm dificuldades de deposição, dado a sua massa ser muito reduzida para se depositarem por ação da gravidade durante o tempo de uma inalação. Para poderem depositar-se em tempo útil, têm de ser formuladas em transportadores que assegurem o seu transporte para a região em questão.^{10,61,63} Adicionalmente, devido ao seu reduzido tamanho as nanopartículas podem escapar à fagocitose pelos macrófagos e também penetrar mais facilmente a barreira epitelial dos pulmões, obtendo uma maior internalização para as células.^{10,61} Estas observações devem ser consideradas na futura formulação de fármacos inalatórios, pois a maioria das nanopartículas atualmente propostas para terapêutica não contemplam estes requisitos.¹⁰

Na maioria dos casos, as nanomedicinas podem ser administradas por via pulmonar por inalação de dispersões coloidais ou na forma sólida, utilizando dispositivos como os inaladores pressurizados com válvula doseadora (MDI) ou os inaladores de pó seco (DPI). Para além destes existem ainda os nebulizadores. A administração pulmonar de nanomedicinas é limitada, pois como foi referido, os nanotransportadores não se depositam eficazmente quando administrados individualmente, devido à sua reduzida inércia, pela sua massa e tamanho excessivamente reduzidos, pelo que a maior parte da dose inalada é exalada. Para ultrapassar esta limitação podem desenhar-se

microtransportadores que contêm as nanopartículas ou ainda aglomerados de nanopartículas, os quais terão assim as propriedades aerodinâmicas adequadas para alcançar as regiões desejadas.^{50,61,63}

Nos pulmões, após a deposição, as nanopartículas enfrentam ainda as várias barreiras e mecanismos de defesa, até libertarem o fármaco. Tal deve-se à exposição dos pulmões ao ambiente exterior, pois é necessário eliminar rapidamente as partículas estranhas inaladas. A primeira barreira para aceder ao epitélio consiste numa fina camada de muco, que cobre a árvore respiratória. No entanto, certas doenças como a fibrose cística e a DPOC caracterizam-se por um aumento e espessamento do muco, pelo que a existência destas doenças compromete a eficácia dos fármacos inalados. Ao depositar-se sobre a camada de muco, as nanopartículas podem ser retidas pelas forças eletrostáticas. Por este motivo, as partículas com cargas positivas ou negativas apresentam maior dificuldade em atravessar estas barreiras. Os cílios à superfície das células epiteliais dos brônquios também retêm as partículas, que são rapidamente eliminadas por via mucociliar.^{10,65}

Na periferia dos pulmões existem células epiteliais responsáveis pela síntese e libertação de surfactante, essencial para diminuir a tensão superficial dos alvéolos, bem como macrófagos alveolares, muito eficientes na fagocitose de partículas, sobretudo entre 1 e 3 µm. Em condições normais, as nanopartículas mais pequenas (< 100 nm) escapariam à fagocitose. No entanto, estas podem adsorver o surfactante e aglomerar-se, formando aglomerados de maiores dimensões que são detetados mais facilmente pelos macrófagos. Para além disso, as proteínas A e D do surfactante podem opsonizar as partículas inaladas, marcando-as para a fagocitose.^{10,50,65}

4.3.3. Via de administração intravenosa

A via de administração intravenosa (IV) é a mais utilizada na administração da quimioterapia convencional, permitindo uma biodisponibilidade de 100%. Assim o efeito é imediato e sistémico e não ocorre efeito de primeira passagem. Esta é a via mais rápida e precisa, e onde existe um maior controlo da dose administrada, quer em bólus IV, quer em perfusão contínua, podendo ajustar-se a dose à resposta terapêutica. Para além disso esta via permite a administração de grandes volumes. No entanto, trata-se de uma via invasiva, que requer a perfuração de uma veia, que é um procedimento doloroso e implica riscos de inflamação, infeção, flebite ou trombose. Assim sendo, esta administração requer profissionais e material especializado, o que se traduz num maior custo operacional. As soluções a administrar têm de ser aquosas e diluídas e têm de apresentar

apirogenia, esterilidade, isotonia e neutralidade.^{50,59} Esta via apresenta requisitos específicos no que se refere ao tamanho das partículas administradas, que no máximo pode ser de 5 µm, já que tamanhos superiores podem causar embolia pulmonar.⁵⁰ Os nanossistemas para o transporte de fármacos para tumores sólidos devem apresentar dimensões inferiores a 200 nm, uma forma esférica e uma superfície lisa, a fim de serem facilmente transportados pela vasculatura tumoral para as células cancerígenas.¹¹

4.4. Desenho de nanossistemas para o transporte de fármacos

Existem diversos requisitos a ter em conta no desenho e preparação de nanossistemas para o transporte de fármacos. O tamanho e a distribuição do tamanho dos sistemas são críticos na sua formulação, pois afetam e, em alguns casos, determinam a sua distribuição *in vivo*, toxicidade, eliminação, estabilidade e podem ainda influenciar o carregamento e libertação do fármaco.⁶⁰ Devido às suas reduzidas dimensões muitos nanossistemas são capazes de atravessar as barreiras biológicas, mas para tal existem determinados limites que devem ser respeitados.¹¹ Na circulação sanguínea as partículas superiores a 100 nm são opsonizadas por proteínas que as sinalizam como partículas, sendo posteriormente eliminadas pelos macrófagos do sistema reticuloendotelial (RES), através da fagocitose. Têm sido desenvolvidas várias estratégias para que os nanossistemas escapem à opsonização. Uma das mais utilizadas nas nanopartículas consiste em revestir as mesmas com polietilenoglicol (PEG). Trata-se de um polímero hidrofílico, biodegradável e não tóxico, que ao apresentar uma superfície neutra encobre e dissimula as regiões hidrofóbicas e as cargas à superfície das nanopartículas, evitando ou reduzindo a ligação não específica a componentes do sangue, bem como a opsonização e consequente eliminação das nanopartículas. Desta forma, prolonga-se o tempo de semivida das nanopartículas em circulação, aumentando consequentemente a sua distribuição, o que se traduz numa maior acumulação de nanopartículas no local-alvo. Obtém-se assim uma maior eficácia, com recurso a menores doses de fármaco, reduzindo paralelamente a toxicidade.^{1,11,49,60} Quanto às partículas menores (< 100 nm), estas sofrem naturalmente menor eliminação, alcançando os tumores com maior eficácia. No entanto, os sistemas devem superar os 10 nm para evitar a sua filtração renal e consecutiva excreção urinária, bem como o extravasamento para outros tecidos. As partículas mais pequenas apresentam maior tendência de aglomeração, sendo um desafio formular sistemas estáveis com dimensões bastante reduzidas.⁶⁰ Assim, os nanossistemas devem estar compreendidos no intervalo entre os 10 nm, para que não sofram filtração renal, e os 100 nm, para que não

sejam eliminados pelo RES. Idealmente devem ainda apresentar uma forma esférica e uma superfície lisa.^{11,49}

A segurança dos nanossistemas para aplicações médicas também é de extrema importância, sendo fundamental garantir a ausência de toxicidade para o organismo humano. Para tal devem levar-se a cabo, para cada nova nanoformulação, estudos toxicológicos adequados e rigorosos, *in vitro* e *in vivo*.^{10,11} Adicionalmente, os nanossistemas desenvolvidos para o transporte de múltiplos agentes terapêuticos apresentam um nível superior de complexidade, que deve ser devidamente testado. No sentido de evitar a toxicidade relacionada com nanossistemas e o estímulo de resposta imunológica pelo sistema imunitário devem ser selecionados materiais biocompatíveis. Por outro lado, as estratégias de libertação controlada dos fármacos através dos nanossistemas, bem como o facto destes escaparem à eliminação por via renal e pelo RES, permitem a sua permanência no organismo por longos períodos de tempo. Desta forma estes sistemas acumulam-se no organismo, o que pode conduzir a efeitos indesejados e ainda consideravelmente desconhecidos a longo prazo.^{11,49} Estudos de nanotoxicologia revelaram que algumas nanopartículas podem permanecer no organismo por mais de nove meses.⁶⁶ A este cenário acrescenta-se o facto da elevada superfície dos nanossistemas e das suas dimensões reduzidas permitirem que os mesmos atravessem as barreiras biológicas. O seu tamanho reduzido torna-os muito reativos, podendo interagir com as moléculas biológicas, dando origem a radicais livres e interferindo com os processos fisiológicos. Para evitar que tal aconteça, devem utilizar-se materiais biodegradáveis, que são hidrolisados após libertação do fármaco que transportam, nas células tumorais.⁴⁹

A química superficial dos nanossistemas influencia a sua capacidade de ultrapassar as barreiras biológicas. O potencial zeta (ξ) mede o potencial elétrico na interface das partículas com um líquido, sendo geralmente utilizado para determinar a carga superficial dos nanossistemas. Este é influenciado pela sua composição e o pelo meio em que estão dispersos. Os nanossistemas com potencial zeta acima dos +/- 30 milivolts (mV) são mais estáveis, pois a carga superficial evita a sua aglomeração.⁶⁰

As propriedades físico-químicas dos nanossistemas devem proporcionar um bom perfil farmacológico e toxicológico, bem como farmacocinética (PK) e farmacodinâmica (PD) adequadas à via de administração selecionada, ao tipo de ação (local ou sistémica) e às características do tumor. Deve ainda garantir-se a reprodutibilidade do processo de síntese, e devem ser realizados testes clínicos que demonstrem a eficácia e segurança dos nanossistemas, para permitir a sua aprovação pelas entidades reguladoras.¹¹

Os principais requisitos e propriedades físico-químicas dos nanossistemas para aplicações médicas encontram-se ilustrados e sintetizados na figura 4.6.

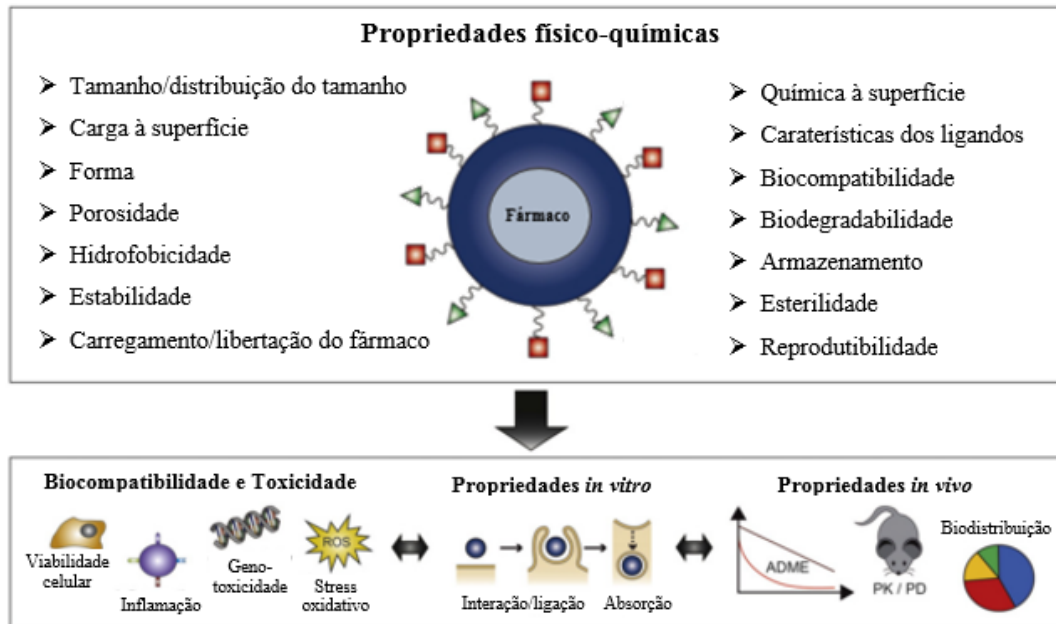


Figura 4.6 Esquema demonstrativo das propriedades físico-químicas e requisitos dos nanossistemas, *in vitro* e *in vivo*, para aplicações médicas. [Adaptado de (67)].

4.5. Aplicação de nanossistemas no tratamento do cancro

A quimioterapia convencional para o tratamento do cancro utiliza fármacos citotóxicos, capazes de eliminar as células cancerígenas. No entanto, estes não possuem seletividade para estas células, pelo que afetam também as células do tecido normal. Existem assim muitos efeitos secundários graves, que incluem náuseas, queda de cabelo, fadiga, neuropatia e um comprometimento do sistema imunitário, entre outros efeitos já anteriormente mencionados. Adicionalmente, a administração destes fármacos por via IV, para além de ser geralmente dolorosa, pode também implicar a ocorrência de efeitos adversos a nível sistémico. Por estes motivos, a indústria farmacêutica, os profissionais de saúde e os doentes anseiam por melhorias na terapêutica anticancerígena e na sua administração. Nesse sentido, os nanossistemas podem transportar os fármacos quimioterápicos de forma dirigida e seletiva para o local de ação, evitando ou reduzindo os efeitos adversos sistémicos. Nos últimos anos a aplicação de nanofármacos antitumorais tem-se destacado e o número de trabalhos de investigação associados cresceu exponencialmente. Em 2009 o mercado global da nanomedicina foi avaliado em cerca de 53 biliões de dólares, dos quais cerca de 20 biliões de dólares correspondiam à nanomedicina no cancro, com um investimento de aproximadamente 3,8 biliões de

dólares em investigação e desenvolvimento da indústria farmacêutica nesta área.^{9,46,48}

Os avanços na nanomedicina permitem o desenvolvimento de novos fármacos, mas também a reformulação e melhoria de fármacos já existentes. Com a utilização de nanossistemas é possível modificar as propriedades das formulações, podendo até acrescentar-se ou retirar-se certas características. A nanomedicina permitiu a reformulação de vários fármacos, previamente afastados por questões de solubilidade, segurança e toxicidade. A encapsulação de fármacos anticancerígenos utilizando nanomateriais permite uma maior e mais seletiva acumulação dos nanossistemas no tecido cancerígeno.^{10,66} Os nanotransportadores apresentam assim diversas vantagens em relação à quimioterapia convencional, algumas das quais dependem especificamente da sua arquitetura e composição:

- Protegem os fármacos da degradação no organismo antes de atingir o local-alvo;
- Possuem grande habilidade para ultrapassar as barreiras biológicas e, dependendo dos seus constituintes, podem ser biocompatíveis e biodegradáveis;
- Aumentam a solubilidade e dissolução dos fármacos;
- Transportam eficazmente fármacos hidrofóbicos, hidrofílicos e outras moléculas, podendo transportar vários agentes conjugados, controlando a sua libertação espacial e temporal através dos constituintes da matriz e da superfície do nanossistema;
- Permitem a libertação controlada e seletiva do fármaco, no local do tumor, sob determinadas condições de pH e na presença de certas enzimas;
- Permitem a vetorização passiva ou ativa de agentes terapêuticos para o tumor;
- Previnem a interação dos fármacos com as células normais, evitando assim a toxicidade não seletiva e os consequentes efeitos adversos.^{9,11,46,50}

A reformulação de terapias e fármacos convencionais à nanoescala permite ainda ultrapassar a resistência multifármaco (MDR) dos tumores, que continua a ser um dos grandes desafios da terapêutica antitumoral. Alguns tumores têm a capacidade de se tornar resistentes aos agentes de quimioterapia, através da sobre regulação de mecanismos celulares. São exemplo destes mecanismos os processos de reparação do ADN, que permitem às células tumorais reparar os danos causados pelos fármacos citotóxicos; alterações no metabolismo e destoxificação de fármacos; amplificação ou mutações genéticas de proteínas tumorais alvo dos fármacos antitumorais; alterações nas vias de sobrevivência e apoptose e a sobre expressão dos transportadores de efluxo de fármacos,

responsáveis por expulsar os fármacos do citosol.^{9,10} A glicoproteína P (gpP) é um dos principais transportadores de efluxo de fármacos, responsável pela resistência dos tumores aos fármacos antitumorais. Esta é codificada pelo gene MDR1 e a sua sobre expressão verifica-se em vários casos de MDR no CPNPC, sendo um dos principais alvos para tratar estes tumores resistentes.⁹ Nesse sentido, os nanossistemas permitem ultrapassar esta problemática. Uma das estratégias consiste no aumento da concentração de fármaco nas células resistentes, mantendo as bombas de efluxo saturadas. Como alternativa, ao encapsular os fármacos em nanossistemas, estes acumulam-se no tumor devido ao efeito EPR e são internalizados por via de endocitose, específica ou não específica, escapando ao transporte através das bombas de efluxo. Pode ainda aplicar-se um conceito de terapia combinada, para aumentar a eficácia da terapêutica antitumoral. Para tal, desenvolvem-se nanossistemas dirigidos às células tumorais, dotados de fármacos citotóxicos e de quimiosensibilizadores, como a curcumina ou o verapamilo. Estes atuam como inibidores da gpP, que vão bloquear o efluxo dos fármacos citotóxicos, permitindo o aumento da sua concentração no meio intracelular, obtendo assim um melhor efeito terapêutico. Outra estratégia consiste na utilização de nanossistemas carregados com *small interfering RNA* (siRNA) habilitado para silenciar o gene MDR1, reduzindo assim a expressão de gpP, o que se traduz numa maior eficácia antitumoral dos fármacos.^{1,9,58} Os nanossistemas representam assim uma mais-valia para revolucionar as terapêuticas antitumorais. Atualmente existem diversos estudos da aplicação de nanossistemas no tratamento do CPNPC. Muitos destes recorrem às nanopartículas poliméricas para o transporte e vetorização de fármacos antitumorais e outras macromoléculas. O capítulo seguinte centra-se nas nanopartículas poliméricas, abordando a sua composição, principais características e propriedades e a sua aplicação no cancro, sobretudo no CPNPC.

5. NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS E SUA APLICAÇÃO NA TERAPÊUTICA DO CANCRO DO PULMÃO DE NÃO-PEQUENAS CÉLULAS

As nanopartículas poliméricas são um dos tipos de nanossistemas, cuja composição se baseia em polímeros, podendo ser produzidas a partir de polímeros naturais ou sintéticos.¹¹

As nanopartículas desenhadas para aplicação anticancerígena apresentam geralmente dimensões entre os 10 nm e os 100 nm, podendo existir nanopartículas poliméricas de maiores dimensões. Estas dimensões são adequadas para absorção e distribuição no organismo, bem como na vasculatura tumoral, permitindo a sua acumulação nas células tumorais através do efeito EPR. Estas dimensões permitem ainda evitar a sua excreção renal e a eliminação pelos macrófagos do RES.⁴⁹

As nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais sólidos muito utilizados no transporte de agentes terapêuticos. Estes agentes podem ser conjugados ou adsorvidos à superfície das nanopartículas ou dissolvidos, retidos ou encapsulados no interior do núcleo ou matriz polimérica, que lhes confere proteção. Dependendo do processo de síntese das nanopartículas poliméricas podem obter-se nanoesferas ou nanocápsulas (figura 5.1). As nanoesferas consistem em sistemas matriciais onde o fármaco se encontra disperso ou fisicamente aprisionado na matriz polimérica. As nanocápsulas são sistemas do tipo reservatório onde o fármaco está confinado a uma cavidade hidrofílica ou hidrofóbica, rodeada por uma membrana polimérica. Os fármacos antitumorais podem ainda ser conjugados na superfície ou no núcleo das partículas. No caso dos fármacos insolúveis é possível promover uma interação hidrofóbica entre o fármaco e o núcleo da nanopartícula, a fim de aumentar a solubilidade.^{68,69}

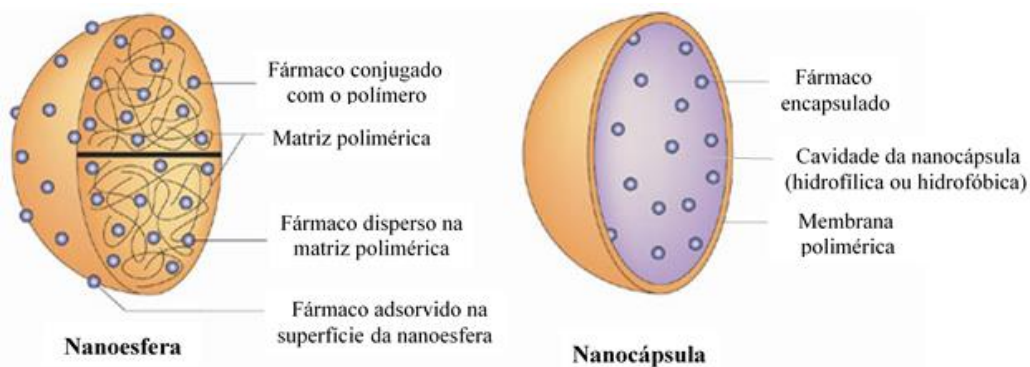


Figura 5.1 Esquema representativo de uma nanoesfera e de uma nanocápsula. [Adaptado de (70)].

As nanopartículas poliméricas são definidas pela sua morfologia e pela composição do seu núcleo e periferia, ou seja, da matriz polimérica e do polímero de revestimento, podendo para tal ser utilizados diversos materiais poliméricos. Para constituir a matriz polimérica os polímeros sintéticos mais utilizados são o ácido polilático (PLA), o ácido polilático-co-glicólico (PLGA), a policaprolactona (PCL) e os polialquilcianoacrilatos.¹¹ Estes podem ser facilmente produzidos e degradados, permitem a libertação controlada de fármacos e possuem uma elevada versatilidade química.^{67,69}

Podem utilizar-se também polímeros naturais como constituintes de matriz, sendo os mais utilizados o quitosano, a albumina, a gelatina, o alginato, o ácido hialurónico, o colagénio, os aminoácidos e alguns polissacáridos. Ao serem de origem natural, estes polímeros apresentam uma elevada biocompatibilidade e proporcionam uma maior segurança biológica dos nanossistemas obtidos, face aos polímeros sintéticos.^{9,11,69} Adicionalmente, não são tóxicos, são relativamente abundantes na natureza, acessíveis e facilmente degradados. No entanto, os polímeros naturais geralmente apresentam perfis de libertação relativamente rápidos e não são naturalmente puros e homogéneos, pelo que requerem um passo de purificação antes de serem utilizados.⁶⁹

As nanopartículas poliméricas são um dos nanotransportadores mais eficazes para o transporte controlado e prolongado de fármacos antitumorais.⁶⁹ Estas atuam como depósitos de fármacos, geralmente caracterizados pela libertação controlada dos mesmos. O controlo da libertação do fármaco é conseguido através da manipulação dos polímeros que constituem as nanopartículas. Entre os vários polímeros utilizados, o PLGA tem sido um dos mais estudados devido à sua elevada biocompatibilidade e libertação controlada, através da hidrólise das ligações éster. Nas nanopartículas de PLGA, através da variação da composição do polímero (razão ácido láctico/ácido glicólico) é possível variar a taxa de libertação do fármaco de dias até meses.⁵⁵

Por outro lado, podem alterar-se algumas propriedades das nanopartículas modificando a sua superfície. As nanopartículas podem ser revestidas por polímeros que conferem propriedades como a capacidade de escapar ao RES, prolongando a sua circulação na corrente sanguínea, que podem ser designadas como nanopartículas *stealth*. O polímero mais utilizado para o efeito é o PEG, como já foi descrito anteriormente, mas têm sido explorados para o mesmo efeito a poli(acrilamida), a poli-(*N*-vinilpirrolidona) e o álcool polivinílico. Além de minimizarem a opsonização durante a circulação sanguínea, estes contribuem para a biocompatibilidade e reduzida imunogenicidade das

nanopartículas que revestem e, sendo hidrofílicos, permitem maior solubilização e estabilidade das nanopartículas poliméricas em soluções aquosas.⁵⁵

5.1. Interação com as células

Após serem internalizadas pelas células cancerígenas, por endocitose, as nanopartículas poliméricas libertam os agentes terapêuticos transportados, pela difusão dos ativos através do polímero ou pela erosão e degradação do polímero, sob determinadas condições.^{69,71} Esta libertação pode ainda acontecer em resposta a estímulos. Este conceito surgiu em 1970, associado aos lipossomas, uma vez que foram então desenvolvidos lipossomas termosensíveis, que libertavam o fármaco através de hipertermia. Atualmente já foram desenvolvidos polímeros capazes de responder a alterações específicas nas condições químicas e físicas das células-alvo. Estes polímeros permitem otimizar a terapia antitumoral, proporcionando a libertação programável, em que o agente antitumoral é libertado através de um estímulo adequado, de pH, temperatura ou glucose, entre outros estímulos. Através do conhecimento e exploração das diferentes condições entre o tecido cancerígeno e o tecido saudável, é possível concretizar uma libertação de fármaco mais específica e seletiva.^{58,69}

Neste contexto, podem desenvolver-se nanopartículas poliméricas sensíveis ao pH. Recorrendo aos constituintes adequados para a sua formulação, estas nanopartículas mantêm-se estáveis no pH fisiológico do sangue (pH = 7,4), libertando o agente terapêutico apenas perante uma alteração significativa do pH, como é o caso das células cancerígenas e do seu microambiente envolvente. Nestas células e em alguns dos seus organelos, o pH pode variar, geralmente, entre 5 e 6,8. Tal deve-se à hipóxia que se verifica no tecido tumoral, em que a vasculatura tumoral não é suficiente para suprir as necessidades de oxigénio das células, sobretudo no centro do tumor. O estado de hipóxia promove a glicólise, em condições aeróbias e anaeróbias, gerando lactato e protões (H⁺). O quitosano tem sido bastante utilizado em nanotransportadores sensíveis ao pH. Devido ao seu pKa de 6,3, os grupos amina do quitosano encontram-se protonados num intervalo de pH ligeiramente ácido. Tendo em conta o pH ligeiramente ácido dos tumores, e do seu ambiente envolvente, os grupos amina do quitosano encontram-se protonados próximo do tumor. Assim, a repulsão que se faz sentir entre os grupos amina protonados do quitosano e os protões do meio ácido do tumor leva à libertação do agente terapêutico no local do tumor, promovendo uma absorção mais seletiva.⁵⁸ Na figura 5.2 são ilustradas as interações num nanotransportador de quitosano sensível ao pH.

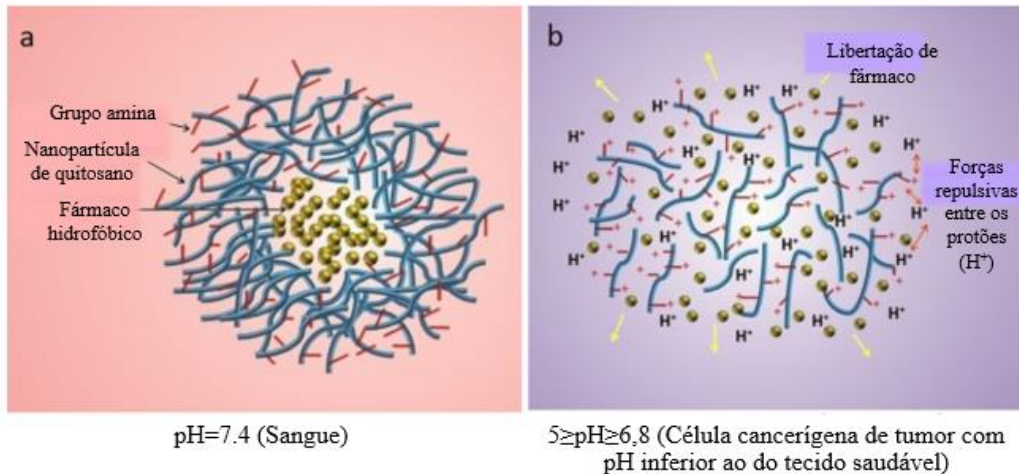


Figura 5.2 Interações num nanotransportador de quitosano sensível ao pH. (a) Forma agregada do nanotransportador no sangue e nos tecidos saudáveis. (b) Forma expandida no local do tumor. A repulsão entre os grupos amina protonados do quitosano e os prótons do meio ácido levam à libertação dos fármacos antitumorais. [Adaptado de (58)].

As propriedades das nanopartículas utilizadas, como o tamanho, estrutura, morfologia, carga superficial, potencial zeta, revestimento (química à superfície), estabilidade, hidrofobicidade, porosidade e densidade e peso molecular (PM) do polímero, entre outros fatores genericamente enumerados no capítulo anterior, determinam o seu comportamento *in vitro* e *in vivo*. Estas propriedades dependem dos constituintes que compõem a nanopartícula, bem como da sua síntese.^{69,71}

Como mencionado anteriormente, a peguilação das nanopartículas poliméricas é a estratégia mais utilizada para reduzir as interações hidrofóbicas com proteínas do sangue, bem como a sua opsonização, evitando a eliminação pelo RES e aumentando o tempo de circulação.⁵⁸ Porém, já existem alternativas ao PEG, como os polímeros zwitteriónicos.

Os polímeros zwitteriónicos podem apresentar cargas positivas e cargas negativas. Estudos demonstram que estes resistem melhor às interações com proteínas não específicas, o que se deve à hidratação induzida electrostaticamente. A modificação da superfície das nanopartículas com polímeros zwitteriónicos com unidades que respondem ao pH permite a alteração da sua carga superficial e o seu reconhecimento pelas células tumorais, através das diferenças entre o tecido saudável e o microambiente tumoral. Tal proporciona uma maior absorção das nanopartículas pelas células cancerígenas, face ao revestimento com PEG de elevada hidrofiliabilidade.⁷² Apesar das vantagens que estes polímeros proporcionam às nanopartículas que revestem, o maior tempo de circulação alcançado por partículas sintéticas em ensaios clínicos foi inferior a 300 horas, enquanto

os eritrócitos circulam no organismo por 100 a 120 dias. Tal deve-se essencialmente à proteína CD47, que atua como “marcador” nas membranas celulares de humanos, ratos e outros mamíferos, sinalizando o recetor de fagócitos CD172a, prevenindo estas células de serem fagocitadas. Nesse sentido, foram desenvolvidos estudos para aplicar este conceito às nanopartículas poliméricas.⁷² Num estudo desenvolveram-se nanopartículas poliméricas de PLGA, que foram cobertas com as membranas dos eritrócitos de rato, que incorpora os seus próprios lípidos e proteínas (figura 5.3). Os ensaios pré-clínicos preliminares demonstraram que estas nanopartículas possuem um maior tempo de circulação, comparando com as mesmas nanopartículas revestidas com PEG. Nestes ensaios, as nanopartículas cobertas com membrana de eritrócitos exibiram uma retenção total no sangue de 29% após 24 horas e de 16% após 48 horas, enquanto as nanopartículas cobertas com PEG obtiveram uma retenção de 11% e 2%, respetivamente. Foi ainda estimado um tempo de semi-vida de 39,6 horas para as nanopartículas cobertas com membrana de eritrócito e de 15,8 horas para as nanopartículas cobertas com PEG, através de um modelo usado em estudos anteriores, adequado para tratar os resultados de circulação das nanopartículas.⁷³ Adicionalmente, estas nanopartículas apresentam como grande vantagem a reduzida imunogenicidade, uma vez que são utilizadas as próprias células somáticas dos doentes. Apesar de serem necessários mais estudos, o revestimento de nanopartículas poliméricas com polímeros zwitteriônicos e membranas de eritrócitos podem ser substitutos viáveis do revestimento com PEG.⁷²

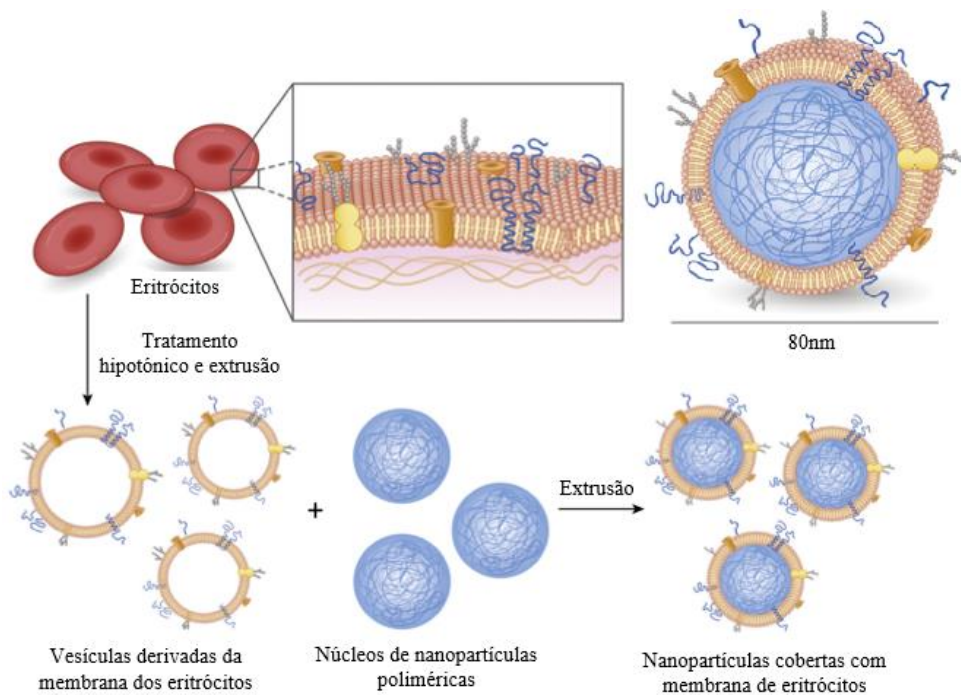


Figura 5.3 Nanopartículas de PLGA cobertas com membrana de eritrócitos. Em estudos

comparativos as nanopartículas de PLGA cobertas com membrana de eritrócitos obtiveram uma semi-vida de 39,6 horas, comparando com 15,8 horas de semi-vida das nanopartículas de PLGA cobertas com PEG. [Adaptado de (72)].

5.2. Aplicação de nanopartículas poliméricas no cancro do pulmão de não-pequenas células

As nanopartículas poliméricas têm sido bastante exploradas para o desenvolvimento de terapêuticas antitumorais, nomeadamente para o CPNPC. Estas nanopartículas apresentam diversas vantagens, que as tornam favoráveis como nanotransportadores, apresentando inclusivamente vantagens face a outros nanotransportadores. Os lipossomas são nanotransportadores muito utilizados, no entanto, apesar de todas as suas vantagens, apresentam limitações de relevo que incluem problemas de estabilidade e um limitado controlo de libertação de fármacos. Nesse sentido, as nanopartículas poliméricas são mais vantajosas, uma vez que a sua maior estabilidade *in vivo* proporciona maior tempo de circulação do fármaco. Tal permite um efeito mais prolongado, pelo que se obtém uma maior eficácia terapêutica com menores doses de fármaco. As nanopartículas poliméricas apresentam uma distribuição de tamanho mais homogénea. Também o controlo das suas propriedades físico-químicas e a sua capacidade de carregamento e controlo da libertação de fármacos é superior, face à dos lipossomas e das micelas poliméricas.⁶⁹

Tem sido descrito que as nanopartículas poliméricas permitem aumentar a biodisponibilidade dos fármacos que transportam, em determinadas condições, sendo também capazes de melhorar a solubilidade dos fármacos hidrofóbicos. Estas permitem o transporte de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos, dependendo da sua composição, e possuem a capacidade de proteger os fármacos instáveis da degradação no organismo, principalmente se os mesmos estiverem encapsulados na matriz polimérica, que lhes confere proteção. Estas nanopartículas também evitam a rápida metabolização e eliminação dos fármacos, na circulação sanguínea, pelo RES, pelo fígado e pelos rins, prolongando a sua permanência no organismo. Adicionalmente, estas têm habilidade para atravessar as barreiras biológicas, pois facilitam o transporte de fármacos através da membrana epitelial, por meio de endocitose. Muitos dos polímeros utilizados como material de matriz apresentam fortes propriedades mucoadesivas, nomeadamente o quitosano, contribuindo também para prolongar a permanência do fármaco no organismo. As nanopartículas permitem muitas vezes controlar a libertação do fármaco, de acordo com o efeito pretendido, através das propriedades dos materiais que as constituem,

permitindo um tempo de permanência no organismo prolongado e conseqüentemente uma maior eficácia comparando com o fármaco livre.^{50,68}

As nanopartículas poliméricas permitem a vetorização passiva de fármacos, através do efeito EPR. As suas dimensões permitem-lhes penetrar no tecido tumoral, através dos poros da vasculatura tumoral imatura, proporcionando a sua acumulação passiva no local do tumor. Por outro lado, estas nanopartículas podem ser modificadas para conduzir a uma vetorização ativa de fármacos, direcionando-os para o tumor. Para tal procede-se à funcionalização da superfície do polímero, através de ligandos específicos, cujos recetores são sobre expressos pelas células tumorais. Pode ainda combinar-se a vetorização passiva e ativa, a fim de reduzir as doses de fármaco necessárias, reduzindo a toxicidade.^{49,50,68} Desta forma, a utilização das nanopartículas poliméricas para o transporte de agentes terapêuticos reduz os efeitos adversos sistêmicos causados pelos fármacos citotóxicos, que ao não serem seletivos afetam quer as células tumorais, quer as células saudáveis. Tal promove uma melhor aceitação por parte dos doentes, alcançando-se uma melhor adesão à terapêutica. Para garantir a segurança dos tratamentos com recurso às nanopartículas poliméricas são utilizados polímeros biocompatíveis, que apresentam reduzida toxicidade, de modo a evitar uma reação imunológica do organismo às mesmas.^{50,68} Podem ainda utilizar-se polímeros biodegradáveis, garantindo que a permanência das nanopartículas no organismo é limitada no tempo, minimizando a toxicidade relacionada com as nanopartículas.⁶⁶

As nanopartículas poliméricas permitem ainda ultrapassar a importante problemática da MDR. Tal pode conseguir-se aumentando a concentração de fármaco nas células, através de uma rápida libertação de fármaco, mantendo as bombas de efluxo saturadas. Por outro lado, as nanopartículas poliméricas podem entrar para a célula por via de endocitose, escapando às bombas de efluxo. As nanopartículas permitem ainda o transporte de múltiplos ativos, podendo transportar-se, juntamente com as terapêuticas antitumorais, quimiosensibilizadores como o verapamilo, que atuam como inibidores da gpP ou genes siRNA, para silenciar o gene MDR1, reduzindo a expressão de gpP.^{9,58,69}

Apesar de todas estas vantagens, as nanopartículas poliméricas apresentam algumas desvantagens e limitações. Uma das maiores limitações destas diz respeito ao carregamento das mesmas com fármaco. Apesar de variável, e dependente de vários fatores, este tende a ser relativamente reduzido para muitos fármacos. Para além disso, a libertação do fármaco das nanopartículas também pode ser problemática, pois se for muito rápida e elevada pode não chegar fármaco suficiente ao local do tumor, levando à perda

de eficácia terapêutica.^{74,75} Um dos aspetos mais preocupantes relacionado com as nanopartículas no geral e com os restantes nanossistemas é a sua toxicidade e o facto de terem a capacidade de permanecer no organismo durante longos períodos de tempo. A sua longa permanência no organismo é benéfica e desejável para a eficácia terapêutica, como já mencionado, mas pode implicar consequências até agora desconhecidas, pelo seu reduzido tamanho e elevada reatividade.^{11,49,74} Por outro lado, o processo de transposição de escala é difícil e a produção de nanopartículas poliméricas para aplicação de terapêuticas implica elevados custos, bem como pessoal e material especializados.⁷⁴

Apesar destas desvantagens e limitações, as nanopartículas poliméricas apresentam elevado potencial, devido às propriedades anteriormente descritas, pelo que têm sido bastante utilizadas no transporte de agentes terapêuticos, nomeadamente na área da oncologia. Atualmente existem diversos estudos com estas nanopartículas, em fase de desenvolvimento e ensaios pré-clínicos e clínicos. No entanto, poucas formulações deste tipo de nanopartículas foram aprovadas para uso clínico pela FDA.⁶⁹ Em seguida são revistos os estudos de terapêuticas antitumorais à base de nanopartículas poliméricas com aplicação no CPNPC, publicados nos últimos cinco anos, estudados *in vitro* e *in vivo*. Para melhor organização foi feita uma divisão por material polimérico.

5.2.1. Ácido hialurónico

O ácido hialurónico (HA) é um mucopolissacárido linear da família dos glicosaminoglicanos, composto por unidades de ácido glucurónico alternadas com unidades de *N*-acetilglucosamina. Trata-se de um biopolímero altamente aniónico, solúvel em água, presente na matriz extracelular, no humor vítreo e nos fluidos sinoviais. Este é biodegradável, não tóxico, não imunogénico e não inflamatório, sendo adequado para o transporte sistémico de fármacos citotóxicos. Adicionalmente, é possível a modificação química dos resíduos de açúcar da sua estrutura por processos relativamente simples, proporcionando uma variedade de macroestruturas que podem transportar terapêuticas até ao alvo.^{76,77}

No cancro do pulmão observa-se muitas vezes a aquisição rápida de fenótipos multirresistentes a fármacos, pelo que a MDR constitui um desafio para a terapêutica antitumoral da doença. Nesse sentido, a identificação dos genes responsáveis pela resistência e o seu silenciamento, através de siRNA constitui uma abordagem eficaz para esta problemática, aumentando a sensibilidade do tumor aos agentes terapêuticos. Ganesh e os seus colaboradores utilizaram esta abordagem em células multirresistentes à

cisplatina (CIS). Para tal, identificaram os genes anti-apoptóticos sobre expressos relacionados com a resistência à CIS, como sendo a survivina e o bcl-2. Foram desenhadas sequências de siRNA com potencial para silenciar estes genes, tendo sido selecionada a sequência com maior sinergia com a CIS em células resistentes. A sequência de siRNA e a CIS foram encapsuladas em várias nanopartículas de ácido hialurónico e derivados, tendo sido selecionadas as nanopartículas derivadas de HA, modificadas com uma cadeia lipídica de 1,8-diaminooctano (ODA), designadas por HA-1,8-diaminooctano (HA-ODA), por demonstrarem uma eficiência de encapsulação de CIS relativamente elevada (HA-ODA/CIS). Estas nanopartículas foram vetorizadas para o CD44, cujos recetores são sobre expressos pela maioria dos tumores CPNPC. As nanopartículas obtidas foram aplicadas em células A549, uma linha celular de cancro do pulmão humano de não-pequenas células, mais concretamente de adenocarcinoma do pulmão, sensíveis (controlo) e resistentes à cisplatina. Estas nanopartículas conseguiram reverter a resistência à CIS e aumentaram significativamente a inibição do crescimento das células tumorais, de 30% para 60% em células tumorais resistentes à CIS. Foram ainda realizados vários ensaios *in vivo*. Num dos estudos trataram-se ratinhos portadores de tumores resistentes A549 com dois siRNA (survivina + bcl-2) em combinação com a CIS, a fim de investigar o efeito sinérgico dos agentes terapêuticos na eficácia antitumoral. Como controlos foram utilizados PBS e siRNA não específicos, na presença e ausência de CIS, para despistar atividade não específica. Os ratinhos tratados com terapias combinadas (survivina + CIS, bcl-2 + CIS, survivina + bcl-2 + CIS) apresentaram inibição do crescimento do tumor significativamente superior aos restantes grupos, no entanto, não se verificaram diferenças significativas entre si, pois estes inibiram o crescimento tumoral em 52%, 58% e 62%, respetivamente. Durante o estudo não foram observados efeitos adversos graves nos grupos sob tratamento. Os autores do estudo demonstraram que a combinação de siRNA com fármacos citotóxicos constitui uma abordagem sinérgica, eficaz e segura para tratar tumores multirresistentes a fármacos.⁷⁸

Noutro estudo, foram desenvolvidas várias nanopartículas à base de ácido hialurónico e seus derivados, também vetorizadas ao CD44, para o transporte direcionado de siRNA, com vista a tratar células cancerígenas que sobre expressam recetores de CD44. As nanopartículas foram ainda modificadas com aminas gordas ou com poliaminas catiónicas, como a polietilenimina (PEI) ou a L-polilisina (PLL), para facilitar a encapsulação de siRNA, por este ser negativamente carregado, o que dificulta a sua encapsulação devido à natureza aniónica do HA. Estas foram aplicadas a várias linhas

celulares, nomeadamente células A549, de CPNPC, resistentes à cisplatina. De acordo com os resultados *in vitro*, as nanopartículas de ácido hialurónico e derivados, com siRNA encapsulado demonstraram absorção seletiva pelas células tumorais, mas apenas algumas manifestaram atividade de silenciamento do gene (as HA-PLL e as HA-PEI). Os investigadores sugerem que as nanopartículas que não demonstram atividade possam ficar presas nos endossomas, sendo degradadas quando estes se fundem com os lisossomas. Verificou-se uma relação linear entre os níveis de expressão de CD44 e a atividade de silenciamento nas células *in vitro*. Nos ensaios *in vivo* usaram-se ratinhos imunodeficientes com implantes subcutâneos de tumores humanos A549, sensíveis e resistentes à CIS, para mimetizar a heterogeneidade e complexidade dos tumores humanos. Estes modelos animais foram tratados com nanopartículas de HA-PEI/HA-PEG/siRNA, tendo-se verificado apenas uma atividade mínima nos tumores A549 resistentes à CIS. Apesar dos resultados *in vivo*, é importante notar que as doses utilizadas nos estudos foram baixas e que a heterogeneidade dos tumores desempenha um papel importante na resposta terapêutica. Isto porque o mesmo ensaio realizado noutros tumores com níveis elevados de CD44 e elevada vascularização demonstrou uma atividade de silenciamento razoável, e verificaram-se diferenças de atividade nos tumores implantados subcutaneamente face às lesões metásticas. Ainda assim, o estudo demonstrou que as nanopartículas à base de ácido hialurónico constituem promissores candidatos para o transporte de siRNA, para tratar tumores que sobre expressam recetores CD44.⁷⁶

5.2.2. Aminoácidos

Os aminoácidos podem ser de origem natural ou sintética. Os aminoácidos naturais são polímeros iónicos biodegradáveis, de que são exemplo o ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA) e a L-polilisina (PLL), constituídos principalmente por um tipo de aminoácido. O γ -PGA é uma poliamida aniónica, composto por unidades de ácido D- e L-glutâmico, conectadas por ligações amida, biodegradável e solúvel em água. Várias formulações γ -PGA modificado foram desenvolvidas para o transporte de fármacos. A L-polilisina é conhecida pela sua atividade antitumoral, sendo considerada um potencial candidato para o desenvolvimento de veículos para o transporte de fármacos. No entanto, a sua citotoxicidade, devido às elevadas cargas positivas limita as aplicações deste polímero. O ácido L-poliglutâmico (L-PGA) é um aminoácido sintético, composto por resíduos de ácido L-glutâmico, unidos por ligações amida. Segundo estudos, este possui propriedades

como biocompatibilidade, biodegradabilidade, mínima retenção nos tecidos, não apresenta imunogenicidade, e está altamente carregado no pH fisiológico, tornando-o um veículo único para o transporte de fármacos e genes.⁷⁷

São conhecidas as vantagens das terapias combinadas, atuando de forma sinérgica no tumor, no entanto, a terapia combinada de múltiplos fármacos ainda apresenta bastantes desafios. A fim de estudar o cotransporte de doxorubicina (DOX) e paclitaxel (PTX) por nanopartículas poliméricas (co-DOX-PTX-NP), Lv e os seus colaboradores desenvolveram um copolímero anfifílico, à base de polipéptidos, decorado com ácido deoxicólico (DOCA), o metoxi polietilenoglicol-co-ácido-L-poli-glutâmico-co-L-polilisina (mPEG-co-PGA-co-PLL/DOCA). Cada um dos domínios do copolímero desempenha uma função específica: o revestimento de PEG prolonga o tempo de circulação, o núcleo hidrofílico de PGA transporta a DOX, através de interações eletrostáticas e o domínio hidrofóbico de PLL modificado com ácido deoxicólico destina-se ao transporte do PTX. Nos ensaios *in vitro*, em linhas celulares A549 de adenocarcinoma humano do pulmão, um subtipo de CPNPC, as nanopartículas apresentaram uma maior eficácia antitumoral na redução do volume de células tumorais, comparando com a combinação dos dois fármacos livres e com nanopartículas carregadas com PTX ou DOX, separadamente. A avaliação da eficácia antitumoral e da toxicidade sistémica *in vivo* foi realizada em ratinhos xenotransplantados com tumor A549 CPNPC, tratados com várias formulações. Os resultados de volume do tumor e alteração do peso corporal encontram-se demonstrados na figura 5.1. As nanopartículas carregadas com a combinação de fármacos DOX e PTX apresentaram uma eficiência antitumoral significativamente superior na redução do volume do tumor ($p < 0,01$), que foi quase total, comparando com as restantes formulações. Durante o tratamento não foram observados efeitos adversos óbvios, pois quase não se verificou redução no peso corporal nos grupos tratados com as nanopartículas para o cotransporte dos fármacos, ao contrário dos grupos tratados com os fármacos livres, sobretudo com DOX, que sofreram significativas reduções de peso corporal, indicando toxicidade sistémica dos mesmos. O estudo demonstra assim o potencial clínico dos sistemas poliméricos, à escala nano, para o cotransporte de diferentes fármacos para a terapêutica antitumoral do CPNPC.⁷⁹

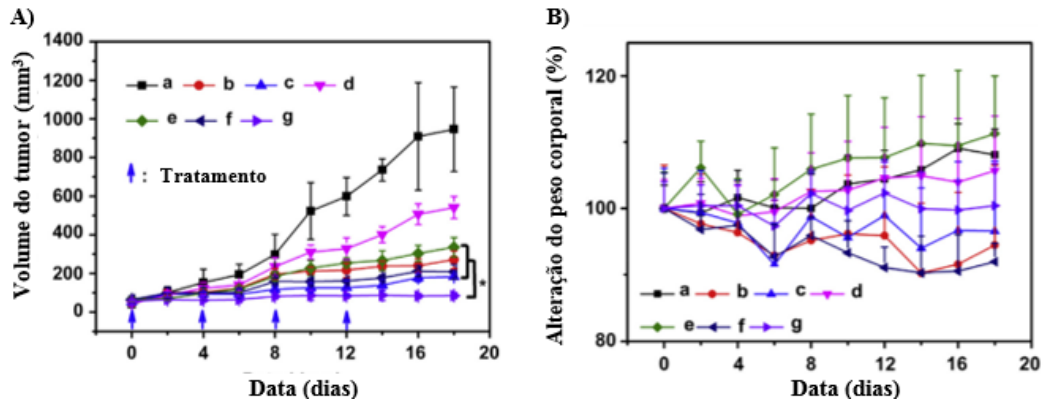


Gráfico 5.1 (A) Volume do tumor e (B) alteração do peso corporal em ratinhos xenotransplantados com tumor A549 do pulmão após tratamento com diferentes formulações: (a) PBS, (b) DOX livre, (c) DOX-NP, (d) PTX, (e) PTX-NP, (f) DOX + PTX livres, (g) (co-DOX-PTX-NP). Os dados representam valores de média + desvio-padrão (n=6), # p < 0,01. [Adaptado de (79)].

5.2.3. Policaprolactona

A policaprolactona é um polímero sintético semi-cristalino. Trata-se de um poliéster hidrofóbico e biodegradável. Devido às suas propriedades como biocompatibilidade, compatibilidade com uma grande variedade de fármacos e à sua lenta degradação este tem sido investigado para o transporte e libertação controlada de fármacos. Este polímero apresenta ainda uma grande versatilidade, podendo ser combinado com outros polímeros, como o PEG ou o quitosano, por copolimerização, para modificar as suas propriedades físico-químicas, como a sua solubilidade e o seu padrão de degradação, de acordo com o fármaco a transportar e o efeito pretendido.^{77,80}

O RLW é um péptido capaz de penetrar nas células, que constitui um dos requisitos cruciais no transporte direcionado de terapêuticas para os tumores. Num estudo desenvolvido por Gao e os seus colaboradores, ligou-se o péptido RLW a nanopartículas de policaprolactona. Estas nanopartículas foram utilizadas para o transporte dirigido do RWL (RNP) para células de CPNPC (A549), tendo sido utilizado como controlo o R8 (RRRRRRRR), um péptido tradicional de penetração celular. Nos estudos de absorção celular *in vitro*, as nanopartículas com RLW (RNP) desenvolvidas apresentaram um aumento de absorção específica pelas células A549 superior ao das células endoteliais de veia umbilical humana, enquanto o péptido R8 aumentou a absorção celular de ambas as células, de forma não seletiva. Tendo em conta que a maior parte dos tumores sólidos são difíceis de penetrar, foram usados modelos tridimensionais de esferóides tumorais, a fim de avaliar a penetração nos mesmos. As nanopartículas modificadas com RLW

apresentaram um aumento específico da penetração em esferóides tumorais de células A549 superior, face a esferóides de células de glioma humanas U87 (usado como controlo *in vivo*), demonstrando a sua seletividade, para além da habilidade de penetração celular. A distribuição das nanopartículas RNP nos órgãos foi aproximadamente a mesma do que as nanopartículas não modificadas, enquanto as nanopartículas modificadas de R8 foram distribuídas praticamente por todos os tecidos, demonstrando a ausência de seletividade. Estes resultados demonstram que o péptido RLW proporciona um transporte dirigido para o tumor A549. As nanopartículas desenvolvidas foram depois carregadas com docetaxel. Estas induziram eficazmente a apoptose das células A549 e inibiram o crescimento dos esferóides A549 *in vitro*. Nos testes *in vivo*, em ratinhos xenotransplantados com células tumorais A549 e células U87, o grupo tratado com as nanopartículas modificadas com RLW e carregadas com DCTX obteve maior efeito antitumoral, alcançando maior redução do volume do tumor A549 do que os outros grupos. A modificação de nanopartículas com RLW demonstrou assim ser favorável, através do transporte direcionado para as células A549, da penetração através de esferóides A549 e do aumento da citotoxicidade do DCTX nas mesmas *in vitro* e do aumento significativo do transporte direcionado para transplantes A549, que levou a um maior efeito antitumoral *in vivo*. O péptido RLW demonstrou seletividade celular e habilidade de penetração, apresentando potencial para otimizar a terapia antitumoral.⁸¹

5.2.4. Polisilsesquioxano

O polisilsesquioxano (PSQ) consiste num material híbrido derivado da condensação de precursores organosilosados, com a fórmula genérica $((R'O)_3-Si-R-Si-(O'R)_3)$. Apesar de apresentarem uma biocompatibilidade semelhante à dos materiais à base de sílica, extensamente estudados para aplicações médicas, só recentemente se começaram a preparar nanomateriais de PSQ. Estes nanomateriais apresentam vantagens face aos materiais à base de sílica, pois permitem alterar mais facilmente as suas propriedades físico-químicas, bem como um maior carregamento de fármaco.⁸²

Como mencionado anteriormente no tratamento do cancro e concretamente no CPNPC podem associar-se opções terapêuticas, como a RT e a QT, uma modalidade de tratamento designada por quimioradioterapia (QRT). Esta permite aumentar a eficácia terapêutica, pois a radioterapia trata o tumor localizado, enquanto os agentes quimioterapêuticos vão eliminar as células cancerígenas disseminadas. Num estudo, Rocca e os seus colaboradores avaliaram o uso de nanopartículas para o transporte de

agentes quimioterapêuticos na QRT. Para tal, desenvolveram nanopartículas poliméricas de PSQ para o transporte de um pró-fármaco de cisplatina, uma vez que a cisplatina (CIS) é um dos fármacos citotóxicos mais utilizados na RT. O carregamento das nanopartículas desenvolvidas de PSQ com o pró-fármaco de cisplatina (CIS-PSQ) foi excepcionalmente elevado. A estas nanopartículas foi ainda conjugado PEG, a fim de prolongar a duração em circulação. As nanopartículas CIS-PSQ-PEG foram utilizadas na QRT de um modelo de tumor de CPNPC, tendo sido avaliadas *in vitro*, em células H460, uma linha celular de cancro do pulmão humano de não-pequenas células, mais concretamente de carcinoma de grandes células e em células A549, e *in vivo*. Nos testes *in vitro* as células A549 e H460 de CPNPC células tratadas com as nanopartículas CIS-PSQ-PEG e radiação apresentaram menor sobrevivência do que as células tratadas apenas com RT. As nanopartículas em estudo foram aplicadas *in vivo*, em ratinhos xenotransplantados com cancro do pulmão A549 e H460, tratados com CIS e RT ou com nanopartículas de CIS-PSQ-PEG e RT. O modelo xenotransplantado com A549 tratado com cisplatina não apresentou resultados significativos ($p \geq 0,05$) superiores ao tratamento com radiação no decorrer do estudo. O tratamento com as nanopartículas CIS-PSQ-PEG demonstrou um aumento significativo ($p \leq 0,05$) na eficácia face ao tratamento com radiação (no dia 8 do tratamento), bem como uma melhoria significativa face à CIS (no dia 22 do tratamento). No modelo xenotransplantado com H460 não houve significativa radiosensibilização com CIS, mas as nanopartículas CIS-PSQ-PEG demonstraram um aumento significativo ($p \leq 0,05$) na inibição do crescimento do tumor face à radiação e à combinação de cisplatina com radiação. As nanopartículas de CIS-PSQ-PEG demonstraram assim uma eficácia terapêutica superior à do fármaco livre, revelando potencial para melhorar os tratamentos antitumorais de QRT para o CPNPC.⁸³

5.2.5. Quitosano

O quitosano (CTS) é um biopolímero policatiónico, de origem natural, com características estruturais semelhantes aos glicosaminoglicanos. Este pode ser obtido através da desacetilação alcalina da quitina, que é o principal componente do exoesqueleto dos crustáceos.⁸⁴ O quitosano tem sido bastante utilizado em aplicações biomédicas, nomeadamente como nanotransportador de agentes terapêuticos, devido às suas propriedades. Este permite a libertação controlada de compostos ativos, apresenta sensibilidade ao pH, elevada biocompatibilidade e biodegradabilidade, hidrofílicidade, mucoadesividade e reduzida toxicidade e imunogenicidade. Em termos químicos o

quitosano é uma poliamina linear, com grupos amina e grupos hidroxilo, disponíveis para a sua funcionalização, pelo que este permite modificação química. A sua natureza catiónica permite a interação com aniões multivalentes, como o tripolifosfato (TPP), proporcionando um meio para a encapsulação de fármacos. Desta forma, também é possível conjugar ligandos específicos às nanopartículas de quitosano, permitindo a vetorização ativa de componentes sobre expressos pelas células tumorais. O quitosano permite ainda evitar o uso de solventes orgânicos perigosos na síntese das nanopartículas, pois este é solúvel em soluções aquosas acídicas. O pH deve ser inferior a 6,5 para garantir a protonação dos grupos amina, facilitando a sua solubilização devido às cargas positivas do esqueleto do quitosano que aumentam a repulsão entre as cadeias poliméricas.^{58,84}

Garg e os seus colaboradores desenvolveram nanopartículas poliméricas de CTS e PEG, carregadas com gencitabina (GEN). Nestas nanopartículas recorreu-se à vetorização ativa, para dirigir as nanopartículas para os pulmões, utilizando ligandos de anisamida (AA). Para tal, conjugou-se PEG com anisamida (PEG-AA) e em seguida formularam-se nanopartículas de quitosano e PEG, conjugadas com anisamida (CTS/PEG-AA). Posteriormente encapsulou-se GEN nas nanopartículas obtidas e investigou-se a possibilidade de melhorar o potencial de vetorização. Para tal, os investigadores compararam a eficácia das nanopartículas sintetizadas no estudo (CTS/PEG-AA) com a das nanopartículas de CTS/PEG e com a da GEN livre, em ratinhos, com tumores sólidos A549 de carcinoma do pulmão. As nanopartículas de CTS/PEG-AA revelaram menor toxicidade dos órgãos, comparada com a das outras formulações, devido à sua acumulação preferencial nas células tumorais, que se manteve em elevados níveis, bem como uma elevada atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*. Segundo os dados obtidos *in vitro*, em células A549, as nanopartículas CTS/PEG-AA apresentaram maior citotoxicidade, demonstrando que a adição dos ligandos de anisamida às nanopartículas de CTS/PEG aumenta significativamente a afinidade das mesmas com as células humanas do carcinoma do pulmão, através de interações recetor-ligando, entre as nanopartículas vetorizadas e as células tumorais, aumentando a internalização destas nanopartículas. Nos estudos *in vivo*, em ratinhos xenotransplantados com tumor A549, as nanopartículas CTS/PEG-AA carregadas com GEN demonstraram maior atividade antitumoral do que a GEN livre, durante todo o estudo e do que as nanopartículas CTS/PEG, a partir do dia 12 do tratamento, o que deve acontecer devido à acumulação seletiva das nanopartículas vetorizadas no tumor. Nos estudos *ex vivo* verificou-se uma maior absorção das nanopartículas CTS/PEG-AA, pelas células cancerígenas, face às

nanopartículas CTS/PEG e ao isotiocianato de fluoresceína livre (FITC), como se pode observar na figura 5.4. A anisamida pode assim melhorar o transporte de fármacos antitumorais, direcionando-os para os tumores, como o CPNPC, reduzindo os efeitos adversos no tecido saudável. Deste modo, o estudo demonstrou o potencial das nanopartículas de CTS/PEG-AA como nanotransportador de fármacos.⁸⁵

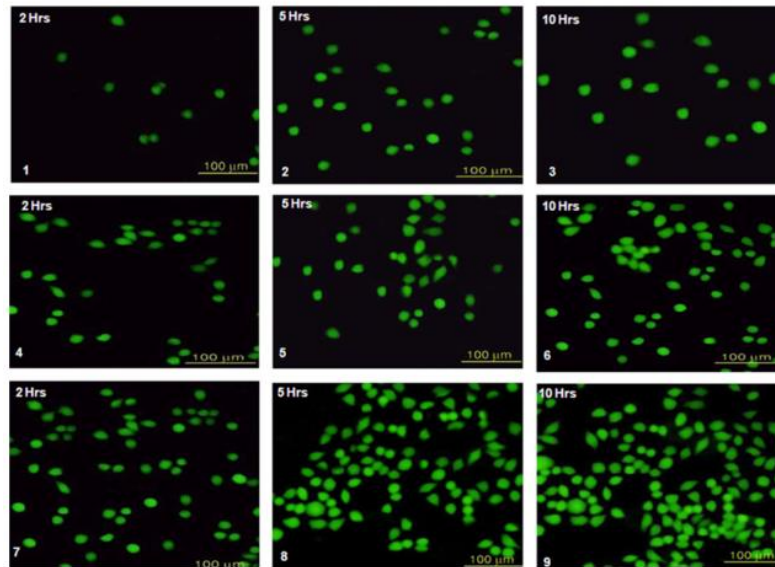


Figura 5.4 Estudos *ex vivo*. As imagens de microscopia fluorescente demonstram a absorção de nanopartículas carregadas com FITC em células A549. Imagens 1,2,3: FITC livre; Imagens 4,5,6: nanopartículas de CTS/PEG; Imagens 7,8,9: nanopartículas de CTS/PEG-AA. [Adaptado de (85)].

Noutro estudo Torrecilla e os seus colaboradores desenvolveram nanocápsulas (NC) de quitosano peguilado (CTS-PEG), conjugado com um anticorpo monoclonal (ACm), o anti-TMEFF-2 e carregadas com docetaxel (DCTX), (NC CTS-PEG-anti-TMEFF-2 ACm), para o transporte dirigido do fármaco. Os testes de eficácia *in vitro*, em células A549 CPNPC, que expressam naturalmente TMEFF-2, tratadas com DCTX livre, nanocápsulas não dirigidas CTS-PEG-OMe carregadas com DCTX e nanocápsulas CTS-PEG-anti-TMEFF-2 ACm demonstraram que estas formulações, à base de DCTX, suspenderam comparavelmente o ciclo celular das células tumorais, após 48 horas, enquanto as células controlo, não tratadas mantiveram o seu ciclo de replicação celular. No entanto, as nanopartículas vetorizadas reduziram a proliferação celular, enquanto as restantes apresentaram um efeito citostático, sem afetar a viabilidade das células tumorais. Os testes de eficácia *in vivo*, em ratinhos xenotransplantados com A549 CPNPC, tratados com as mesmas formulações usadas no teste *in vitro* revelaram que as

nanopartículas em estudo foram tão eficazes quanto o fármaco livre. Tal pode dever-se à dificuldade das nanocápsulas vetorizadas em aceder ao centro do tumor, devido à forte ligação dos ligandos com os seus recetores nas células tumorais. No entanto, as nanopartículas CTS-PEG-anti-TMEFF-2 demonstraram uma ação prolongada, não tendo provocado efeitos adversos significantes, face ao DCTX livre, que levou a um efeito mais rápido e menor, na redução do volume do tumor. Os autores esperam que os resultados *in vivo* não limitem a eficácia das nanocápsulas vetorizadas, face às nanocápsulas não vetorizadas, considerando a adequada internalização verificada nos testes *in vitro*.⁸⁶

Uma das mutações mais frequentes na maior parte dos cancros, incluindo no CPNPC, leva à sobre expressão de EGFR pelas células tumorais. Num estudo, Maya e os seus colaboradores desenvolveram nanopartículas de quitosano e ácido γ -poliglutâmico, decoradas com cetuximab, dirigidas para o EGFR, sobre expresso nas células do CPNPC (A549). Os resultados demonstraram que as nanopartículas em estudo possuem maior especificidade para o CPNPC. Isto porque as células A549 que sobre expressam EGFR (positivas para EGFR) obtiveram maior internalização do que as células NIH3T3, que não expressam EGFR (negativas para EGFR). Também a citotoxicidade foi superior nas nanopartículas decoradas com cetuximab, que provocaram maior atividade antiproliferativa do que as mesmas nanopartículas sem cetuximab, aumentando a morte das células tumorais, obtendo melhor efeito terapêutico.⁸⁷

Também Nascimento e os seus colaboradores desenvolveram nanopartículas poliméricas de quitosano e PEG. Estas foram dirigidas ao EGFR, para silenciar o gene Mad2, como estratégia para induzir eficazmente a morte celular nas células humanas de CPNPC (A549) que sobre expressam EGFR. As nanopartículas de CTS-PEG foram carregadas com siRNA contra o gene Mad2. Os resultados do ensaio de absorção, através de citometria de fluxo, *in vitro*, em células A549 demonstraram uma maior e seletiva internalização das nanopartículas desenvolvidas (vetorizadas), comparando com as nanopartículas não vetorizadas. Tal deve-se à internalização das nanopartículas vetorizadas por endocitose mediada por recetores, originando maior acumulação das mesmas no tumor. Nos testes *in vivo* em ratinhos xenotransplantados com células A549 o sistema vetorizado demonstrou citotoxicidade acentuada, tendo provocado a depleção quase total da expressão do gene Mad2 nas células A549, ao contrário do sistema não vetorizado, onde a depleção foi parcial. Estes resultados demonstram que o sistema desenvolvido é eficaz no transporte dirigido ao gene Mad2 de verificação mitótica do ciclo celular, silenciando-o, induzido assim a apoptose das células tumorais.⁸⁸

5.2.6. Ácido polilático-co-glicólico

O ácido polilático-co-glicólico (PLGA) é um polímero sintético aprovado pela FDA e pela *European Medicine Agency* (EMA) para aplicação no organismo humano, sendo um dos mais utilizados na síntese de nanopartículas poliméricas para o transporte de agentes terapêuticos. Este permite elevado controlo da libertação de fármaco, é biocompatível, biodegradável e a sua hidrólise para libertar o fármaco resulta em monómeros de lactato e ácido glicólico, apresentando reduzida toxicidade sistémica.^{74,89,90}

A hormona da tiróide estimula a proliferação celular e angiogénese tumoral de alguns cancros. A fim de inibir a atividade desta hormona, Mousa e os seus colaboradores desenvolveram nanopartículas poliméricas de PLGA, para o transporte de um derivado da hormona T4, o ácido tetraiodotiroacético (tetrac), que é um antagonista da hormona da tiróide. Neste estudo os autores investigaram o efeito antiproliferativo e anti-angiogénico destas nanopartículas, que foram funcionalizadas com grupos amina, através da conjugação com etilenodiamina. As nanopartículas de PLGA carregadas com tetrac (tetrac-PLGA-NP) foram aplicadas em três modelos: cultura de células H1299 de CPNPC *in vitro*, implantes de células tumorais em sistemas de membrana cório-alantóide de ovo de galinha embrionado (CAM) e em ratinhos xenotransplantados com implantes subcutâneos de células NCI-H1299. Os resultados demonstraram que tanto o tetrac não modificado como as nanopartículas tetrac-PLGA-NP inibiram significativamente a proliferação de células tumorais e a angiogénese tumoral, na cultura de células H1299 *in vitro*, no sistema CAM e nos ratinhos xenotransplantados, mostrando-se eficazes na supressão do crescimento de CPNPC humano. Apesar da eficácia de ambos, o tetrac e as nanopartículas de PLGA-tetrac diferem no mecanismo de ação, pois as nanopartículas atuam por mecanismos não genómicos, ao contrário do tetrac, apresentando mais efeitos na expressão de genes relevantes à sobrevivência das células cancerígenas, que podem traduzir-se numa maior eficácia em alguns tumores humanos do que o tetrac.⁹¹

Noutro estudo, Dong e os seus colaboradores desenvolveram nanopartículas de PLGA, que foram revestidas com quitosano e utilizadas para formar complexos (nanoplexos) com oligonucleótidos *anti-sense* 2'-O-metil-ARN (OMR). Estes oligonucleótidos OMR estabelecem ligação com o componente da telomerase no ARN, inibindo a atividade da enzima, essencial para evitar a apoptose celular induzida pela ausência dos telómeros após sucessivas divisões celulares. As nanopartículas desenvolvidas, ou nanoplexos, foram aplicadas em cortes frescos do tecido tumoral humano isolado e em células de tumor primário de doentes com CPNPC, a fim de

mimetizar microambiente tumoral original. Os resultados indicaram que os nanoplexos de OMR conseguem penetrar no tecido tumoral, pois a absorção celular de OMR foi significativamente aumentada pelos nanoplexos, com uma toxicidade relativamente reduzida. No gráfico 5.2 encontram-se os resultados de atividade relativa da telomerase nas células de tumor primário e nos cortes frescos de tecido pulmonar após os vários tratamentos. Nas células de tumor primário foi obtida uma absorção de OMR superior a 80%, com cerca de 45% de inibição da atividade da enzima. Nos cortes frescos de tecido tumoral obteve-se uma absorção de OMR de 50% e a atividade da telomerase foi inibida em cerca de 40%. O estudo sugere assim que o corte de tecido tumoral constitui uma ferramenta útil para avaliar a nanotecnologia baseada no transporte de oligonucleótidos inibidores da telomerase num contexto *in vivo*. Por outro lado, o estudo demonstra a eficácia dos oligonucleotidos OMR na inibição da atividade da telomerase e o aumento significativo do seu transporte pelas nanopartículas de PLGA cobertas com CTS, constituindo uma abordagem promissora para tratar o CPNPC humano.⁹²

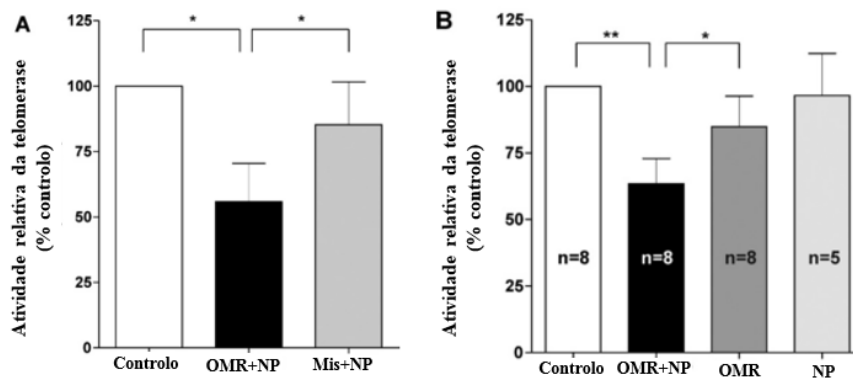


Gráfico 5.2 (A) Inibição da atividade da telomerase pelo transporte de 2'-O-metilARN (OMR), através de nanopartículas para as células do cancro do pulmão primário após tratamento de 72 horas com O-metil-ARN-nanoplexos (OMR+NP) ou OMR-nanoplexos não compatíveis (Mis+NP). A atividade da telomerase das células tratadas foi normalizada para corresponder a células controlo não tratadas (controlo). Os resultados representam a média + desvio-padrão de 6 experiências ([#] p < 0,05). (B) Inibição da atividade da telomerase pelo transporte de OMR, por nanopartículas, para os cortes de tecido pulmonar, 24 horas após o tratamento com OMR, nanopartículas vazias (NP) ou O-metil-ARN-nanoplexos (OMR+NP). A atividade da telomerase dos tecidos tratados foi normalizada para corresponder a tecidos controlo não tratados (controlo). Os resultados representam a média + desvio-padrão de tumores de 8 espécimes (### p < 0,01; # p < 0,05, n=5 para o grupo tratado com NP, n=8 para os restantes grupos). [Adaptado de (92)].

Como anteriormente referido, a sobre expressão de EGFR é comum em diversos cancros, incluindo a maioria dos casos de CPNPC. Com a finalidade de desenvolver uma terapia dirigida ao EGFR, Karra e os seus colaboradores sintetizaram nanopartículas de

PLGA. Estas nanopartículas foram carregadas com o pro-fármaco lipofílico palmitato de paclitaxel (pcpl) e conjugadas com o anticorpo cetuximab (PLGA-pcpl-Cet-NP). Foi ainda utilizada oleil cisteinamida (OCA) para facilitar e proporcionar a bioconjugação espontânea do cetuximab à superfície das nanopartículas de PLGA, estabelecendo pontes tioéter, através do grupo tiol das moléculas de OCA. Verificou-se por citometria de fluxo a ligação específica das nanopartículas ao EGFR, em células A549 previamente transfetadas com luciferase (A549-luc-C8). No ensaio *in vitro* as nanopartículas PLGA-pcpl-Cet proporcionaram maior inibição da proliferação celular, comparando com concentrações equivalentes de pcpl livre (controlo). Para testar a eficácia da terapêutica *in vivo* foi utilizado um modelo de cancro do pulmão metastático, com sobre expressão de EGFR. As nanopartículas PLGA-pcpl-Cet demonstraram-se mais eficazes, obtendo um aumento significativo na inibição do crescimento do tumor e maior sobrevivência dos modelos animais tratados em comparação com todos os controlos [solução de fármaco não dirigido, nanopartículas de PLGA carregadas de fármaco (não dirigidas) e nanopartículas conjugadas com cetuximab (sem fármaco)], durante todo o estudo. Adicionalmente, não foram observados efeitos adversos sistémicos, nem de reações no local da injeção das nanopartículas PLGA-pcpl-Cet, após um breve tempo de observação. As nanopartículas também apresentaram uma melhor farmacocinética, tendo apresentado uma rápida distribuição e absorção pelo tecido tumoral. Apesar de um maior efeito terapêutico, dos níveis elevados e consistentes de pcpl e paclitaxel, as nanopartículas PLGA-pcpl-Cet não apresentaram uma maior acumulação no local do tumor, face aos controlos. Tal facto sugere que estas as nanopartículas atuam como um reservatório do fármaco, libertando-o de forma consistente, ao longo do tempo para o tecido tumoral, servindo até lá, de proteção do mesmo, evitando a sua eliminação. O estudo demonstra assim o potencial das nanopartículas desenvolvidas para melhorar a terapêutica antitumoral de tumores com sobre expressão do EGFR, como o CPNPC.⁹³

A transdução de sinal e a ativação do ativador de transcrição-3 (Stat3) desempenha um papel crucial no crescimento e progressão tumoral. Nesse sentido, Das e os seus colaboradores injetaram siRNA diretamente em ratinhos, a fim de inibir a expressão de Stat3, porém, não se verificou inibição. Tal pode dever-se à degradação do siRNA pelos lisossomas, após a absorção celular, como a maioria das macromoléculas, levando à ineficácia terapêutica. Em alternativa, os autores recorreram à encapsulação do siRNA para o Stat3. Para tal desenvolveram e caracterizaram nanopartículas de polietilenimina (PEI) e PLGA, para o transporte do siRNA (NsiRNA), a fim de evitar a degradação

lisossomal. Para avaliar o efeito destas nanopartículas *in vitro* procedeu-se ao tratamento de células A549 com NsiRNA e siRNA (controlo). Os resultados da citometria de fluxo demonstraram que as nanopartículas NsiRNA estimularam a apoptose nas células A549, tendo reduzido a viabilidade celular destas células em 23,89%, 24 horas após a administração. O mesmo não se verificou após a administração de siRNA. Para o estudo *in vivo* foram utilizados ratinhos Balb/c (n=36), que foram divididos em subgrupos, sob diferentes condições, sendo que a 18 destes ratinhos foram administradas doses de benzo(a)pireno e arsenito de sódio para induzir cancro do pulmão. Os resultados demonstraram um aumento na apoptose celular de $1,12 \pm 0,42\%$ nos grupos tratados com siRNA Stat3 para $21,68 \pm 2,87\%$ e $32,29 \pm 5,38\%$ nos grupos tratados com as 50µg/mL e 100µg/mL de nanopartículas NsiRNA Stat3, respetivamente. Verificou-se ainda a redução da expressão de interleucina 6 (IL-6), ciclina D1 e VEGF e o aumento da caspase 3 nos ratinhos tratados com as nanopartículas NsiRNA, comparando com os controlos, correspondendo a uma regressão no crescimento tumoral. Verificou-se ainda que as nanopartículas eram capazes de atravessar a barreira hematoencefálica. O estudo demonstrou assim que as nanopartículas NsiRNA dirigidas para o Stat3 são capazes de silenciar a expressão do gene Stat3, *in vitro*, após 24 horas e *in vivo*, após um mês. Tal traduz-se num aumento de indução da apoptose, que os autores sugerem ser através de um mecanismo dependente da via das caspases. Assim, as nanopartículas desenvolvidas demonstraram-se uma ferramenta eficaz para a terapia génica/genética do CPNPC.⁹⁴

Noutro estudo com nanopartículas poliméricas à base de PLGA, Guo e os seus colaboradores desenvolveram um nanovetor para o transporte de agentes antitumorais, dirigido para os recetores da transferrina, uma vez que estes são sobre expressos por cerca de 90% dos tumores. Para tal os autores desenvolveram nanopartículas com um núcleo polimérico de PLGA, uma camada de fosfolípidos e uma cobertura externa de PEG, obtendo nanopartículas cobertas por lípidos (LP), e conjugaram ligandos de transferrina (TF) à superfície das mesmas (TF-LP). As nanopartículas foram carregadas com doxorrubicina (DOX-TF-LP). No ensaio de absorção *in vitro*, as nanopartículas TF-LP apresentaram uma endocitose mais eficaz, uma vez que a sua absorção pelas células A549 foi 2,8 e 4,1 vezes superior à das nanopartículas LP e PLGA (controlos), respetivamente. A presença de lípidos análogos aos da membrana celular nas nanopartículas TF-LP facilita a sua absorção pelas células, resultando numa absorção superior à das nanopartículas de PLGA. Por outro lado, a presença dos ligandos de TF na superfície das nanopartículas TF-LP permite a sua entrada na célula por endocitose mediada por

recetores, facilitando a sua absorção face às nanopartículas TF. No teste *in vitro* as nanopartículas DOX-TF-LP demonstraram-se mais eficazes, exibindo maior efeito anti-proliferativo das células A549 e maior inibição do crescimento dos esferóides tumorais, em comparação com as DOX-LP e as nanopartículas de PLGA (controlos), como se pode observar no gráfico 5.3. Também nos ensaio *in vivo* as nanopartículas TF-LP demonstraram um efeito inibitório do crescimento tumoral em ratinhos com tumor A549 superior ao dos controlos. O estudo demonstra que as nanopartículas TF-LP constituem eficientes transportadores de fármacos direcionados para o tratamento do CPNPC.⁹⁵

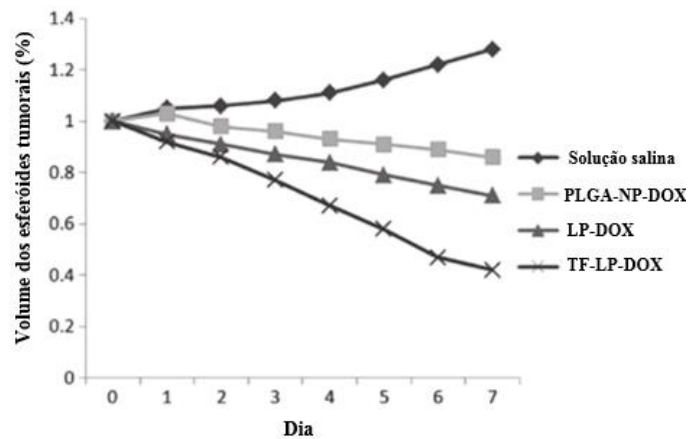


Gráfico 5.3 Percentagem de alteração do volume dos esferóides tumorais subseqüente à aplicação de várias formulações de DOX e na solução salina (controlo). DOX: doxorrubicina; PLGA-NP-DOX: nanopartículas de PLGA carregadas com doxorrubicina; LP-DOX: nanopartículas de PLGA, cobertas por lípidos e carregadas com doxorrubicina; TF-LP-DOX: nanopartículas de PLGA, cobertas por lípidos, carregadas com doxorrubicina e modificadas com ligandos de transferrina (TF). [Adaptado de (95)].

O paclitaxel é um fármaco antitumoral bastante utilizado no tratamento de vários cancros, como o cancro da mama, dos ovários, do pulmão entre outros. No entanto, a mistura de Cremophor EL e etanol utilizada na síntese do Taxol[®] provoca efeitos adversos, como reações de hipersensibilidade e neurotoxicidade. Para evitar estes efeitos adversos, bem como os relacionados com a ausência de seletividade do paclitaxel, Sun e os seus colaboradores desenvolveram umas nanopartículas poliméricas emulsificadas por α -tocoferol PEG 1000 succinato (TPGS) ou vitamina E TPGS, uma forma de vitamina E (TENP). As nanopartículas TENP foram carregadas com paclitaxel (PTX-TENP), tendo-se obtido partículas com um tamanho uniforme, de 100 nm. Nos ensaios *in vitro*, em células A549, observou-se uma significativa redução da viabilidade celular, em concentrações elevadas, no grupo de células tratado com as nanopartículas TENP, que foi superior à do grupo de células tratado com a mesma concentração de Taxol[®]. Nos ensaios

in vivo, em ratinhos xenotransplantados com A549, verificou-se acumulação preferencial das nanopartículas TENP no local do tumor, que demonstraram maior eficácia antitumoral do que o Taxol[®], inibindo o crescimento tumoral de forma mais significativa, sem efeitos adversos sistémicos. Os autores sugerem que a TPGS promove a permeabilidade através da membrana celular, devido às suas propriedades surfactantes. O estudo demonstra o potencial das nanopartículas poliméricas desenvolvidas, carregadas com PTX ou outros fármacos, para o tratamento de vários cancros, como o CPNPC.⁹⁶

5.2.7. Ácido polilático

O ácido polilático é um poliéster, composto por monómeros de ácido láctico, que é um produto da respiração anaeróbia, convertido em glucose pelo fígado, através do ciclo de Cori. O seu uso é, por isso, seguro, sendo um dos polímeros mais estudados para o transporte de agentes terapêuticos, com aprovação da FDA. Este é biocompatível, biodegradável, não tóxico e permite a libertação controlada do fármaco.⁹⁷

Com o propósito de reduzir os efeitos adversos e melhorar a eficácia da QRT, Jung e os seus colaboradores incorporaram taxanos (paclitaxel e docetaxel) em nanopartículas poliméricas de PLA-PEG e avaliaram o seu efeito na RT do CPNPC. As nanopartículas proporcionaram a internalização, por endocitose, para o interior das células tumorais, mantendo o efeito anticancerígeno dos taxanos, revelando-se adequadas para o transporte de fármacos, libertando o seu conteúdo no citosol. No ensaio clorogénico *in vitro* trataram-se células A549 com as nanopartículas de PLA-PEG carregadas com DCTX e com DCTX livre, após exposição a 5Gy de radiação ionizante ou sem exposição à radiação. O tratamento combinado das nanopartículas carregadas com taxanos e da exposição à radiação ionizante demonstrou uma redução significativa da sobrevivência das células cancerígenas. Nos resultados *in vivo* a eficácia da RT foi significativamente aumentada com a utilização das nanopartículas de PLA-PEG carregadas com taxanos em ratinhos xenotransplantados com tumor A549. O estudo demonstrou que as nanopartículas de PLA-PEG carregadas com taxanos aumentam a eficácia da QRT, podendo aplicar-se no tratamento de cancros humanos, como o CPNPC.⁹⁸

Num estudo da autoria de Shen e os seus colaboradores, foi explorada uma estratégia terapêutica baseada na interação entre a sub regulação da proteína ligante GATA 2 (GATA2) e a mutação do gene K-ras. Isto porque foi demonstrado que o fator de transcrição GATA2 desempenha um papel crucial na proliferação e sobrevivência das células de CPNPC com mutações no gene K-ras, pelo que a redução de GATA2 diminui

seletivamente a viabilidade das células cancerígenas. Com o propósito de explorar esta estratégia foram desenvolvidas nanopartículas poliméricas de PLA-PEG contendo lípidos catiónicos para o transporte de siRNA direcionado para a GATA2 (siGATA2), para o tratamento de CPNPC com mutações no gene K-ras. As nanopartículas foram aplicadas em linhas celulares A549 de CPNPC com mutação do gene K-ras, linhas celulares H226 e linhas celulares H7702 de hepatócitos humanos, ambos sem mutação no gene K-ras. De acordo com os resultados as nanopartículas carregadas com siGATA2 (NPsiGATA2) foram eficazmente absorvidas pelas células de CPNPC. Como resultado da sua internalização verificou-se a supressão do gene GATA2 e inibição seletiva da proliferação celular e indução da apoptose em células com CPNPC, com mutações no gene K-ras. No entanto, as nanopartículas não afetaram as células de CPNPC sem mutações no gene K-ras, nem os hepatócitos HL7702, confirmando a seletividade da terapêutica aplicada. No ensaio *in vivo*, as nanopartículas siGATA2 inibiram significativamente o crescimento tumoral em ratinhos xenotransplantados com CPNPC A549, não tendo sido observados efeitos adversos sistémicos. Desta forma foi demonstrado o potencial de estratégias letais no aumento da seletividade da terapêutica antitumoral, reduzindo a toxicidade não seletiva. O estudo demonstrou o potencial das nanopartículas de siGATA2 para o tratamento de CPNPC com mutações no gene K-ras.⁹⁹

BIND-014 é a designação atribuída à formulação de nanopartículas poliméricas constituídas por um núcleo polimérico de PLA e um revestimento exterior de PEG, carregadas com docetaxel (DCTX), desenvolvida pela BIND Therapeutics para o tratamento de tumores sólidos, que atingiu a fase II de ensaios clínicos. Nesta recorreu-se à vetorização ativa, tendo-se utilizado um ligando específico para dirigir as nanopartículas para o antígeno específico de membrana da próstata (PSMA), que é sobre expresso pelas células do cancro da próstata, mas também na neovasculatura da maior parte dos tumores sólidos não-prostáticos.^{67,68} Nos ensaios realizados em vários modelos animais, o BIND-014 transportou para os tumores uma dose de DCTX 10 vezes superior do que o fármaco livre. O nanossistema demonstrou um prolongado tempo de permanência em circulação e maior retenção no tumor. A formulação de BIND-014 obteve ainda uma redução do volume do tumor em modelos animais idêntica à obtida por um quinto da dose de DCTX livre.⁶⁷ Já nos ensaios clínicos de fase I o BIND-014 obteve resultados promissores em doentes com tumores metastizados, tendo sido também observada a recessão do tumor em doentes com cancros sem resposta a outros tratamentos. A formulação foi bem tolerada e apresentou atividade com uma dose de

60mg.m², a cada 21 dias, como tratamento de 2^a linha para o CPNPC avançado (doentes em estadio III/IV). O BIND-014 demonstrou ainda alguma atividade nos tumores do CPNPC, com mutações no gene K-ras, que geralmente não respondem aos agentes antitumorais e mínima atividade nos doentes com carcinoma do pulmão de células escamosas, um subtipo de CPNPC. Adicionalmente, o BIND-014 apresentou significativa redução face aos efeitos adversos provocados pela formulação comercial de DCTX à base de solvente, o Taxotere[®]. O aumento do efeito terapêutico do DCTX foi atribuído à vetorização ao PSMA. Atualmente o BIND-014 encontra-se em ensaios clínicos de fase II, estando a ser testado para o tratamento de vários cancros, nomeadamente o cancro da próstata metastático resistente a fármacos e o CPNPC avançado.^{68,72,100}

5.2.8. Ciclodextrinas

As ciclodextrinas são oligossacáridos cíclicos, compostos, geralmente, por 6, 7 ou 8 unidades de glucopirranose. Estas possuem uma grande facilidade para formar complexos de inclusão, com moléculas hidrofóbicas na água, podendo utilizar-se estes complexos no transporte de fármacos. Por outro lado, podem ainda formar agregados com dimensões nanométricas. Por este motivo e devido à sua versatilidade química, estas têm sido estudadas para desenvolver nanopartículas à base de ciclodextrinas modificadas, para o transporte de fármacos, sendo que a sua modificação química permite ainda aumentar a solubilidade e estabilidade dos mesmos.¹⁰¹

Existe uma formulação de nanopartículas de polímeros catiónicos à base de ciclodextrinas, com ligandos de transferrina à superfície, em ensaios clínicos de fase I em humanos, designada por CALAA-01. Estas nanopartículas foram desenvolvidas para o transporte de dirigido de siRNA para reduzir a expressão da subunidade M2 da enzima ribonucleótido redutase (RRM2), que é sobre expressa em vários cancros, como o CPNPC, desempenhando um importante papel na progressão tumoral. Este foi o primeiro tratamento experimental à base de ARN de interferência a ser administrado a doentes com cancro. A estrutura da formulação de CALAA-01 possui resíduos imidazol, para neutralizar os protões dos endolisossomas, levando à sua rutura e conseqüentemente libertando o siRNA no citosol das células tumorais. Após ser testada em modelos animais, a formulação foi testada num ensaio de fase Ia/Ib em doentes com vários tumores sólidos, a fim de investigar a translação da terapêutica de modelos animais para humanos. A dose tolerada foi de 18mg.m², pois doses superiores não foram bem toleradas. A nanoformulação de CALAA-01 foi seletivamente acumulada no tumor, reduzindo a

expressão do gene RRM2. O perfil de segurança foi semelhante ao obtido nos modelos animais, no entanto, nos doentes humanos não se verificou a toxicidade renal, previamente observada nos animais, o que pode dever-se ao protocolo de pré-hidratação aplicado antes dos tratamentos, a fim de proteger os rins. A formulação proporciona o transporte dirigido de siRNA funcional, no entanto, neste ensaio não foi testado o potencial completo da formulação de CALAA-01.^{102,103}

5.2.9. Albumina

A albumina é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo. Esta proteína tem 66kDa e é composta principalmente por cisteína e aminoácidos carregados (ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina e arginina), contendo ainda quantidades menores de triptofano e metionina. Estudos demonstraram que praticamente todos os tecidos humanos conseguem degradar a albumina, tornando-a num polímero biodegradável ideal para aplicações médicas. Adicionalmente, devido à sua solubilidade, excelente compatibilidade com o sangue e presença de grupos funcionais na cadeia polimérica, que facilitam o seu processamento em nanoesferas e outros nanossistemas, a albumina tem sido bastante estudada para o transporte intravenoso de fármacos e genes.⁷⁷

Até agora o Abraxane® (ABI-007) foi a única formulação de nanopartículas poliméricas aprovada pela FDA para comercialização. Trata-se de uma formulação liofilizada de nanopartículas de albumina, carregadas com PTX (nabTM), que é reconstituída numa suspensão para administração IV. Esta demonstrou ser mais eficaz que as formulações convencionais de paclitaxel livre, tendo também provocado menos efeitos adversos. O Abraxane foi aprovado para o tratamento do cancro da mama, pela FDA, em 2005. Em Outubro de 2012 este foi também aprovado pela FDA para o tratamento de primeira linha do CPNPC, em combinação com a carboplatina, quando a cirurgia e a radioterapia não são viáveis e, posteriormente, em Setembro de 2013, para o tratamento do cancro pancreático, estando apenas aprovado para doentes adultos. O Abraxane encontra-se em ensaios clínicos de fase III para o tratamento do melanoma maligno e em ensaios clínicos de fase II para o tratamento de 2^a linha do CPNPC avançado ou metastático. Para o tratamento de 1^a linha do CPNPC devem ser realizados ciclos de tratamento de três semanas, com administração de uma dose de 100mg.m² de Abraxane nos dias 1, 8 e 15 de cada ciclo e carboplatina no dia 1, imediatamente após o Abraxane.^{10,67,69,104}

6. CONCLUSÃO

O cancro do pulmão de não-pequenas células é uma neoplasia bastante agressiva, que progride rapidamente e apresenta uma elevada mortalidade, para além de também ser bastante incidente. Uma das opções terapêuticas, bastante utilizada sobretudo na doença avançada e metástica, é a quimioterapia. No entanto, os fármacos citotóxicos utilizados na quimioterapia convencional apresentam diversas desvantagens. Dada a sua ausência de seletividade são indiscriminadamente distribuídos pelos tecidos, afetando também as células saudáveis. Como a maior parte destes fármacos é administrada por via IV, e geralmente em doses elevadas, surgem efeitos adversos sistémicos, muitas vezes bastante severos. Acresce a este cenário desfavorável que as células cancerígenas podem ainda desenvolver resistências a estes fármacos.

São assim necessárias terapias mais eficazes e seletivas, dirigidas para as células tumorais e capazes de as eliminar eficazmente, sem provocar elevada toxicidade e efeitos adversos. As terapias à base de nanossistemas para encapsulação de agentes terapêuticos são uma alternativa promissora, pois estes apresentam elevado potencial para melhorar a terapêutica antitumoral e já demonstraram ser capazes de ultrapassar muitas das desvantagens e limitações dos fármacos citotóxicos. Nos últimos anos tem-se verificado grande atividade de investigação na área da nanomedicina com aplicação no cancro, nomeadamente com nanossistemas como os lipossomas, as nanopartículas inorgânicas, os dendrímeros, as micelas e as nanopartículas poliméricas. Entre estes, as nanopartículas poliméricas parecem ser um dos nanossistemas mais promissores na terapia antitumoral dirigida. Estes são constituídos por polímeros naturais ou sintéticos, e a sua estrutura sólida confere uma elevada estabilidade, superior a outros nanossistemas, como os lipossomas. Também a sua capacidade de carregamento de fármacos, bem como o controlo da libertação dos mesmos e o controlo das suas propriedades físico-químicas são superiores. A libertação dos fármacos pode acontecer em resposta a estímulos de pH, temperatura, glucose, entre outros. Tal permite programar a libertação, através do conhecimento e exploração das diferentes condições entre o tecido saudável e o tecido tumoral. Devido às suas dimensões as nanopartículas poliméricas acumulam-se seletivamente no tecido tumoral, através do efeito EPR (vetorização passiva). Estas nanopartículas apresentam uma elevada versatilidade química, permitindo a vetorização ativa, através da modificação e funcionalização da sua superfície, com ligandos específicos, cujos recetores são sobre expressos pelas células tumorais, a fim de as dirigir

para o local do tumor. Recorrendo ao uso de polímeros biocompatíveis, biodegradáveis e não tóxicos e à vetorização passiva e/ou ativa para dirigir as nanopartículas para o tumor, as nanopartículas permitem reduzir a toxicidade e os efeitos adversos, face à quimioterapia convencional. O revestimento destas nanopartículas com polímeros, como o PEG, ou alternativas como os polímeros zwitteriônicos ou as membranas de eritrócitos, permitem a sua permanência em circulação por longos períodos de tempo, escapando à eliminação pelo RES, o que permite reduzir as doses de fármaco necessárias. As nanopartículas poliméricas permitem incorporar uma elevada variedade de agentes terapêuticos, podendo transportar vários componentes ativos simultaneamente. Esta capacidade proporciona uma ação sinérgica dos ativos no tumor, aumentando a eficácia terapêutica. As nanopartículas poliméricas permitem ainda ultrapassar a resistência das células tumorais aos fármacos citotóxicos, através das várias estratégias enumeradas.

Para o desenho e desenvolvimento de nanopartículas poliméricas para o transporte de agentes antitumorais é então necessário conhecer e manipular as suas propriedades físico-químicas, a fim de alcançar o comportamento pretendido *in vitro* e *in vivo*. Apesar dos resultados promissores alcançados nos muitos estudos desenvolvidos nos últimos anos, ainda são necessários mais estudos de nanotoxicologia e de biodistribuição das nanopartículas, a fim de perceber os seus efeitos a longo prazo. Acrescenta-se o facto das terapias apresentadas terem sido maioritariamente estudadas em linhas celulares e em modelos animais, que constituem uma aproximação da fisiologia humana, mas não permitem extrapolar com rigor os resultados para o organismo humano. Espera-se então que nos próximos anos as terapias apresentadas avancem para a fase de ensaios clínicos, onde serão testadas em humanos. Tal permitirá avaliar a sua eficácia e toxicidade no organismo humano, a fim de aprovar estas terapias para utilização na prática clínica, fornecendo novas e melhores alternativas para a terapia antitumoral.

Como estratégia futura de desenvolvimento as nanopartículas poliméricas podem ainda ser utilizadas no teranóstico. Trata-se de uma estratégia bastante promissora, que combina o diagnóstico e a terapêutica, através de nanopartículas multifuncionais para o transporte de agentes de imagiologia e agentes terapêuticos, simultaneamente. O teranóstico permite assim detetar seletivamente as células cancerígenas e libertar o agente terapêutico no tecido tumoral, visualizando o processo em tempo real, através de técnicas de visualização *in vivo* não invasivas. Desta forma é possível monitorizar a eficácia terapêutica e os seus efeitos em tempo real, proporcionando uma terapêutica individualizada.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Gonçalves, A. S., Macedo, A. S. & Souto, E. B. Therapeutic nanosystems for oncology nanomedicine. *Clin Transl Oncol* 14, 883–890 (2012).
2. Who | Cancer. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/index.html>>
3. Cancer Research UK. *Worldwide Cancer*. 1–2 (2014).
4. Ministério da Saúde. Portal da Saúde - O que é o cancro? Como preveni-lo? (2005). Disponível em: <<http://www.portaldasaude.pt/portal/conteudos/enciclopedia+da+saude/ministeri+saude/doencas/cancro/cancro.htm>>
5. National Cancer Institute at National Institute of Health. What Is Cancer? (2014). Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>>
6. Pastorino, U. Lung cancer screening. *Brit Journ Cancer* 102, 1681–1686 (2010).
7. Sotto-mayor, R. Mortalidade por Cancro do Pulmão. *Acta Med Port* 27, 9–11 (2014).
8. Ramalingam, S. S., Owonikoko, T. K. & Khuri, F. R. Lung Cancer: New Biological Insights and Recent Therapeutic Advances. *CA Cancer Journ Clin* 61, 91–112 (2011).
9. Iyer, A. K., Singh, A., Ganta, S. & Amiji, M. M. Role of integrated cancer nanomedicine in overcoming drug resistance. *Adv Drug Deliv Rev* 65, 1784–1802 (2013).
10. Thorley, A. J. & Tetley, T. D. New perspectives in nanomedicine. *Pharmacol Ther* 140, 176–185 (2013).
11. Babu, A., Templeton, A. K., Munshi, A. & Ramesh, R. Nanoparticle-Based Drug Delivery for Therapy of Lung Cancer: Progress and Challenges. *Journ of Nanomat* 2013, 1–11 (2013).
12. Seeley, R. R., Stephens, T. D. & Tate, P. *Anatomia & Fisiologia*. (Lusociência, 2007).
13. Pollock, R. E., Doroshow, J. H., Khayat, D., Nakao, A. & O'Sullivan, B. *Manual de Oncologia Clínica da UICC*. (John Wiley & Sons, 2006).
14. Barata, F. & Costa, A. F. Carcinoma do pulmão de pequenas células – Estado da arte e perspectivas futuras. *Revist Port Pneumol* 18, 587–604 (2007).

15. American Cancer Society. What is non-small cell lung cancer. (2015). Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-non-smallcell/detailedguide/non-small-cell-lung-cancer-what-is-non-small-cell-lung-cancer>>
16. Wahbah, M., Boroumand, N., Castro, C., El-zeky, F. & Eltorkey, M. Changing trends in the distribution of the histologic types of lung cancer : a review of 4,439 cases. *Ann Diagnost Pathol* 11, 89–96 (2007).
17. Barata, F., Costa, P., Araújo, A. & Carvalheira, A. *Recomendações Nacionais Para Diagnóstico e Tratamento do Cancro do Pulmão 09*. 1–138 (2009).
18. WHO. WHO | Cancer. *Fact Sheet N°297* (2015). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>
19. Cancer Research UK. *Lung cancer*. 1–2 (2014).
20. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2015*. 1–56 (2015).
21. Miranda, N., Portugal, C., Nogueira, P. J. & Farinha, C. S. *Doenças Oncológicas em números – 2014*. 88 (2014).
22. Alves, L., Bastos, J. & Lunet, N. Evolução da mortalidade por cancro do pulmão em Portugal (1955-2005). *Revist Portug de Medic Ger e Famil* 15, 575–587 (2009).
23. Rubin, E., Gorstein, F., Rubin, R., Schwarting, R. & Strayer, D. *Rubin Patologia - Bases Clinicopatológicas da Medicina*. 1–1625 (Guanabara Koogan, 2006).
24. Cancer Research UK. *About Lung Cancer – A Quick Guide*. 1–5 (2014).
25. Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, J. C. & Aster. *Pathologic Basis of Disease*. (Saunders Elseviers, 2010).
26. Rodrigues, R. Acção do tabaco no desenvolvimento e progressão de neoplasias. 1–75 (Universidade de Coimbra, 2009).
27. Laso, F. J. *Patología General - Introducción a la medicina clínica*. 1–827 (Masson, 2005).
28. Alberg, A., Ford, J. & Samet, J. Epidemiology of Lung Cancer. *Chest Journ* 3, 29–55 (2007).
29. Zamboni, M. Epidemiologia do câncer do pulmão. *Journ Pneumol* 28, 41–47 (2002).
30. Deng, B., Li, Y., Zhang, Y. & Bai, L. Helicobacter pylori infection and lung cancer : a review of an emerging hypothesis. *Carcinog* 34, 1189–1195 (2013).

31. Miranda, M. S. & Oliveira, M. S. Uma breve revisão a respeito da carcinogênese pulmonar. Em *12th Safety, Health and Environment World Congress* 276–280 (2012).
32. Cooper, W. A., Lam, D. C., Toole, S. A. & Minna, J. D. Molecular biology of lung cancer. *Journ Thorac Dis* 5, 479–490 (2013).
33. Grivicich, I., Regner, A. & Rocha, A. Morte Celular por Apoptose. *Rev Bras Cancerol* 53, 335–343 (2007).
34. Beisner, J. *et al.* Lung Cancer Nanoparticle mediated delivery of 2'-O-methyl-RNA leads to efficient telomerase inhibition and telomere shortening in human lung cancer cells. *Lung Canc* 68, 346–354 (2009).
35. Pacheco, M. A. Opções Terapêuticas no Cancro do Pulmão. 1–48 (Universidade do Porto, 2014).
36. Kerbel, R. S. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Oxford Univ Press* 21, 505–515 (2000).
37. Brannon-peppas, L. & Blanchette, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 64, 206–212 (2012).
38. Bremes, R. M., Camps, C. & Sirera, R. Angiogenesis in non-small cell lung cancer: the prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood. *Lung Canc* 51, 143–158 (2006).
39. Araújo, A. M. F. Diagnóstico e Tratamento do Cancro do Pulmão: Estado da Arte Cancro do Pulmão Incidência. Em *Conferência Tabagismo e Cancro do Pulmão* 1–89
40. The International Early Lung Cancer Action Program Investigators. Survival of Patients with Stage I Lung Cancer Detected on CT Screenig. *New Eng Journ Med* 355, 1763–1771 (2006).
41. McPhee, M. A., Tierney, L. M. & Papadakis, S. J. *Current Medical - Diagnosis & Treatment 2001*. (The McGraw-Hill Companies, 2001).
42. DGS. *Diagnóstico e Tratamento do Carcinoma de Não Pequenas Células do Pulmão - Norma DGS*. (2013).
43. Ettinger, D. S. *et al.* Non-Small Cell Lung Cancer, Version 2.2013. *Journ Nation Compr Canc Netw* 11, 645–653 (2013).
44. Pulmonale - Associação Portuguesa de Luta Contra o Cancro do Pulmão. Quimioterapia. (2011). Disponível em: <<http://www.pulmonale.pt/o-cancro-do-pulmao/quimioterapia>>
45. Coimbra, N. EGFR as therapeutic target in non-small cell lung cancer. 1–18 (Universidade do Porto, 2010).

46. Boisseau, P. & Loubaton, B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *Compt Rend Physiq* 12, 620–636 (2011).
47. Horikoshi, S. & Serpone, N. Introduction to Nanoparticles. *Microwaves in Nanoparticle Synthesis* 1–24 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., 2013).
48. Filippini, L. & Sutherland, D. *Applications of Nanotechnology: Medicine (Part 1)*. 1–10 (2007).
49. Wilczewska, A., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. & Car, H. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Rep* 1020–1037 (2012).
50. Mansour, H. M. & Bawa, R. Design and Development of Approved Nanopharmaceutical Products. *Handbook of Clinic Nanomed - From Bench to Bedside* 1–33 (Pan Stanford Publishing Pte Ltd, 2015).
51. Kamaly, N. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chem Soc Rev* 41, 2971–3010 (2012).
52. Wang, M. & Thanou, M. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacol Res* 62, 90–99 (2010).
53. Wei, L. *et al.* Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discov Today* 1–7 (2015).
54. Conniot, J. *et al.* Cancer immunotherapy: nanodelivery approaches for immune cell targeting and tracking. *Front Chem* 2, 1–27 (2014).
55. Guo, S. & Huang, L. Nanoparticles containing insoluble drug for cancer therapy. *Biotechnol Adv* 32, 778–788 (2014).
56. Stathopoulos, G. P. & Boulikas, T. Lipoplatin Formulation Review Article. *Journ Drug Deliv* 2012, 1–10 (2012).
57. Omlor, A., Nguyen, J., Bals, R. & Dinh, Q. Nanotechnology in respiratory medicine. *Respir Res* 16, 1–9 (2015).
58. Ghaz-Jahanian, M., Abbaspour-Aghdam, F., Anarjan, N., Berenjian, A. & Jafarizadeh-Malmiri, H. Application of Chitosan-Based Nanocarriers in Tumor-Targeted Drug Delivery. *Mol Biotechnol* 57, 201–218 (2014).
59. Acker, D. B. *Manual Merck de informação médica - Edição ampliada e actualizada*. (Oceano, 2008).
60. Mohanraj, V. & Chen, Y. Nanoparticles – A Review. *Trop Journ Pharmac Res* 5, 561–573 (2006).
61. Muralidharan, P., Malapit, M., Mallory, E., Hayes, D. & Mansour, H. Inhalable Nanoparticulate Powders for Respiratory Delivery. *Nanomedicine Nanotechnol, Biol Med*. 11, 1189–1199 (2015).

62. Taylor, G. & Kellaway, I. Pulmonary Drug Delivery. *Drug Delivery and Targeting - For pharmacists and pharmaceutical scientists* 244–272 (Taylor & Francis, 2001).
63. Grenha, A., Seijo, B. & Remuñán-López, C. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *Eur Journ Pharm Sci* 25, 427–437 (2005).
64. Paranjpe, M. & Müller-goymann, C. C. Nanoparticle-Mediated Pulmonary Drug Delivery: A Review. *Int Journ Mol Sci* 15, 5852–5873 (2014).
65. Zarogoulidis, P. *et al.* Inhaled chemotherapy in lung cancer: future concept of nanomedicine. *Intern Journ of Nanomed* 1551–1572 (2012).
66. Patlak, M. Nanotechnology Takes a New Look at Old Drugs. *Oxford Journ* 102, 1753–1755 (2010).
67. Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V. & Huwyler, J. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *Journ Control Release* 200, 138–157 (2014).
68. Prabhu, R., Patravale, V. & Joshi, M. Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights. *Intern Journ of Nanomed* 10, 1001–1018 (2015).
69. Pérez-herrero, E. & Fernández-medarde, A. Advanced Targeted Therapies in Cancer: Drug Nanocarriers, the future of Chemotherapy. *Eur Journ Pharm Biopharm* (2015).
70. Griffiths, G., Nyström, B. & Khuller, S. Nanobead-based interventions for the treatment and prevention of tuberculosis. *Nature Rev Microb* 827–834 (2010).
71. Callari, M., Aldrich-wright, J. R., Souza, P. L. De & Stenzel, M. H. Polymers with platinum drugs and other macromolecular metal complexes for cancer treatment. *Prog Polym Sci* 39, 1614–1643 (2014).
72. Xu, X., Ho, W., Zhang, X., Bertrand, N. & Farokhzad, O. Cancer nanomedicine: from targeted delivery to combination therapy. *Trends Mol Med* 1–10 (2015).
73. Hu, C. J. *et al.* Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. *PNAS* 108, 10980–10985 (2011).
74. Sadat, F. *et al.* PLGA-Based Nanoparticles as Cancer Drug Delivery Systems. *Asian Pac Journ Cancer Prev* 15, 517–535 (2014).
75. Jawahar, N. & SN, M. Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting: A comprehensive review. *Int Journ Heal. Allied Sci* 1, 217–223 (2012).
76. Ganesh, S., Iyer, A., Morrissey, D. & Amiji, M. Hyaluronic acid based self-assembling nanosystems for CD44 target mediated siRNA delivery to solid tumors. *Biomater* 34, 3489–3502 (2013).

77. Nair, L. S. & Laurencin, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci* 32, 762–798 (2007).
78. Ganesh, S., Iyer, A., Weiler, J., Morrissey, D. & Amiji, M. Combination of siRNA-directed Gene Silencing With Cisplatin Reverses Drug Resistance in Human Non-small Cell Lung Cancer. *Mol Ther - Nucleic Acids* 2, 1–110 (2013).
79. Lv, S. *et al.* Doxorubicin-loaded amphiphilic polypeptide-based nanoparticles as an efficient drug delivery system for cancer therapy. *Acta Biomater* 9, 9330–9342 (2013).
80. Dash, T. K. & Konkimalla, V. B. Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *Journ Control Release* 158, 15–33 (2012).
81. Gao, H., Zhang, Q., Yang, Y., Jiang, X. & He, Q. Tumor homing cell penetrating peptide decorated nanoparticles used for enhancing tumor targeting delivery and therapy. *Intern Journ of Pharm* 478, 240–250 (2014).
82. Rocca, J. Della, Huxford, R. C., Comstock-duggan, E. & Lin, W. Polysilsesquioxane Nanoparticles for Targeted Platin-Based Cancer Chemotherapy by Triggered Release. *Angew Chem Int Ed* 50, 10330–10334 (2011).
83. Rocca, J. Della *et al.* Polysilsesquioxane nanoparticles for triggered release of cisplatin and effective cancer chemoradiotherapy. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol, Med* 11, 31–38 (2015).
84. Prabakaran, M. Chitosan-based nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. *Int Journ Biol Macromol* 72, 1313–1322 (2014).
85. Garg, N. K., Dwivedi, P., Campbell, C. & Tyagi, R. K. Site specific/targeted delivery of gemcitabine through anisamide anchored chitosan/polyethyleneglycol nanoparticles: An improved understanding of lung cancer therapeutic intervention. *Eur Journ Pharm Sci* 47, 1006–1014 (2012).
86. Torrecilla, D. *et al.* Anti-tumor efficacy of chitosan-g-poly(ethylene glycol) nanocapsules containing docetaxel: Anti-TMEFF-2 functionalized nanocapsules vs. non-functionalized nanocapsules. *Eur Journ Pharm Biopharm* 83, 330–337 (2012).
87. Maya, S. *et al.* Chitosan cross-linked docetaxel loaded EGF receptor targeted nanoparticles for lung cancer cells. *Int Journ Biol Macromol* 69, 532–541 (2014).
88. Nascimento, A. V. *et al.* Mad2 Checkpoint Gene Silencing Using Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Chitosan Nanoparticles in Non-Small Cell Lung Cancer Model. *Mol Pharm* 11, 3515–327 (2014).
89. Sukumar, U. K. *et al.* Emerging Applications of Nanoparticles for Lung Cancer Diagnosis and Therapy. *Int Nano Lett* 3, 1–17 (2013).

90. Bala, I., Hariharan, S. & Kumar, M. N. V. R. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. *Crit Rev Ther Drug Carr Syst* 21, 387–422 (2004).
91. Mousa, S. A. *et al.* Tetraiodothyroacetic acid and its nanoformulation inhibit thyroid hormone stimulation of non-small cell lung cancer cells in vitro and its growth in xenografts. *Lung Canc* 76, 39–45 (2011).
92. Dong, M. *et al.* Tissue slice model of human lung cancer to investigate telomerase inhibition by nanoparticle delivery of antisense 2'-O-methyl-RNA. *Int Journ Pharm* 419, 33–42 (2011).
93. Karra, N. *et al.* Antibody Conjugated PLGA Nanoparticles for Targeted Delivery of Paclitaxel Palmitate: Efficacy and Biofate in a Lung Cancer Mouse Model. *Nan micr small* 9, 4221–4236 (2013).
94. Das, J. *et al.* Assessment of drug delivery and anticancer potentials of nanoparticles-loaded siRNA targeting STAT3 in lung cancer, in vitro and in vivo. *Toxicol Lett* 225, 454–466 (2014).
95. Guo, Y., Wang, L., Lv, P. & Zhang, P. Transferrin-conjugated doxorubicin-loaded lipid-coated nanoparticles for the targeting and therapy of lung cancer. *Oncol Lett* 9, 1065–1072 (2014).
96. Sun, Y. *et al.* Enhanced antitumor efficacy of vitamin E TPGS-emulsified PLGA nanoparticles for delivery of paclitaxel. *Colloids Surf B Bioint* 123, 716–723 (2014).
97. Mahapatro, A. & Singh, D. K. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *Journ of Nanobiotech* 9, 55 (2011).
98. Jung, J. *et al.* Polymeric Nanoparticles Containing Taxanes Enhance Chemoradiotherapeutic Efficacy in Non-small Cell Lung Cancer. *Int Journ Radiat Oncol Biol Phys* 84, e77–e83 (2012).
99. Shen, S. *et al.* Cationic Lipid-Assisted Polymeric Nanoparticle Mediated GATA2 siRNA Delivery for Synthetic Lethal Therapy of KRAS Mutant Non- Small-Cell Lung Carcinoma. *Mol Pharm* 11, 2612–2622 (2014).
100. Natale, B. *et al.* Clinical activity of BIND-014 (docetaxel nanoparticles for injectable suspension) as second-line therapy in patients with Stage III/IV non-small cell lung cancer. in *26th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets & Cancer Therapeutics* 1 (2014).
101. Fülöp, Z., Kurkov, S. V., Nielsen, T. T., Larsen, K. L. & Loftsson, T. Self-assembly of cyclodextrins: Formation of cyclodextrin polymer based nanoparticles. *Journ Drug Del Sci Tech* 22, 215–221 (2012).
102. Rink, J., Plebanek, M., Tripathy, S. & Thaxton, C. Update on Current and Potential Nanoparticle Cancer Therapies. *Curr Opin Oncol* 25, 997–1003 (2013).

103. Zuckerman, J. E. *et al.* Correlating animal and human phase Ia/Ib clinical data with CALAA-01, a targeted, polymer-based nanoparticle containing siRNA. *Proc Nat Acad Sci* 111, 1411393111– (2014).
104. EMA. *Resumo das Características do Medicamento*. 1–29 (2010).
105. Wang, Z., Liu, G., Zheng, H. & Chen, X. Rigid nanoparticle-based delivery of anti-cancer siRNA: Challenges and opportunities. *Biotech Adv* 32, 831–843 (2013).

8. ANEXOS

Anexo I – Quadro dos ligandos e biomarcadores mais comuns para o transporte tumoral dirigido. [Adaptado de (105)].

| Ligandos | Biomarcadores vetorizado | Expressão nos tecidos cancerígenos humanos (% do carcinoma primário que sobre expressa o biomarcador) | Linhas celulares com elevada expressão de biomarcadores |
|--|--------------------------|--|---|
| Folato | Recetor do folato | Tumores sólidos: cancro do ovário (100%), cancro renal (86%), cancro da mama (43%), cancro do pulmão (36%), cancro do cérebro (25%), cancro do pâncreas (10%). | A2780, KB, SKOV-3, OVCAR-3, L1210, M109, HeLa. |
| Anti-EGFR, Necitumumab, péptido GE 11 | EGFR | Tumores sólidos: cancro da cabeça e pescoço (80-100%), cancro da mama (14-91%), cancro coloretal (25-80%), cancro do pulmão de não-pequenas células (40-80%), glioma (40-80%), cancro do ovário (35-70%), cancro da bexiga (31-72%). | MDA-MB-231, A431, HTC-116, DU-145, HuH7, 32D. |
| Trastuzumab, Herceptina, anti-HER2 | HER | Tumores sólidos: cancro coloretal (26-90%), glioma (20-54%), cancro do estômago (38-45%), cancro do pulmão de não-pequenas células (18-37%), cancro da mama (25-30%), cancro da bexiga (9-36%), cancro do ovário (10-15%). | SKBR3, MGC803, SKOV3, BT-474. |
| Transferrina | Recetor da transferrina | Tumores sólidos: cancro renal, cancro do ovário, cancro do cólon, cancro da mama, cancro do estômago, cancro do pulmão. | A2780, OVCAR-3, HEY, U251, HepG2. |
| Anti-VEGF, Bevacizumab | VEGF | Células endoteliais tumorais: células epiteliais da vasculatura tumoral | HUVEC, HepG2, PC-3 |