



Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Nanomedicina na terapêutica do cancro colo-retal:
A aplicação de lipossomas.**

Dissertação para obtenção do grau de mestre em
Ciências Farmacêuticas

Patrícia Isabel Realinho dos Santos

Trabalho efetuado sob a orientação de Prof. Doutora Ana Grenha

Faro, Setembro de 2015



Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Nanomedicina na terapêutica do cancro colo-retal:
A aplicação de lipossomas.**

Dissertação para obtenção do grau de mestre em
Ciências Farmacêuticas

Patrícia Isabel Realinho dos Santos

Trabalho efetuado sob a orientação de Prof. Doutora Ana Grenha

Faro, Setembro de 2015

Nanomedicina na terapêutica do cancro colo-retal: A aplicação de lipossomas.

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.

Copyright© Patrícia Isabel Realinho dos Santos

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.

Dedicatória

À avó Inês,
A minha heroína.

Agradecimentos

Para que esta dissertação pudesse chegar ao seu término, muitas pessoas contribuíram com o seu saber e experiência. Assim sendo, cumpre-me muito humildemente agradecer todo o seu apoio.

Em primeiro lugar, quero agradecer à professora Doutora Ana Grenha, minha orientadora, pela disponibilidade e auxílio durante a execução do presente trabalho, permitindo que esta dissertação atingisse os seus objetivos.

E, porque esta dissertação resulta no culminar de um marco da minha vida, que é a conclusão do mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas, faço um profundo agradecimento:

Aos meus pais, por todo o amor, esforço, orgulho e confiança que sempre depositaram em mim, por acreditarem nas minhas capacidades e me permitirem concretizar o sonho de ser farmacêutica, pois sem eles nada disto teria sido possível.

Ao João, pelo apoio imprescindível e por ter estado ao meu lado ao longo de todo este percurso, tornando-o muito mais fácil.

À minha avó Inês, fonte de motivação para a escolha deste tema, por ser o meu exemplo de coragem, persistência e bravura, por me ter ensinado a relativizar as coisas, a valorizar a vida e a nunca desistir.

Ao meu irmão André e à Alexandra, por todo o apoio prestado desde sempre e por toda a motivação e incentivo no decorrer da elaboração deste documento.

Às minhas companheiras Inês Voyce e Ana Alfaia, por terem estado presentes nos momentos mais felizes e mais difíceis destes cinco anos, como uma verdadeira família.

À Rita Marçalo e ao Carlos Gouveia, pela amizade e por serem o meu exemplo a seguir. Aos meus colegas João Guarino, Rúben Teixeira, Wilson Veterano, Daniela Peres, Isa Barros, Bruna Paulino, Rita Martins e Bárbara Gonçalves por todo o companheirismo.

À minha família, pelo carinho e interesse que sempre demonstraram.

A todos os meus amigos e colegas, que estiveram sempre presentes, pela amizade, alegria, incentivo e pelas memórias que guardo para sempre desta etapa da minha vida.

A todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, um muito obrigado.

Resumo

Ao longo dos anos tem-se verificado um aumento da ocorrência de cancro, não só devido ao crescimento e envelhecimento da população mas também ao aumento da prevalência de fatores de risco. Por isso, o cancro é considerado uma doença não só do presente, mas também do futuro (1,2). Esta monografia foca-se no cancro colo-retal, o terceiro e segundo principal tipo de cancro diagnosticado em homens e mulheres, respetivamente, com cerca de 1,4 milhões de novos casos verificados em 2012, em todo o mundo (1). Posto isto, será feita uma análise das suas principais características, fatores predisponentes, mecanismos fisiológicos subjacentes e opções terapêuticas atualmente disponíveis.

Apesar dos recentes avanços na quimioterapia, as taxas de recidiva continuam a ser significativas e o cancro colo-retal continua a ser considerado umas das maiores causas de morbilidade e mortalidade (3). Sabe-se que um dos principais problemas associados à terapêutica anticancerígena são os efeitos adversos associados aos citotóxicos e, por isso, é necessário encontrar novas opções terapêuticas que visem uma maior segurança e efetividade da terapia.

A nanomedicina consiste na aplicação médica da nanotecnologia na prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças e a sua utilização tem-se revelado promissora na otimização da distribuição do fármaco, permitindo uma libertação direcionada ao tecido tumoral com minimização da toxicidade em tecidos normais (4,5). Nesse sentido, serão abordadas as estratégias de aplicação de formulações de nanomedicamentos, nomeadamente lipossomais, no tratamento do cancro colo-retal.

Ao longo das últimas décadas os lipossomas tornaram-se um ponto focal no desenvolvimento de sistemas de libertação de fármacos (6). Novas e inovadoras formulações lipossomais têm fornecido evidências da sua relevância no tratamento mais seguro e eficaz de doenças oncológicas e, por isso, esta revisão centra-se no estado atual da libertação de fármacos anticancerígenos, mediada por lipossomas, com especial foco na terapêutica do cancro colo-retal.

Palavras-chave: Nanomedicina, oncologia, cancro colo-retal, lipossomas.

Abstract

Along the years the occurrence of cancer has increased, not only because of the growth and aging of the population, but also because of the increase in the prevalence of risk factors. This is why cancer is currently considered a disease not just from present but also of future (1,2).

This thesis focuses colorectal cancer, the third and second most frequent type of cancer diagnosed in men and women, respectively, with about 1.4 million new cases recorded worldwide in 2012 (1). An analysis of the main features and predisposing factors is provided, underlying physiological mechanisms and therapeutic options currently available.

Despite recent advances on chemotherapy, relapse rates continue to be significant and, therefore, colorectal cancer continues to be considered one of the greatest causes of morbidity and mortality (3). It is known that one of the main problems associated with anticancer therapy are adverse effects associated with anticancer drugs and, therefore, it is necessary to find new therapeutic options aimed at greater safety and effectiveness of therapy.

Nanomedicine constitutes medical application of nanotechnology in the prevention, diagnosis and treatment of diseases and its use has proved promising in drug delivery optimization, allowing a targeted delivery to tumor tissue to minimize toxicity in normal tissues (4,5). Accordingly, the implementation of strategies of nanodrug formulation, including liposomal approaches, for the treatment of colorectal cancer will be discussed.

Over the past decades liposomes have become a focal point in the development of drug delivery systems (6). New and innovative liposomal formulations have provided evidence of their relevance in the safest and most effective treatment of cancer. Therefore, this review will focus on the current state of the release of anticancer drugs mediated by liposomes, with special focus on therapy of colorectal cancer.

Key-words: Nanomedicine, oncology, colorectal cancer, liposomes.

Índice geral

Dedicatória.....	iii
Agradecimentos.....	iv
Resumo	v
<i>Abstract</i>	vi
Índice geral.....	vii
Índice de figuras	ix
Índice de tabelas.....	xi
Lista de anexos.....	xii
Lista de siglas	xiii
Capítulo 1 Enquadramento	1
1.1. Introdução	1
1.2. Metodologia	2
Capítulo 2 Cancro colo-retal	4
2.1. Epidemiologia	5
2.2. Fisiopatologia.....	7
2.3. Fatores de risco	14
2.3.1. História hereditária e familiar	14
2.3.2. História clínica pessoal	16
2.3.3. Fatores de risco comportamentais.....	16
2.5. Sinais e sintomas	17
2.6. Diagnóstico	18
2.7. Classificação da doença	20
2.8. Terapêutica convencional.....	21
2.8.1. Antimetabolitos	24
2.8.2. Camptotecinas	25

2.8.3. Análogos da platina	25
2.8.4. Anticorpos monoclonais.....	25
2.8.5. Outros fármacos	27
Capítulo 3 Nanomedicina	29
3.1. Aplicação da nanomedicina em oncologia.....	30
3.2. Nanossistemas aplicados à medicina	33
3.2.1. Lipossomas aplicados na terapêutica do cancro colo-retal	33
3.2.1.1. Lipossomas vetorizados passivamente	38
3.2.1.2. Lipossomas vetorizados ativamente	44
3.2.1.3. Lipossomas com propriedades especiais.....	48
Capítulo 4 Aplicação clínica de lipossomas na terapêutica do cancro colo-retal.....	53
Doxil [®]	53
ThermoDox [®]	54
IHL-305	55
LE-SN38	56
CPX-1	58
Lipoxal [™] e Lipoplatin [™]	60
Aroplatin [™]	60
Capítulo 5 Conclusões e recomendações.....	64
Bibliografia	66
Anexo A	78
Anexo B.....	79

Índice de figuras

Figura 2.1 - Alterações em células normais que podem conduzir a células cancerígenas. Adaptado de National Cancer Institute (2014) (16).	5
Figura 2.2 - Taxas de incidência de CCR por sexo e área mundial. Adaptado de Torre, L. A. et al. (2012) (1)	6
Figura 2.3 - Sistema digestivo. Adaptado de VanPutte et al. (2014) (18)	7
Figura 2.4 - Anatomia do sistema digestivo inferior. Adaptado de National Cancer Institute (2013) (20)	9
Figura 2.5 – Processo de metastização. Adaptado de American Cancer Society (2014) (22)	11
Figura 2.6 - Sequência clássica adenoma-carcinoma. Adaptado de Hobbs et al. (2011) (8)	12
Figura 2.7 - Sequência de neoplasia serrilhada. Adaptado de Hobbs et al. (2011) (8) .	13
Figura 2.8 – Risco oncológico em CCR sem polipose. Adaptado de Hobbs et al. (2011) (8)	15
Figura 2.9 - Localização e aparência de dois exemplos de tumores colo-retais. Adaptado de Blausen Medical Communications, Inc. (2013) (36).....	18
Figura 2.10 - Localização de cancro no intestino e alcance comum do rastreio por sigmoidoscopia flexível. Adaptado de Hobbs et al. (2011) (8).....	19
Figura 2.11 - Esquematização do processo de colonoscopia. Adaptado de National Cancer Institute (2015) (37)	19
Figura 2.12 - Estadiamento da doença segundo TNM. Adaptado de National Cancer Institute (2015) (19)	21
Figura 3.1 - Figura ilustrativa das nanoestruturas utilizadas na nanomedicine e do seu tamanho relativizado. Adaptado de <i>British Society for Nanomedicin</i> (2015) (53).....	29
Figura 3.2 - Aplicações médicas da nanotecnologia. Adaptado de Malsch I, Emond C (2014) (50).	30
Figura 3.3 - Esquematização do efeito de permeabilidade e retenção (EPR). Adaptado de Noble et.al. (2014) (54)	31
Figura 3.4 - Vetorização passiva versus vetorização ativa de nanossistemas. Adaptado de Domb et al. (2014) (58)	32

Figura 3.5 - Ilustração esquemática dos principais tipos de lipossomas. Adaptado de Zhang et al. (2013) (6)	36
Figura 3.6 - Alterações aplicadas a lipossomas para otimizar a sua função como sistemas de libertação de fármacos. Adaptado de Noble et al. (2014) (54)	37
Figura 3.7 - Esquematização da constituição de um lipossoma "stealth". Adaptado de Surface engineering of liposomes for stealth behavior (2013) (76)	39
Figura 3.8 - Fatores críticos nos lipossomas que afetam o efeito biológico e o resultado terapêutico. Adaptado de Noble et al. (2014) (54)	51

Índice de tabelas

Tabelas

Tabela 2.1 - Oncogenes e genes supressores tumorais frequentemente envolvidos no CCR esporádico. Adaptado de Hobbs et al. (2011) (8)	10
Tabela 2.2 - Fatores de risco <i>versus</i> medidas preventivas no cancro colo-retal. Adaptado de <i>American Cancer Society</i> (2014) (17, 29, 30, 31-34)	17
Tabela 2.3- Resumo das opções terapêuticas no CCR. Adaptado de Hobbs et al. (2011) (8)	22
Tabela 2.4- Principais efeitos secundários da quimioterapia (17,39).	23
Tabela 2.5 - Principais fármacos utilizados na quimioterapia do CCR (8,41,42,46)	28
Tabela 3.1 - Vantagens e desvantagens da utilização de lipossomas (60,65-67)	35
Tabela 3.2 - Vantagens da utilização de lipossomas vetorizados passivamente (11,54,60,71-75)	40
Tabela 4.1 - Lipossomas em aplicação clínica na terapêutica do CCR.....	62

Lista de anexos

Anexos

Anexo A Tipos de mutações genéticas e alterações epigenéticas no cancro.

Tabela A - Tipos de mutações genéticas e alterações epigenéticas no cancro. Adaptado de Hobbs et al. (2011) (8) 75

Anexo B Esquematização de protocolos de quimioterapia aplicados ao cancro colo-retal

Tabela B - Protocolos de quimioterapia a aplicar no cancro colo-retal. Adaptado de Kuehr et al. (2013) (144) 76

Lista de siglas

5-FU	5-fluorouracilo
Ac	Anticorpo
ACm	Anticorpo monoclonal
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
APC	Adenomatous polyposis coli
CCR	Cancro colo-retal
CCRm	Cancro colo-retal metastático
CPT-11	Irinotecano
CR	Colo-retal
CTX	Cetuximab
DMT	Dose máxima tolerada
DSFE-PEG	Distearoil de fosfatidiletanolamina-N-poliétilenoglicol
DSGFC	1,2-disteroilglicerofosfolina
DSPE	Distearoilglicerofosfoetanolamina
DSPE-PEG	1,2-distearoilglicerofosfoetanolamina-poliétilenoglicol
Dx	Doxorrubicina
EGFR/HER	Receptor do fator de crescimento epidermal
EMA	<i>European medicines agency</i>
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção
Et al.	E outros (Et aliae)
FAP	Polipose familiar adenomatosa
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOLFIRI	5-fluorouracilo, leucovorina e irinotecano
FOLFOX	5-fluorouracilo, leucovorina e oxaliplatina
Ig	Imunoglobulina
IP	Intraperitoneal
IUV	Lipossomas unilamelares intermédios
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>

LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
L-NDPP	Lipossoma de neodecanoatodiaminociclohexano de platina
LP	Lipossomas
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MLH	<i>Mutlhomolog 1</i>
MMR	<i>Genes mismatch repair</i>
nm	Nanómetro
NP	Nanopartículas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PEG	Polietilenoglicol
PFS	Sobrevivência livre de progressão
Pgp	Glicoproteína- P
PTX	Paclitaxel
RFA	Radiofrequência de ablação
RNA	Ácido ribonucleico
siRNA	Small interfering RNA
SRE	Sistema reticuloendotelial
SUV	Lipossomas unilamelares pequenos
Tf	Tranferrina
TfR	Receptor da transferrina
TGF- β	<i>Transforming growth factor-beta</i>
TP	Proteína tumoral
TS	Timidilato sintase
TSLs	Lipossomas termosensíveis
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular
WT	<i>Wild-type</i>

Capítulo 1

Enquadramento

1.1. Introdução

O cancro colo-retal (CCR) é a terceira principal causa de cancro diagnosticada nos Estados Unidos da América (EUA) e, conseqüentemente, a *American Cancer Society's* estima que, em 2015, nos EUA se alcancem 93090 novos casos de cancro do cólon e 39,610 novos casos de cancro retal. Atualmente o risco de desenvolver esta doença atinge o valor de cerca de 5%, nos EUA, quando combinados ambos os sexos, o CCR surge como a segunda causa de morte causada por cancro e, como tal, em 2015 esperam-se cerca de 49700 óbitos causados por esta patologia (7).

Em semelhança com os tumores sólidos, a incidência do CCR aumenta com a idade, à exceção do CCR familiar e, em muitas regiões do mundo, verifica-se um aumento da incidência com diminuição das taxas de mortalidade (8). A taxa de mortalidade por CCR, isto é, o número de óbitos por 100000 habitantes, por ano causados pela doença tem vindo a descrever nos últimos 20 anos (7). Ainda assim, representa cerca de 8% do total de mortes causadas por cancro (8). A razão para este decréscimo deve-se essencialmente ao rastreio, sendo que os pólipos têm sido detetados e removidos previamente ao seu desenvolvimento em cancro. Além disso, o rastreio tem permitido que um maior número de casos sejam detetados mais cedo, o que permite a sua cura mais facilmente (7).

Ainda assim, a cirurgia e a radioterapia têm sido os principais procedimentos no tratamento da patologia oncológica, com a cirurgia a continuar a desempenhar o principal papel na sobrevivência em casos de estados iniciais, pela remoção do tumor detetável. No entanto, micrometástases residuais podem causar uma reincidência (10). A ressecção radical é curativa para apenas cerca de 50% dos pacientes, enquanto para a maioria dos pacientes com estados avançados ou doenças metastatizada ou ainda para aqueles que não podem ser tratados com a ressecção radical, a quimioterapia mantém-se a principal alternativa terapêutica (11).

Ao longo dos anos, os progressos no tratamento do cancro têm sido lentos mas constantes, sendo que o tratamento para o CCR tem sido melhorado ao longo dos últimos anos, e graças a isso existem atualmente mais de 1 milhão de sobreviventes ao CCR nos EUA (7,9). Verifica-se que a taxa de sobrevivência dos pacientes com CCR metastizado é

significativamente aumentada com a aplicação de fármacos direcionados a alvos moleculares, tal como a oxaliplatina e, nesse sentido, a nanotecnologia tem-se relevado promissora na deteção, estadiamento e tratamento do cancro (11,12).

Pelo facto de o CCR se tratar um tipo de cancro com grande prevalência, tanto a nível mundial, europeu como nacional, responsável por mais de 9% de toda a incidência de cancro, com taxas de mortalidade e morbilidade elevadas importa analisar as investigações realizadas nesta área, com o objetivo de encontrar novas soluções terapêuticas tendo em vista o aumento da eficácia terapêutica e diminuir os seus efeitos tóxicos prejudiciais à recuperação do indivíduo (13).

Nesse sentido, esta dissertação tem como principal objetivo descrever as formulações lipossomais utilizadas na terapêutica do cancro colo-retal, abordando as suas características, descrevendo as suas vantagens e desvantagens e expondo os resultados obtidos na sua aplicação como transportadores de fármacos anticancerígenos.

1.2. Metodologia

Esta dissertação de mestrado consiste numa análise qualitativa cujas técnicas de recolha de dados se baseiam na análise de documentos com vista a encontrar resposta à pergunta de partida colocada, ou seja, quais as aplicações da nanomedicina, nomeadamente os lipossomas, na terapêutica do cancro colo-retal.

A investigação documental, isto é, a revisão da literatura, consistiu na análise de estudos e trabalhos disponibilizados com o objetivo de esclarecer o tema, definindo-o com maior precisão. A pesquisa para esta dissertação incluiu não só livros da área, mas também bases de dados que permitiram aceder a revistas e artigos científicos, nomeadamente, PubMed, B-On, Web of Knowledge, entre outras. Os termos utilizados na pesquisa foram: lipossomas, nanomedicina, nanotecnologia e nanossistemas associados ao cancro colo-retal. Além disso foram consultados organismos governamentais com vista a completar a informação com dados relevantes.

A pertinência do objeto de estudo prende-se com o facto de ser um tópico atual, relevante para a comunidade científica e bastante abordado, com vários trabalhos recentemente publicados, sendo, por isso, necessária uma constante renovação de conhecimento nesta área. Assim sendo, com esta dissertação pretende-se apresentar conclusões relevantes sobre o tema, através da citação de estudos desenvolvidos pelos mais

diversos autores ao longo do tempo com uma apresentação lógica e estruturada da investigação mais relevante sobre a temática, com vista a identificar o estado do conhecimento sobre o tema, os seus investigadores, variáveis e resultados já existentes.

Capítulo 2

Cancro colo-retal

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) o cancro caracteriza-se pelo crescimento descontrolado e conseqüente disseminação de célula que pode afetar quase todo o corpo. Este crescimento pode invadir os tecidos adjacentes e metastizar para locais distantes. Muitos dos cancros podem ser prevenidos evitando a exposição a fatores de risco comuns, tais como, por exemplo, o fumo de tabaco. O tratamento da patologia oncológica envolve muitas vezes a cirurgia, radioterapia e quimioterapia, especialmente quando a deteção é precoce (14).

Por sua vez, o tumor diz respeito a uma massa de tecido anormal que resulta da divisão de células irregular, quer por divisão superior ao normal ou por morte inferior à situação não patológica. Os tumores, também denominados neoplasmas, podem ser benignos ou malignos, sendo que os últimos, por metastizarem, são considerados cancros (15).

Devido ao seu crescimento descontrolado e menos especializado é possível que estas células se tornem invasivas, ignorando sinais que normalmente as fariam diminuir a sua divisão ou iniciar processos de morte programada. Além disso, estas células têm a capacidade de influenciar outras células, moléculas e vasos sanguíneos que circundam o tumor, o microambiente. Nesse sentido, as células cancerígenas podem originar a neogénese de tecidos, isto é, induzir a formação de vasos sanguíneos essenciais para suprimir o tumor com oxigénio e nutrientes, necessários para o seu crescimento, assim como remover resíduos que poderiam ser prejudiciais. Além disso, as células cancerígenas podem ter a capacidade de se esconder e até invadir o sistema imunitário, conectando órgãos, tecidos e células especializadas na proteção do organismo de infeções e outras condições (16).

Tal como se pode observar na figura 2.1, a carcinogénese consiste na transformação progressiva e gradual de uma célula normal numa célula cancerígena maligna. Pelo facto de o cancro ser causado por alterações em genes que controlam a função das células, nomeadamente o seu crescimento e divisão, o cancro pode ser considerada uma doença genética. Os passos deste processo são representados por mutações genéticas ou alterações epigenéticas responsáveis pela ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores

tumorais, as quais podem ter origem em causas hereditárias ou podem ser ocasionadas por erros (8,16).

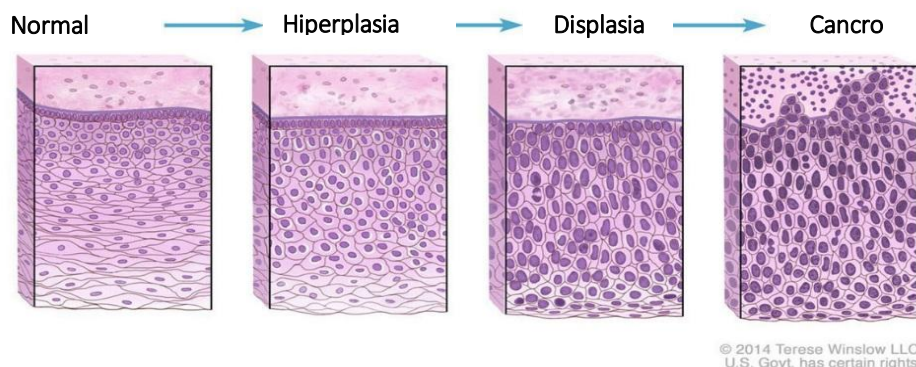


Figura 2.1 - Alterações em células normais que podem conduzir a células cancerígenas. Adaptado de *National Cancer Institute* (2014) (16).

2.1. Epidemiologia

A incidência e taxa de mortes por CCR aumenta com a idade e é mais frequente nos homens. Cerca de 90% dos novos casos e 93% das mortes ocorrem em população com idade superior a 50 anos e as taxas de incidência são cerca de 35% superiores no sexo masculino. Apesar da razão para estas diferenças ainda não ter sido totalmente esclarecida, parece refletir as diferenças na exposição a hormonas e outros fatores de risco (17).

A incidência de cancro do colon é, de forma uniforme, mais elevada do que de cancro retal, tanto em homens como em mulheres (8). Relativamente às diferenças demográficas verificam-se taxas de incidência mais elevadas na Austrália/Nova Zelândia, Europa e América do Norte, sendo que as taxas mais baixas se verificam na África e Ásia tal como se pode verificar na figura 2.2 (1).

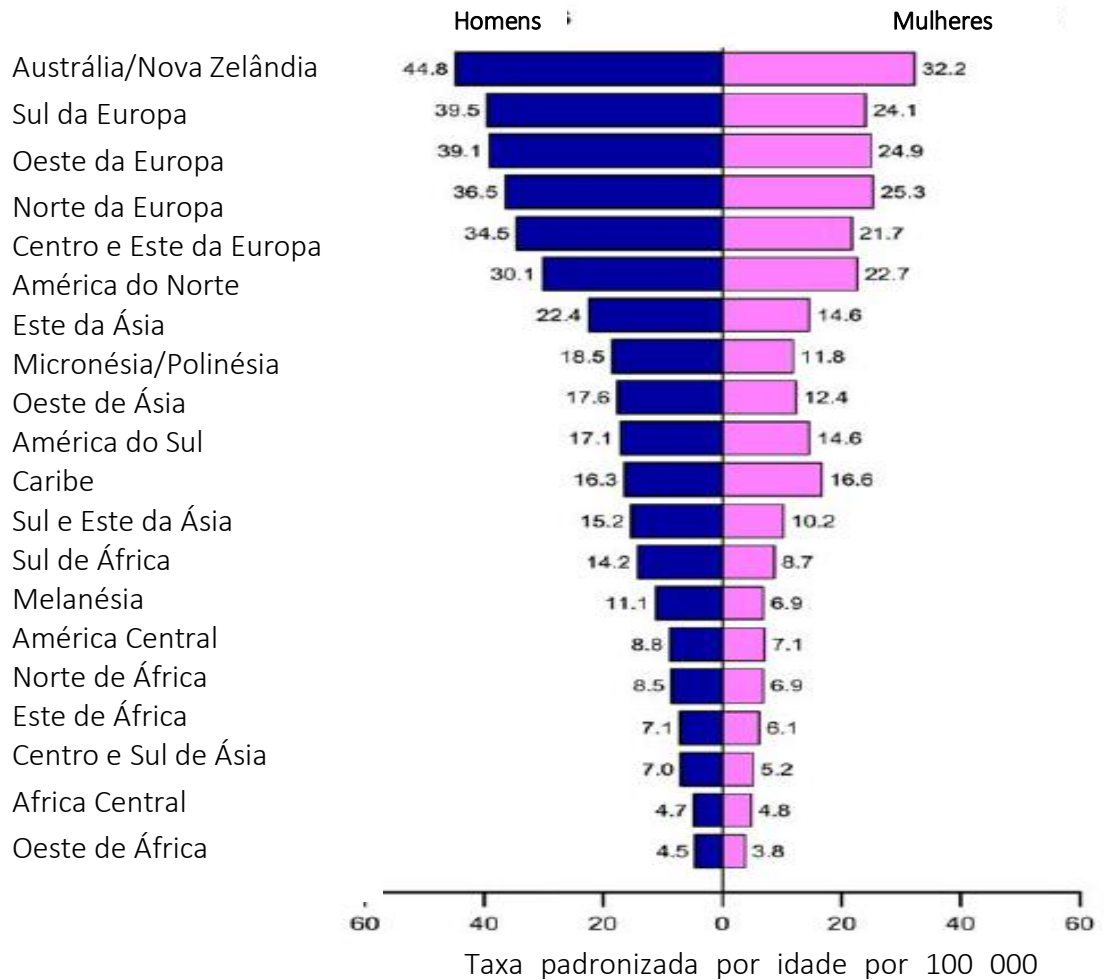


Figura 2.2- Taxas de incidência de CCR por sexo e área mundial. Adaptado de Torre, L. A. *et al* (2012) (1).

Verifica-se uma variação substancial na localização do tumor em função da idade, com aumentos significativos a partir dos 50 anos (7). As diferenças raciais e étnicas ocorrem não só entre etnias mas também dentro do próprio grupo racial. Estas apontam para um aumento na incidência do CCR em etnias africanas em detrimento das orientais, assim como o estudo em migrantes tem sugerido a influência de fatores ambientais como tendo um papel essencial na etiologia da doença (8).

A taxa de sobrevivência relativa a 1 e 5 anos para indivíduos com CCR é de 83.2% e 64.3%, respetivamente, com declínios para 57.6% nos 10 anos após o diagnóstico. Situações de deteção em estadio localizado apresentam taxas de sobrevivência relativa a 5 anos de 90.1%, no entanto, em situações em que há invasão com envolvimento de órgãos adjacentes

e nódulos linfáticos essa taxa é reduzida para 69.2%. O pior prognóstico surge para os casos em que há invasão de órgãos distantes, cuja taxa de sobrevivência diminui para os 11.7% (3).

2.2. Fisiopatologia

Para perceber de que forma se poderá atuar perante uma enfermidade, importa conhecer as alterações fisiopatológicas associadas à lesão.

Fisiologia

O sistema digestivo consiste no trato digestivo, um tubo extenso compreendido desde a boca até ao ânus e que está associado a órgãos acessórios, isto é, glândulas primárias com localização exterior ao trato digestivo que secretam fluídos para dentro deste. Tal como se pode observar na figura 2.3, o trato digestivo, também chamado de trato alimentar ou canal alimentar, inclui as seguintes regiões: cavidade oral, ou boca, com glândulas salivares e amígdalas como órgãos acessórios; faringe; esófago; estômago; intestino delgado, o qual inclui o duodeno, jejuno e íleo tendo como principais órgãos acessórios o fígado, vesícula biliar e pâncreas; intestino grosso, que inclui o ceco, cólon, reto, canal anal; e, ainda o ânus (18).

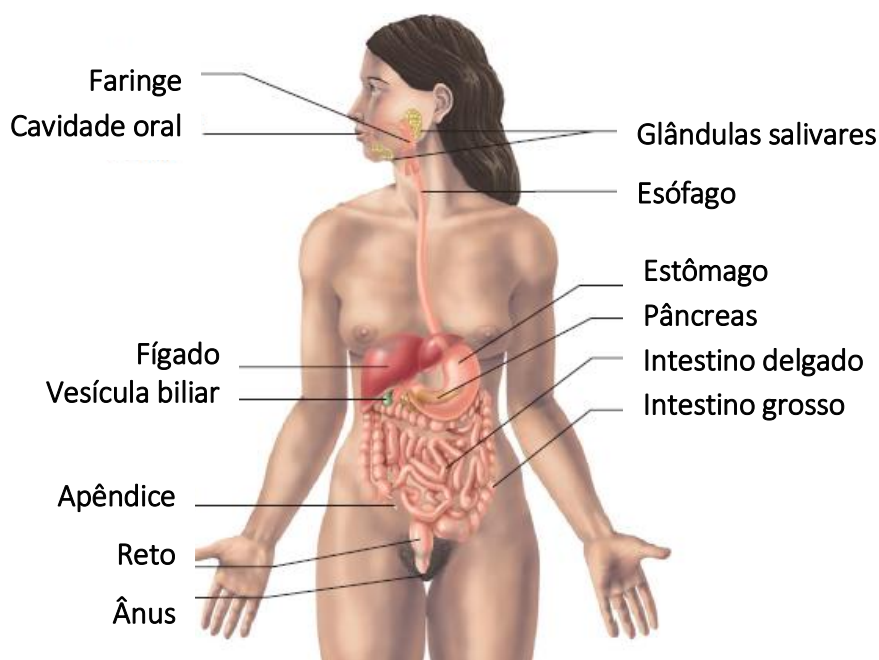


Figura 2.3 - Sistema digestivo. Adaptado de VanPutte et al. (2014) (18).

As funções do sistema digestivo incluem a ingestão e processamento dos alimentos para obtenção de energia. A propulsão, isto é, auxílio na deslocação do bolo alimentar ao longo do trato digestivo, com recurso à deglutição, peristaltismo, e movimento de massas permitem a mistura com secreções digestivas e, conseqüentemente, eliminação de resíduos sólidos (17,18). A digestão consiste na quebra de grandes moléculas orgânicas nos seus constituintes, graças a uma ação mecânica, por mistura dos alimentos, e uma componente química, realizada por enzimas digestivas secretadas ao longo do trato digestivo. Posteriormente ocorre absorção, isto é, passagem de moléculas para a circulação ou sistema linfático e, em função do tipo de molécula pode ocorrer difusão, difusão facilitada, transporte ativo, sinporte ou endocitose (18).

Por sua vez na eliminação há remoção dos produtos do organismo com absorção de água e sais, alterando-se o estado do material de liquefeito para semissólido. Estes resíduos semissólidos denominados de fezes são eliminados do trato digestivo pelo processo de defecação e o tempo total necessário para que o alimento percorra todo o trato digestivo é de cerca de 24 a 36 horas (18).

O cancro desenvolve-se com maior frequência no intestino grosso, onde se localizam o colón e o reto, e que é responsável pela absorção, armazenamento, mistura, propulsão e proteção (17,18). A primeira parte do intestino grosso e também a mais longa, corresponde ao cólon, um tubo muscular com cerca de 152.4 cm de comprimento (17). A metade proximal do cólon é responsável pela absorção de sais, água, e vitaminas produzidas pelas bactérias, enquanto a metade distal do cólon armazena as fezes (18). É graças aos movimentos do intestino grosso que as fezes são misturadas e propulsionadas em direção ao reto. O reto está localizado na pélvis e estende-se desde a mucosa anal até ao colón sigmóide, apresentando cerca de 10 a 15 cm e que correspondem à parte final do intestino grosso. O canal anal, isto é, a zona terminal do intestino grosso, finda no ânus, a extremidade que permite o contacto com a superfície exterior e a eliminação do produto fecal, tal como se pode observar na figura 2.4 (19). Ao longo deste percurso é produzido muco que lubrifica, permite o fluxo e protege contra a ação de ácidos produzidos pelas bactérias (18).

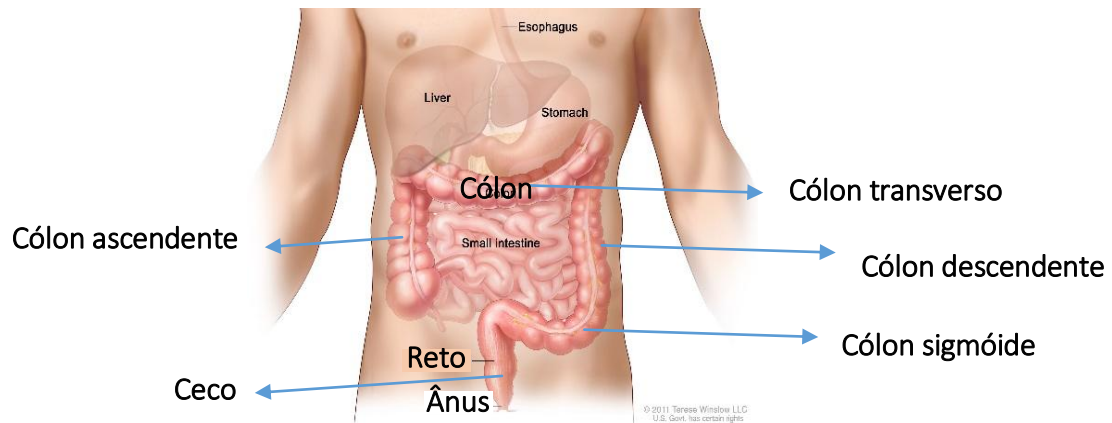


Figura 2.4 - Anatomia do sistema digestivo inferior. Adaptado de *National Cancer Institute* (2013) (20).

Patogénese

De uma forma geral, as células cancerígenas apresentam um maior número de alterações genéticas, tais como mutações do ácido desoxirribonucleico (ADN), sendo exemplificadas algumas das possíveis alterações ocorridas na tabela A do anexo A (16). As principais alterações genéticas que contribuem para o cancro afetam proto-oncogenes, genes supressores tumorais e genes reparadores do ADN (16). Os principais genes supressores tumorais, oncogenes e genes modificados envolvidos são resumidos na tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Oncogenes e genes supressores tumorais frequentemente envolvidos no CCR esporádico. Adaptado de Hobbs et al. (2011) (8).

Nome do gene	Tipo de gene cancerígeno	Frequência da mutação ou silenciamento epigenético	Consequências	Estado
APC	Supressor tumoral	~70%	Por inativação do gene ocorre ativação da via de sinalização WNT, proliferação e diferenciação do epitélio colo-retal	Adenoma inicial
<i>BRAF</i> , <i>KRAS</i>	Oncogene	~10%, ~35%	Ativação da via MAPK	Adenoma intermediário
<i>SMAD2</i> , <i>SMAD4</i> , <i>TGFBR2</i>	Supressor tumoral	~5%, ~10%, ~15%	Pela perda do cromossoma 18q, há diminuição da via de sinalização do TGF- β	Adenoma avançado
<i>TP53</i>	Supressor tumoral	~50%	Pela perda do cromossoma 17p aumenta o stress celular com prejuízo na resposta a danos de DNA	Adenocarcinoma
<i>MLH1</i>	Gene <i>mutator</i>	~10%	Afeta reparação de DNA defeituoso	Via alternativa de carcinogénese

Legenda: MAPK: *mitogenactivatedproteinkinase*; TGF- β : *transforminggrowthfactor-beta*; APC: *adenomatouspolyposiscoli*; KRAS: *Kirstenrat sarcoma viral oncogene homolog*; MLH1: *MutLHomolog 1*; TP53:proteína tumoral p53.

Os proto-oncogenes estão envolvidos no crescimento e divisão normal das células e quando alterados, podem tornar-se causadores de cancros, isto é, oncogenes. Por sua vez, os genes supressores de tumores estão envolvidos no controlo do crescimento e divisão celular conduzindo a uma divisão celular descontrolada, enquanto que os genes reparadores de DNA, quando mutados são incapazes de reparar o DNA alterado, desenvolvendo mutações adicionais noutros genes. Em conjunto, estas mutações podem ser a origem de células cancerígenas (8,16).

O processo de carcinogénese é iniciado por uma ou mais mutações ou alterações epigenéticas que conferem à célula um crescimento seletivo. O clone derivado da célula alterada expande-se levando a uma progressão maligna. O comportamento maligno ocorre

quando as células adquirem autonomia relativamente à sinalização de crescimento, insensibilidade a sinais inibidores de crescimento, mecanismos que lhes permitem evitar a apoptose, adotar potencial replicativo ilimitado, capacidade de angiogénese, invasão e aptidão parametastizar (8).

No processo de metastização, as células abandonam o local onde foram primariamente formadas, isto é, o tumor primário e atingem outras partes do organismo através do sangue e do sistema linfático, transformando-se num tumor metastático com características semelhantes às do tumor primário, tal como se pode observar na figura 2.5.

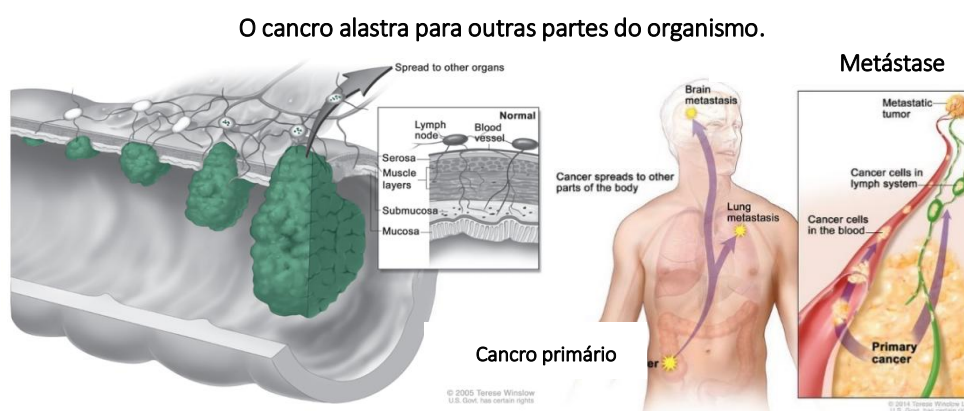


Figura 2.5 – Processo de metastização. Adaptado de *American Cancer Society* (2014) (21).

O sistema linfático permite a remoção de resíduos celulares e fluídos. Tipicamente, as células cancerígenas iniciam a sua proliferação nos nódulos linfáticos próximos podendo ainda ser transportadas pela corrente sanguínea até ao fígado e pulmões, alastrar na pélvis, cavidade abdominal, e alcançar outros órgãos e tecidos, tais como o peritoneu e os ovários (17).

Entenda-se por adenoma um tumor que não é considerado cancro, com início em células *gland-like* do tecido epitelial, uma pequena camada de tecido que cobre órgãos, glândulas e outras estruturas dentro do corpo. Os carcinomas têm origem em células epiteliais que ligam ou cobrem órgãos internos e é considerado o tipo de cancro mais comum (16). Segundo o *National Cancer Institute (NCI)*, o adenocarcinoma define-se como um cancro que tem início em células glandulares, isto é, células secretoras que se encontram em tecidos que revestem certos órgãos internos e que são responsáveis pela libertação de substâncias

no corpo, tais como muco, suco digestivo ou outros fluídos. A maioria dos cancros da mama, pâncreas, pulmão, próstata e cólon e reto inserem-se nesta classificação e estima-se que cerca de 96% dos CCR sejam adenocarcinomas (17,22).

Importa ter em conta que há evidências que demonstram que nem todos os adenomas experimentam transformações malignas, sendo que se estima que apenas 10% tenham a capacidade de progredir para cancro invasivo, sendo mais frequentes os adenomas que os carcinomas na população. E embora existam pacientes a padecer antes dos adenomas evoluírem para carcinomas, também há relatos de adenomas esporádicos que adquirem uma regressão espontânea (8,17).

A evolução clonal do CCR reflete-se histologicamente pela sequência de lesões pré-malignas nas quais é possível observar um aumento progressivo na forma atípica celular. Para os tumores esporádicos colo-retais a progressão de adenoma para carcinoma, estima-se, que decorra em aproximadamente 10 a 40 anos. A progressão para uma situação maligna decorre da inativação do gene APC, mutação do oncogene KRAS, com perda do cromossoma 18q que contém os genes supressores tumorais SMAD2 e SMAD4 e perda do cromossoma 17p, que possui o gene supressor tumoral TP53. A instabilidade cromossomal é proporcional ao aumento de tamanho do tumor e a alterações de morfologia com tendência a atipia celular, tal como se pode verificar na figura 2.6 (8).

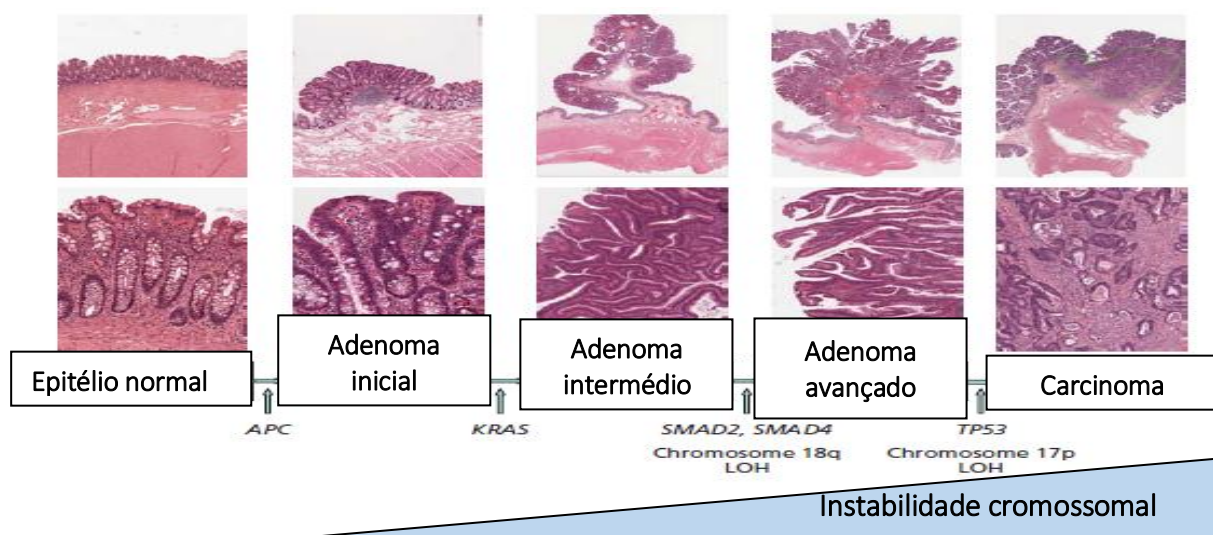


Figura 2.6 - Sequência clássica adenoma-carcinoma. Adaptado de Hobbs et al. (2011) (8).

Mais recentemente surgiu uma sequência alternativa de lesões histopatológicas que conduzem ao carcinoma colo-retal, a sequência de neoplasia serrilhada (figura 2.7), associada a mutações e metilações com lesões pré-malignas comumente relacionadas com pólipos (8).

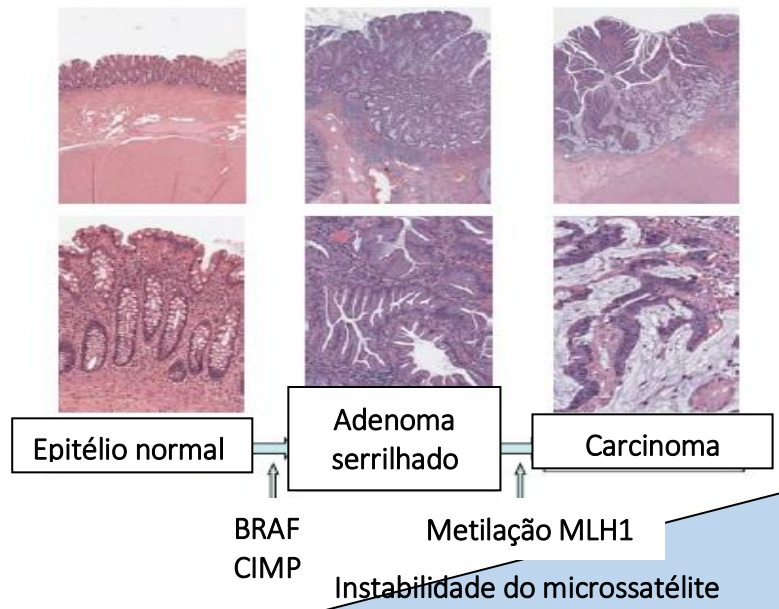


Figura 2.7 - Sequência de neoplasia serrilhada. Adaptado de Hobbs et al. (2011) (8).

Aproximadamente 10 a 15% do CCR esporádico segue uma via genética alternativa de carcinogénese, caracterizada pela hipermetilação do promotor MutLHomolog 1 (MLH1) com formação de vários microsatélites. A presença de instabilidade causada por microsatélites tem sido associada a melhores prognósticos, mas também perda de resposta ao fluorouracilo (5-FU). Há que ter em conta que ainda assim, 20% dos CCR mantêm um cariótipo cromossomal normal e, nesse sentido, importa analisar eventuais fatores de risco. Relativamente às alterações que conduzem à invasão do tumor, estas encontram-se ainda por esclarecer. A perda da função da E-caderina, um componente das junções entre as células, é um dos fatores associados à invasão cancerígena (8).

A localização de um tumor retal é usualmente indicada pela distância entre o anel ano-retal e a delimitação inferior do tumor. O cancro colo-retal desenvolve-se no intestino grosso, lentamente, em períodos de 10 a 20 anos e muitos deles com início em crescimento não cancerígenos de pólipos (23).

2.3. Fatores de risco

São vários os fatores que influenciam o risco de CCR. Os fatores de risco não modificáveis incluem a história pessoal ou familiar de CCR, pólipos adenomatosos e história pessoal de doença inflamatória intestinal crónica (17). Por outro lado, os fatores de risco modificáveis incluem o sedentarismo, obesidade, consumo elevado de carnes vermelhas e/ou processadas, hábitos tabágicos e consumo moderado a elevado de álcool (24).

Cerca de 20% dos indivíduos com CCR apresentavam um parente próximo diagnosticado com a doença, sendo que, para indivíduos com parentes em primeiro grau com histórico de CCR há um risco de 2 a 3 vezes superior de desenvolver a doença e em casos de diagnóstico em idades precoces o risco para o familiar direto aumenta 3 a 6 vezes (17). Verificou-se que cerca de 5% dos pacientes com CCR apresentam um síndrome genético bem definido que causa a doença e, nesse sentido, o reconhecimento de uma possível síndrome familiar de CCR é essencial para a gestão da patologia. Neste tipo de situação os tratamentos incluem o aconselhamento genético, testes genéticos e rastreios para o cancro (8,17).

Existem evidências que os programas de vigilância são efetivos na redução da mortalidade por CCR e, por isso, importa aplicar protocolos padronizados de forma a recolher a informação relativa à história familiar do doente em cuidados de saúde primários para que seja possível uma resposta rápida e adequada a cada situação (25).

2.3.1. História hereditária e familiar

Polipose familiar adenomatosa (FAP)

A incidência de pólipos no intestino delgado é muito baixa na população em geral, mas está significativamente aumentada em síndromes de polipose hereditária, tais como a polipose familiar adenomatosa (FAP). Esta síndrome é causada por uma deficiência hereditária autossómica dominante no gene APC, um gene supressor tumoral clássico (26). A polipose no cólon é a segunda principal síndrome predisponente para CCR e a manifestação clínica de CCR mais documentada, levando quase todos os pacientes a carcinoma colo-retal. No entanto, representa aproximadamente apenas 1% de todos os tumores colorectais (17,27). A prevalência desta manifestação clínica é de 1 em 14000 e caracteriza-se pela presença de um valor igual ou superior a 100 adenomas no cólon. A deteção ocorre

maioritariamente durante a adolescência e a maioria dos portadores dos genes apresentam pólipos aos 40 anos (8).

A colectomia profilática é recomendada após a adolescência (26). Caso os testes indiquem que o indivíduo é portador, deve ser feita uma vigilância anual a partir dos 12 anos e se se verificar uma presença considerável de pólipos deve ser discutida uma intervenção. A consciencialização clínica, vigilância regular e investigação molecular, permite que quase todas as mortes por CCR em casos herdados de FAP possam ser evitadas (8).

Síndrome de Lynch

O síndrome de Lynch, também denominado de cancro do cólon hereditário sem polipose é o síndrome mais comum no CCR, observado em cerca de 1 a 20% dos CCR e o diagnóstico baseia-se na história familiar não dependendo da observação do intestino, ao contrário da FAP. Esta situação clínica tem uma idade média de diagnóstico a rondar os 45 anos e deriva de mutações em quatro genes de reparação: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*. Caso ambas as cópias do gene se encontrem mutadas, a célula apresenta um défice no mecanismo de reparação do DNA das células somáticas (8,17). Para elucidar relativamente ao risco oncológico neste tipo de síndrome é apresentada a figura 2.8.

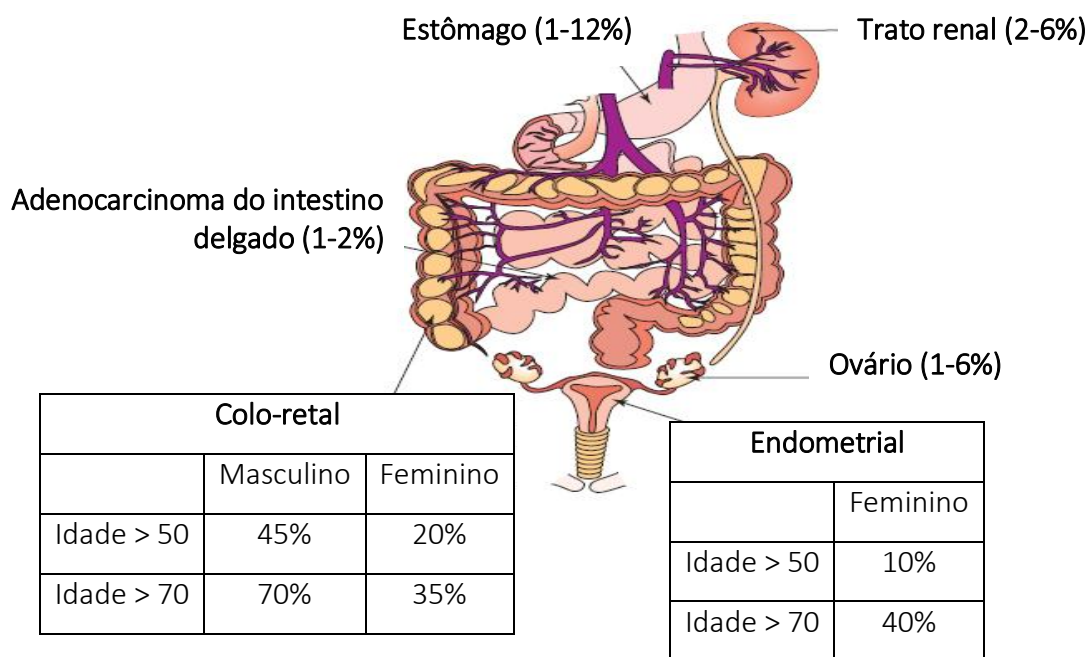


Figura 2.8 – Risco oncológico em CCR sem polipose. Adaptado de Hobbs et al. (2011) (8).

Hereditariedade sem desordem genética reconhecida

Além destes síndromes, existem ainda evidências que revelam uma tendência hereditária na etiologia da doença. Assim sendo, pode ser feita uma análise tendo em conta a história familiar, na qual se avalia a frequência de um mesmo tumor na família, idade de início de tumor precoce, múltiplos tumores primários e associações reconhecidas, tal como é o exemplo do adenocarcinoma colo-retal e do endométrio (8).

2.3.2. História clínica pessoal

Independentemente da história familiar, verifica-se um risco aumentado de desenvolver a doença quanto mais precoce for a verificação de pólipos adenomatosos largos e numerosos e caso se verifique uma colite ulcerativa ou evidências de doença de Crohn, uma condição prolongada de cólon inflamado por longos períodos de tempo. Além disso, estudos têm concluído que pacientes com diabetes tipo 2 podem estar sob um risco aumentado de desenvolver CCR, em parte devido ao risco de obesidade e estilo de vida sedentário inerente (28).

2.3.3. Fatores de risco comportamentais

De um modo geral, há fatores indicativos suficientes para sugerir que vários comportamentos relacionados com o estilo de vida estão associados a um aumento do risco de CCR e, por isso, tudo indica que a adoção de estilos de vida saudáveis podem reduzir o risco de CCR em mais de um quarto. A tabela seguinte (tabela 2.2.) resume alguns dos principais fatores de risco e medidas preventivas a adotar (8,17).

Tabela 2.2 - Fatores de risco *versus* medidas preventivas no cancro colo-retal. Adaptado de *American Cancer Society* (2014) (17, 29, 30, 31-34).

Fatores de risco	Medidas preventivas
Sedentarismo	Prática de exercício físico regular
Excesso de peso/ obesidade	Manutenção de um peso saudável
Alto consumo de carnes vermelhas e processadas	Alimentação rica e variada (Diminuição do consumo de carne vermelha e processada, introdução de frutas e legumes diariamente na alimentação, optar por cereais integrais em detrimento de grãos refinados)
Hábitos tabágicos	Cessaçãotabágica
Hábitos etanólicos	Evitar consumo de bebidas alcóolicas
Elevado consumo de alimentos processados	Realização de rastreios

Estudos recentes apontam para uma diminuição do risco de CCR em 25% em indivíduos com atividade física; a redução no consumo de carnes vermelhas reduz o risco de CCR e o consumo de 10 gramas de fibras por dia parece reduzir o risco de CCR em 10% (32).

2.5. Sinais e sintomas

Numa fase inicial, o CCR pode não apresentar quaisquer sintomas, razão pela qual o rastreio é extremamente importante (17). Os sinais e sintomas do CCR dependem da localização do tumor no intestino, isto é, se circunscrito ao colón ou reto (figura 2.9) ou se decorre a existência de metástases. Com o aumento do crescimento tumoral poderá ocorrer sangramento e obstrução do intestino. A principal sintomatologia inclui sangramento retal, desregulação do trânsito intestinal com obstipação ou diarreia prolongada, melenas detetáveis por fezes muito escuras, diminuição da espessura das fezes, perda de apetite, perda de peso não intencional, cólicas ou desconforto abdominal, náuseas ou vômitos. Além disso, há que ter em conta o sangramento retal ou anemia, com sintomatologia de fadiga e fraqueza como fatores de risco em população com idade superior a 50 anos (17,35).

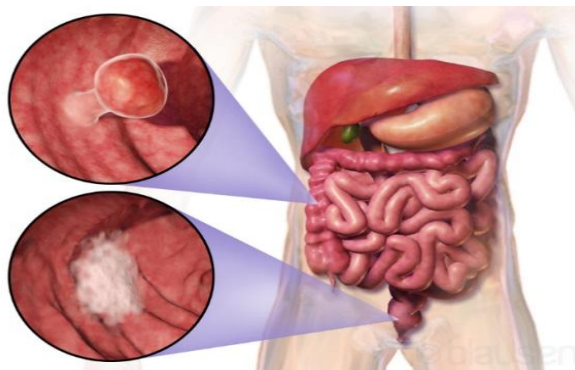


Figura 2.9 - Localização e aparência de dois exemplos de tumores colo-retais. Adaptado de Blausen Medical Communications, Inc (2013) (36).

2.6. Diagnóstico

Nas últimas décadas, a incidência da doença oncológica tem vindo a aumentar não só devido ao envelhecimento e ao estilo de vida, mas também graças ao sucesso nas técnicas de diagnóstico precoce e, portanto, importa reforçar a adoção de medidas preventivas, nomeadamente os rastreios à população (9). Recomenda-se a aplicação de testes de rastreio, os quais permitem não só a deteção do cancro numa fase inicial mas também a prevenção do CCR pela remoção de pólipos pré-cancerosos (3). O rastreio permite detetar pólipos que podem ser removidos antes de se tornarem cancerígenos assim como cancros em estadios iniciais para os quais o tratamento é menos extensivo e mais eficaz. Existem diversas opções de rastreios, desde o teste do sangue oculto nas fezes até testes de ADN. Nas duas figuras seguintes (figuras 2.10, 2.11) são mencionados alguns dos testes mais utilizados (1,17).

A sigmoidoscopia flexível consiste numa endoscopia que examina o intestino a nível distal, isto é, reto e cólon sigmóide onde cerca de metade dos adenomas e cancros se encontram localizados (8).

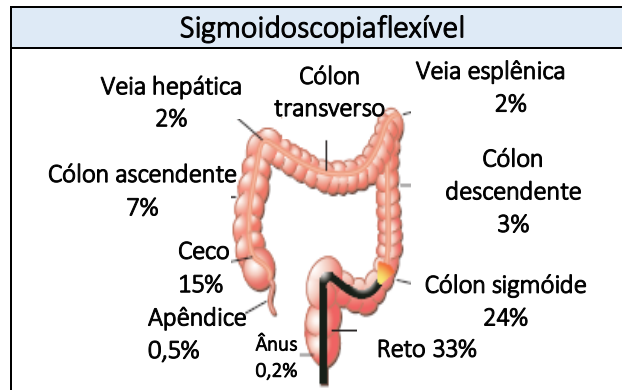


Figura 2.10 - Localização de cancro no intestino e alcance comum do rastreamento por sigmoidoscopia flexível. Adaptado de Hobbs et al. (2011) (8).

A colonoscopia ótica é um procedimento altamente sensível que permite não só uma examinação completa de todo o cólon mas também a remoção de eventuais pólipos num só procedimento e, por isso, é recomendada em adultos a partir dos 50 anos (1,8).

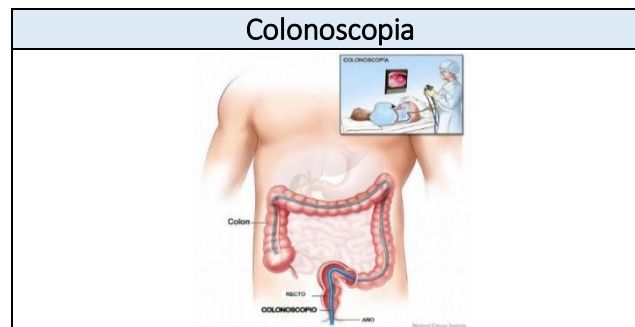


Figura 2.11 - Esquematização do processo de colonoscopia. Adaptado de *National Cancer Institute* (2015) (37).

Além destes, existe a colonografia, que diz respeito a uma modalidade imagiológica de excelência em situações em que a colonoscopia não é possível. Apresenta cerca de 90% sensibilidade e o risco de perfuração é bastante inferior ao da colonoscopia (8).

A idade média de diagnóstico é os 69 anos em homens e 73 anos em mulheres e a taxa relativa de sobrevivência a 1, 5 e 10 anos, relatada para indivíduos com CCR é de 83,2% e 64,3%, e 57,6% respetivamente. No entanto, verifica-se uma taxa de sobrevivência relativa de 90,1% quando o CCR é detetado num estadiamento localizado (3,17). O envolvimento de órgãos adjacentes ou nódulos linfáticos diminuem significativamente a taxa de sobrevivência

relativa a 5 anos (69,2%), e esta é diminuta quando atinge órgãos distantes (11,7%). Nesse sentido é crucial uma deteção precoce desta patologia. No entanto, verifica-se que apenas 59.1% da população acima dos 50 anos efetua o rastreio de acordo com as orientações e, conseqüentemente, apenas 39% dos pacientes são diagnosticados em fases locais, para as quais o tratamento é mais eficaz (3). Importa, por isso, sensibilizar a população para a importância do rastreio do CCR e para a adoção de planos de saúde preventiva ainda mais eficazes.

2.7. Classificação da doença

O estadiamento é essencial na determinação das escolhas de tratamento e acesso a prognóstico. Uma classificação útil da doença oncológica deve incluir as características do tumor que permitam tentar definir o seu prognóstico. O *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) e a *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) prevêm uma classificação baseada nos três grandes pilares da evolução de um tumor – TNM - isto é, o crescimento local do tumor (T), o envolvimento de gânglios linfáticos do território de drenagem (N) e a presença de metástases (M), definindo-se a sua presença ou ausência como M1 ou M0, tal como pode ser evidenciado na figura 2.12 (17,39).

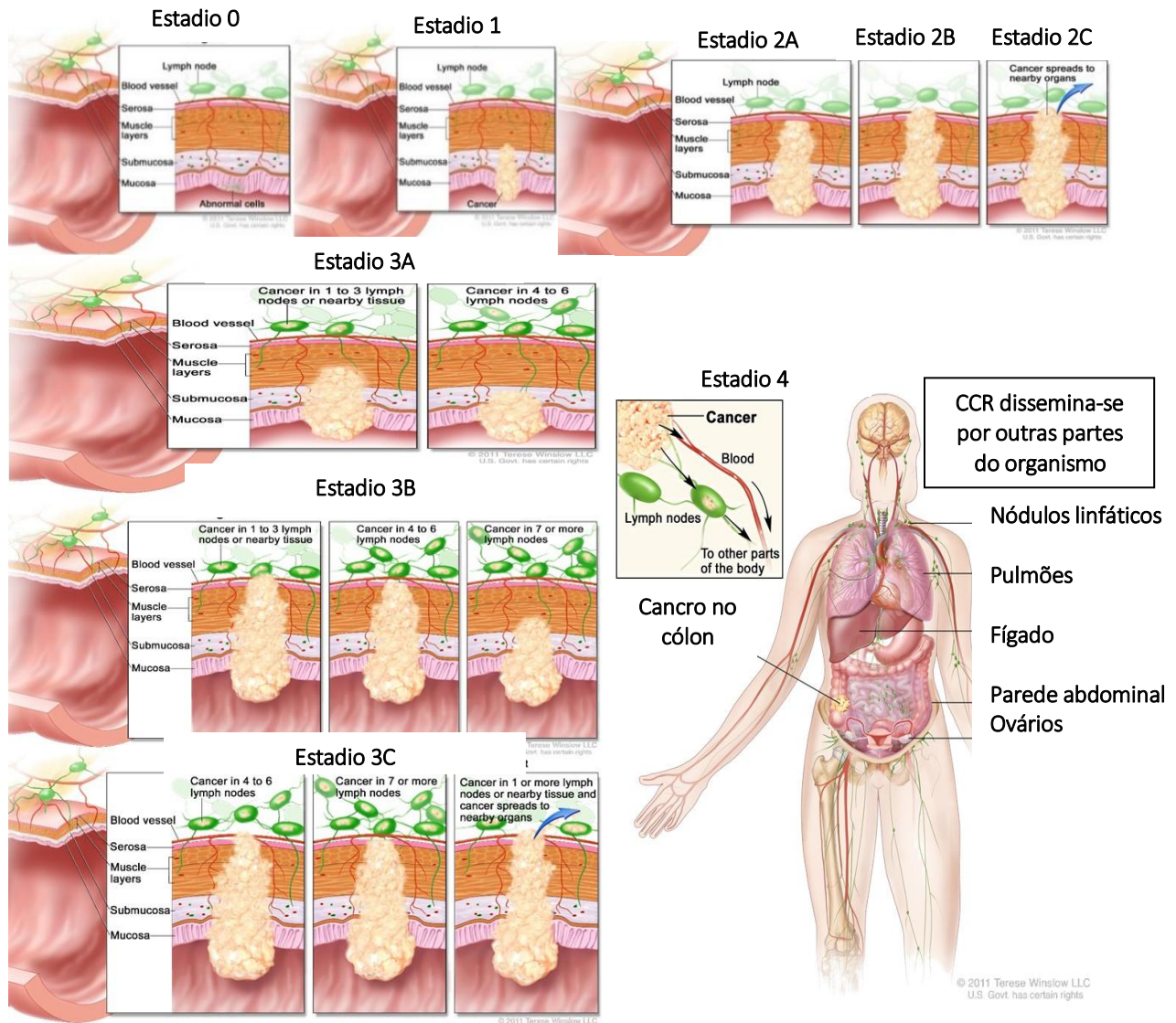


Figura 2.12 - Estadiamento da doença segundo TNM. Adaptado de *National Cancer Institute* (2015) (19).

2.8. Terapêutica convencional

A cirurgia continua a tratar-se da forma mais antiga e ainda mais eficaz de tratar o cancro não hematológico com intenção curativa e a sua indicação pressupõe uma neoplasia limitada, sem metástases à distância. Em situações mais complexas, tais como o risco de oclusão ou hemorragia, a resseção cirúrgica pode ter intenção paliativa (39). Ao longo das últimas décadas a tendência tem vindo a ser a de integrar as várias possibilidades, isto é, cirurgia, quimioterapia e radioterapia, em sequência variável, com redução na agressão cirúrgica quer por processos menos mutilantes quer por recurso a técnicas menos invasivas (39).

A terapêutica cistostática pode ser classificada como quimioterapia de indução ou neoadjuvante, isto é, de utilização inicial com intenção de obter a maior citoredução possível antes de uma intervenção cirúrgica; quimioterapia de intensificação/consolidação; e quimioterapia adjuvante após uma cirurgia e/ou radioterapia, com intenção curativa, com vista a reduzir o risco de recaída e com o objetivo de eliminar eventuais micrometástases, tal como se pode verificar na tabela 2.3 (8,39).

Tabela 1.3 - Resumo das opções terapêuticas no CCR. Adaptado de Hobbs et al. (2011) (8).

Carcinoma <i>in situ</i>	Estadio localizado	Estadio regional	Estadio distante
Por não haver crescimento além da região de origem, aconselha-se a cirurgia para remoção das células de crescimento anormal, a polipectomia, isto é, remoção de pólipos ou excisão local por colonoscopia. Se dimensões forem elevadas ou permanecerem células após polipectomia, sugere-se ressecção do segmento afetado.	Por se verificar invasão celular com penetração da parede do intestino, a ressecção cirúrgica para remoção do tumor é o indicado.	Caso se verifique crescimento tumoral através da parede do intestino, deve proceder-se à ressecção do segmento em causa. Se se verificar disseminação, deve associar-se radioterapia e/ou quimioterapia. Se existir disseminação através dos nódulos linfáticos, deve associar-se quimioterapia.	Caso se verifique disseminação para órgãos ou tecidos distantes, o objetivo é prevenir a obstrução do intestino e outras complicações. Sempre que possível, devem remover-se cirurgicamente as metástases.

No CCR é comum a quimioterapia neoadjuvante ou primária por vezes associada à radioterapia, com vista a alcançar ressecção mais eficaz e com menor probabilidade de recidiva (8,39). Em caso de doença metastizada, opta-se pela quimioterapia paliativa, com objetivo de aumentar o tempo de sobrevivência e redução dos sintomas decorrentes da doença (39). A radioterapia é uma opção viável quando existe proliferação entre tecidos adjacentes e as opções terapêuticas assim como a sobrevivência variam em função da localização do tumor e do estadiamento diagnosticado (17).

A cirurgia, utilizada para a remoção do cancro e dos linfomas circundantes, corresponde ao tratamento mais comum em estados iniciais (estado I e II), sendo que se

recorre em maior número à colostomia no caso do cancro retal (26%) do que para o cancro no cólon (7%) (3). No entanto, a cirurgia não é recomendável em todas as situações. Para as situações de doença com estados mais avançados, recorre-se a quimioterapia, isolada ou em combinação com radioterapia anterior ou posteriormente à cirurgia (3,17). Até ao presente, a única cura é a completa remoção cirúrgica do tumor primário, caso este seja diagnosticado numa fase inicial, no entanto, verifica-se que mais de 45% destes pacientes ainda reincidem devido ao surgimento de metástases (40).

Relativamente à atividade dos citostáticos, estes podem classificar-se em agentes específicos de fase, atuando em fases específicas do ciclo ou agentes não específicos de fase com atuação independente do ciclo de divisão das células. De um modo geral, os citotóxicos apresentam uma janela terapêutica muito estreita e, por isso, existe uma proximidade entre as doses tóxicas e eficazes (39). Infelizmente, a ação deste tipo de fármacos afeta não só as células cancerígenas, mas também as células normais (17). De forma geral, consideram-se como efeitos mais frequentes aos tratamentos oncológicos os apresentados na tabela seguinte (tabela 2.4).

Tabela 2.4 - Principais efeitos secundários da quimioterapia (17,39).

Toxicidade hematológica	Depressão das linhas hematopoiéticas, fadiga, aumento do risco de infeções, aumento do sangramento e hematomas perante lesão;
Toxicidade gastrintestinal	Náuseas, vômitos, diarreia, mucosite, perda de apetite;
Toxicidade dermatológica	Alopécia, alteração das unhas e pigmentação, descamação, edema e erupções cutâneas, formação de bolhas nos membros;
Toxicidade neurológica	Neuropatia sensitiva com dormência e formigueiro nos membros.

O padrão de cuidados para estes pacientes inclui a combinação de 5-fluorouracilo (5-FU) e leucovorina. A esta combinação pode ser adicionado o irinotecano, formando um esquema terapêutico denominado de FOLFIRI ou, por outro lado, pode ser adicionada a oxaliplatina formando o esquema terapêutico referido como FOLFOX (40).

Nos últimos anos, um número de novas terapias têm sido desenvolvidas para o tratamento do cancro, tendo em conta o conhecimento molecular e as alterações envolvidas na ocorrência de cancro. Dentro destas, as mais visíveis são os anticorpos monoclonais vetorizados para certas moléculas presentes nas células tumorais e que afetam o crescimento

e progressão tumoral (8,17). É exemplo de anticorpo monoclonal utilizado no CCR, o bevacizumab, inibidor da angiogénese por ligação ao VEGF, indicado em caso de metastização. Também o cetuximab tem sido utilizado em associação com rituximab e panitumumab em CCR metastizado (3,39). Em seguida, serão apresentados os principais fármacos utilizados na terapêutica do CCR.

2.8.1. Antimetabolitos

Os fármacos pertencentes a esta classe têm em comum o facto de se incorporarem no material genético ou de se combinarem irreversivelmente com enzimas celulares importantes, interferindo com a divisão celular e, conseqüentemente com a viabilidade da célula (41).

- 5-fluorouracilo

5-FU é um análogo da pirimidina que atua através da inibição da enzima timidilatosintase e a sua administração conjuntamente com leucovorina potencia a sua atividade (8). Trata-se de um pró-fármaco que necessita de ativação por uma série complexa de reações de biotransformação em nucleótidos ribosil e desoxirribosil. Um desses metabolitos, FdUMP, forma um complexo com a enzima timidilatosintase e o folato reduzido, levando à inibição da síntese de DNA por falta de timina (42). Este fármaco é muito utilizado no CCR, tanto em terapia adjuvante como em terapêutica para doença avançada (17,42).

- Raltitrexed

Raltitrexed é um inibidor específico da timidilatosintase (TS) impedindo que esta se ligue ao seu cofactorfolato (43). A sua utilização é limitada a pacientes intolerantes ao 5-FU com CCR em estado avançado (8).

- Capecitabina

A capecitabina é um pró-fármaco do 5-FU que permite a administração por via oral, já que apresenta uma biodisponibilidade de 70 a 80%. O metabolito é, por sua vez hidrolisado em 5-FU diretamente no tumor (8,42). A capecitabina pode ser utilizada em monoterapia ou em combinação com outros (40).

2.8.2. Camptotecinas

As camptotecinas são produtos naturais que inibem a atividade da topoisomerase I, a enzima-chave na quebra e re-ligação dos filamentos simples do ADN. A inibição desta enzima resulta na lesão do ADN (42).

-Irinotecano

O irinotecano é um pró-fármaco, convertido em SN-38, um potente inibidor da topoisomerase I. Inicialmente, o irinotecano foi aprovado como monoterapia de segunda linha em pacientes com CCR metastizado sem resposta ao 5-FU ou em primeira linha em associação com 5-FU e leucovorina (8,42).

2.8.3. Análogos da platina

Estes análogos são compostos de coordenação de platina, que inibem a síntese de ADN pela formação de ligações covalentes às bases do ADN, interferindo com a sua estrutura e função (11).

- Oxaliplatina

A oxaliplatina é um composto de platina de terceira geração com melhor perfil de segurança que a cisplatina que interrompe a replicação e transcrição do ADN por alquilação (42,44). A oxaliplatina é efetiva no tratamento do CCR, particularmente na presença de resistências ao 5-FU ou fraca resposta à cisplatina e carboplatina. Este composto age sinergicamente com outros fármacos anticancerígenos, tais como o 5-FU, inibidores da topoisomerase e inibidores de microtúbulos e é recomendado em situações avançadas (8,11). Este anticancerígeno tem-se revelado efetivo no tratamento do CCR avançado, no entanto a sua aplicação é restrita devido à sua limitação de dose causada pela neurotoxicidade e pela inativação dos canais de sódio (11,44).

2.8.4. Anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais podem ser utilizados como inibidores dos recetores dos fatores de crescimento (45).

- Bevacizumab

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um dos fatores angiogénicos mais críticos uma vez que o crescimento de tumores primários e metastáticos exige uma vasculatura intacta. Nesse sentido, o VEGF e a sua via de sinalização representam um alvo para quimioterapia. Este anticorpo monoclonal tem como alvo terapêutico todas as formas de VEGF-A, impedindo a sua interação com os receptores-alvo do VEGF. Pode ser associado à quimioterapia com 5-FU, irinotecano, e oxaliplatina no tratamento do CCR metastizado(42). Kang et al. concluíram que a combinação de bevacizumab com FOLFIRI e FOLFOX tem atividade em CCR metastizado com resistência a estes esquemas terapêuticos e estudos retrospectivos sugerem a sua utilização como primeira linha no cancro colo-retal metastático (CCRm) (40).

- Cetuximab

O recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) está hiper-expresso em vários tumores sólidos. A ativação da via de sinalização do EGFR resulta na ativação de vários processos com conseqüente aumento do crescimento e proliferação celulares, invasão, metástase e angiogénese. Além disso, esta via inibe a atividade citotóxica de alguns antineoplásicos e da radioterapia por mecanismos de inibição de apoptose e conseqüente resistência celular a fármacos. O cetuximab é um anticorpo monoclonal, inibidor dos recetores dos fatores de crescimento, dirigido ao domínio extracelular do EGFR, atualmente aprovado para utilização em casos refratários ao irinotecano ou em associação à oxaliplatina em situações de metastização (42). A utilização de cetuximab pode ser particularmente vantajosa em pacientes com metástases do fígado isoladas (8).

- Panitumumab

A utilização de cetuximab e panitumumab, anticorpos monoclonais que se ligam ao EGFR, têm revelado resultados promissores. Estudos clínicos têm demonstrado que a atividade destes agentes é limitada a pacientes com tumores que expressam o oncogene KRAS (46,47).

- Aflibercept

O aflibercept é uma proteína de fusão recombinante constituída por porções de domínios extracelulares dos recetores 1 e 2 do VEGF humano fundidas com a porção Fc, fração cristalina, da imunoglobulina (IgG1) humana (8). O aflibercept atua como um recetor chamariz solúvel que se liga ao VEGF-A com uma afinidade mais elevada do que os seus recetores naturais e, conseqüentemente pode inibir a ligação e ativação destes recetores e diminuir o crescimento e neovascularização do tumor. Aflibercept, em associação com quimioterapia com irinotecano/5-fluorouracilo/leucovorina está indicado em adultos com CCRm que é resistente ou tem progredido depois de um regime terapêutico contendo oxaliplatina (48).

2.8.5. Outros fármacos

Outros fármacos têm sido associados a efeitos benéficos na terapêutica do CCR.

- Mitomicina

A mitomicina é utilizada no tratamento do cancro da mama e do trato gastrintestinal superior (41). Trata-se de um agente alquilante com atividade no CCR utilizado em combinação com 5-FU (8).

- Regorafenib

Trata-se de um agente administrado por via oral que bloqueia várias proteínas quinases, entre as quais, as quinases envolvidas na angiogénese tumoral, oncogénese e no microambiente tumoral. Em estudos pré-clínicos, o regorafenib demonstrou uma atividade antitumoral potente num amplo espectro de modelos tumorais incluindo modelos de tumores colo-retais os quais são mediados pelos seus efeitos antiangiogénicos e antiproliferativos. Nesse sentido, está indicado em cancro CCRm previamente tratado (41).

- Erlotinib

Tal como o regorafenib, também o erlotinib, um inibidor da tirosina quinase tem o objetivo de obter uma ação terapêutica num alvo específico, com vista a controlar o crescimento celular, sobrevivência ou angiogénese do tumor.

Segundo a compilação de protocolos de quimioterapia de 2015 de Kuehr e tal., existem várias combinações possíveis para a terapêutica do CCR, tal como se pode observar na tabela B do Anexo B. De seguida, na tabela 2.5, serão apresentados resumidamente os fármacos mais utilizados na quimioterapia aplicada ao CCR e os efeitos tóxicos a eles comumente associados.

Tabela 2.5- Principais fármacos utilizados na quimioterapia do CCR (8,41,42,46).

Classe farmacológica	Agente	Toxicidade relativa
Antimetabolitos	5-Fluorouracilo	Náuseas, mucosite, diarreia, depressão da medula óssea, neurotoxicidade, eritema palmar plantar.
	Raltitrexed	Leucopenia, anemia, náuseas, diarreia, vômitos, obstipação e dor abdominal, erupção cutânea, mucosite.
	Capecitabina	Náuseas, vômitos, diarreia, mielosupressão
Inibidores dos recetores dos fatores de crescimento	Cetuximab	Exantema cutâneo, doença pulmonar intersticial, reação de hipersensibilidade, hipomagnesémia.
	Panitimumab	Rash cutâneo, hipomagnesémia.
	Bevacizumab	Hipertensão, eventos tromboembólicos arteriais, perfurações gastrointestinais, complicação na cicatrização de feridas.
Camptotecinas	Irinotecano	Diarreia, náuseas, cólicas, vômitos, depressão da medula óssea, sudorese, e alopecia.
Agentes alquilantes	Oxaliplatina	Neuropatia Sensorial periférica, mielosupressão.
Agentes anti-neovascularização	Aflibercept	Leucopenia, diarreia, neutropenia, proteinúria, estomatite, fadiga, trombocitopenia, hipertensão, perda de peso, apetite diminuído, <i>epistaxis</i> , dor abdominal, disfonia, aumento da creatinina sérica e dor de cabeça.
Citotóxicos que se intercalam no ADN	Mitomicina	Toxicidade da medula óssea, fibrose pulmonar e insuficiência renal.
Inibidor das proteínas quinases	Regorafenib	Efeitos hepáticos, hemorragia, isquemia cardíaca e enfarte do miocárdio, hipertensão, dificuldade na cicatrização de feridas, reação cutânea mão-pé.

Capítulo 3

Nanomedicina

Entende-se por nanotecnologia, a manipulação de materiais numa escala supramolecular. Esta envolve *odesign*, produção, caracterização e aplicação de materiais em escala nano, providenciando novas e avançadas tecnologias que permitem estudar macromoléculas em tempo real e, desta forma, detetar de forma mais rápida e sensível alterações. Uma vez adaptada esta tecnologia à medicina, isto é, a nanomedicina, apresenta um forte potencial na deteção de eventuais patologias, assim como na criação de novos e efetivos agentes terapêuticos (49–52).

Um nanómetro corresponde a 1×10^{-9} metros e uma largura de cerca de 5 átomos, dimensões tão ínfimas que importa relativizar, para tentar conceber a sua dimensão, tal como pode ser visível na figura 3.1 (49).

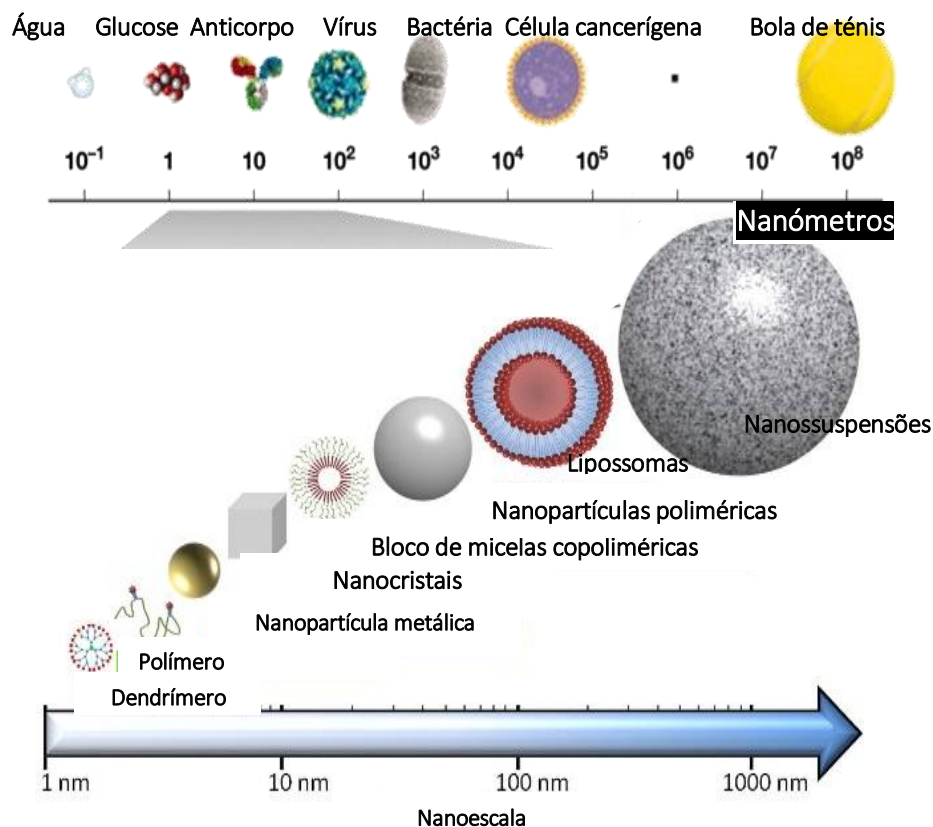


Figura 3.1 - Figura ilustrativa das nanoestruturas utilizadas na nanomedicina e do seu tamanho relativizado. Adaptado de *British Society for Nanomedicin* (2015) (53).

As nanopartículas têm sido utilizadas na biologia e medicina há mais de 50 anos. Inicialmente eram chamados de colóides, emulsões ou aerossóis, e incluíam muitas suspensões naturais realizadas manualmente. Além da imagiologia e da deteção, a vetorização de nanoestruturas oferece a oportunidade de criar novas abordagens no tratamento de tumores tais como o CCR (12).

Avanços recentes na investigação ao nível da nanotecnologia abrem um vasto potencial no desenvolvimento de sistemas de libertação de fármacos eficientes e com mais vantagens, dos quais os lipossomas se têm tornado uma importante ferramenta não só pela vetorização de fármacos para a terapêutica, mas também como agentes de contraste imagiológico, atingindo os alvos específicos com maior efetividade, minimizando os efeitos adversos e aumentando a eficácia terapêutica (6,12,50).

A título de resumo, apresentam-se as principais aplicações dos materiais de escala nano, na medicina, na figura 3.2.

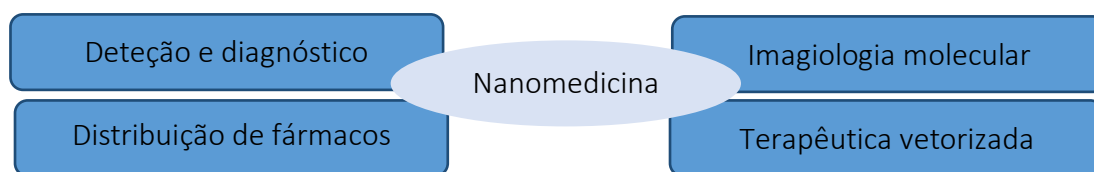


Figura 3.2- Aplicações médicas da nanotecnologia. Adaptado de Malsch I, Emond C (2014) (50).

3.1. Aplicação da nanomedicina em oncologia

Doenças do trato gastrointestinal, tal como o CCR, apresentam alvos terapêuticos para a libertação de fármaco, onde se deseja a mínima absorção sistémica e os níveis máximos de fármaco na parede intestinal. O trato gastro intestinal apresenta um ambiente severo para os fármacos, devido não só às variações de pH, mas também às várias enzimas. Além disso, conta ainda com a resposta imunitária, o efeito de primeira passagem com a metabolização no fígado, variações na permeabilidade intestinal e as interações com os alimentos e o muco. A absorção de fármacos não específica e a *clearance* requerem altas doses, o que pode resultar em alta toxicidade (6).

Fanciullino evidenciou os defeitos no endotélio capilar da vasculatura tumoral que possui uma organização frouxa e lúmen dilatado gerando espaços com tamanho entre os 200 a 600 nm. Nesse sentido, lipossomas de 100 nm de diâmetro podem perfeitamente

extravasar e acumular-se no espaço intersticial do tumor. Tal como se pode verificar na figura 3.3, os vasos angiogénios crescem rapidamente mas de forma anormal, o que cria espaços com drenagem linfática irregular e imatura. Como resultado disso, partículas com dimensão inferior a 200 nm acumulam-se preferencialmente no interstício tumoral. Após a extravasão há uma captação intracelular do lipossoma vetorizado facilitada por recetores mediadores da endocitose (54).

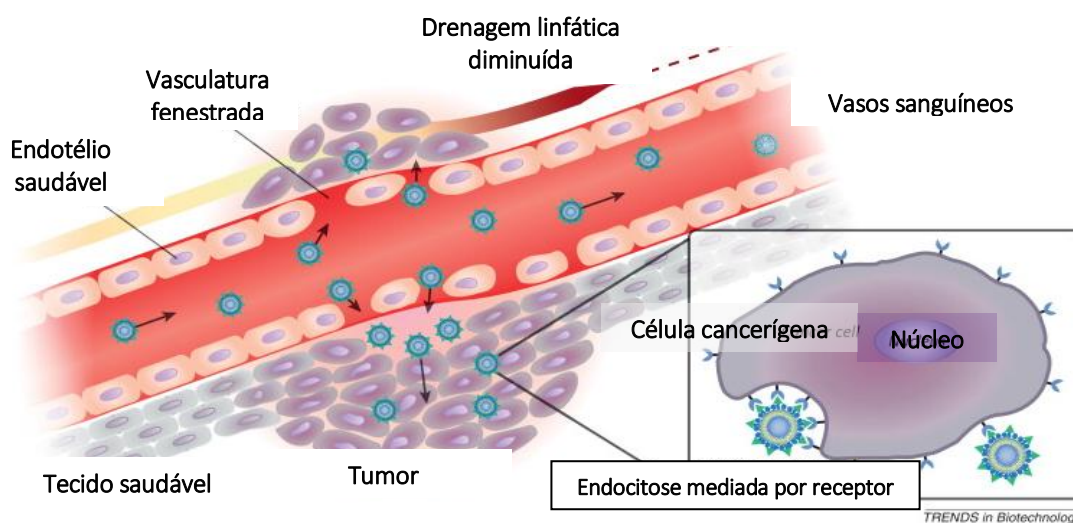


Figura 3.3 - Esquemática do efeito de permeabilidade e retenção (EPR). Adaptado de Noble et al. (2014) (54).

Devido à seletividade do tumor, o efeito de permeabilidade e retenção (EPR) aumenta e é essa a razão pela qual os lipossomas são vetorizados passivamente para o tecido tumoral, levando ao aumento da acumulação do lipossoma no interstício do tumor graças a uma melhor utilização das anormalidades vasculares de tumores sólidos (55,56). Esta permeabilidade microvascular dos tumores permite uma dinâmica de transporte de fluídos e moléculas anormal com aumento do extravasamento de moléculas com determinadas dimensões, tais como, fármacos macromoleculares ou lipossomas, conduzindo a uma acumulação preferencial no tecido tumular ao invés do tecido normal. Posto isto, nos tumores sólidos, o efeito EPR é considerado o fenómeno universal pelo qual os lipossomas são vetorizados passivamente para o tecido tumoral, levando à acumulação do lipossoma no interstício do tumor e inibição eficiente do crescimento tumoral (57).

No caso da difusão passiva há uma libertação na matriz extracelular com difusão através do tecido, enquanto, por outro lado, tal como se pode verificar na figura 3.4, na vetorização ativa, caso o fármaco extravase para o tecido tumoral, a presença de ligandos vetorizados facilitam a sua interação com os recetores presentes nas células tumorais levando a uma maior acumulação e captação seletiva por endocitose mediada por recetores (58).

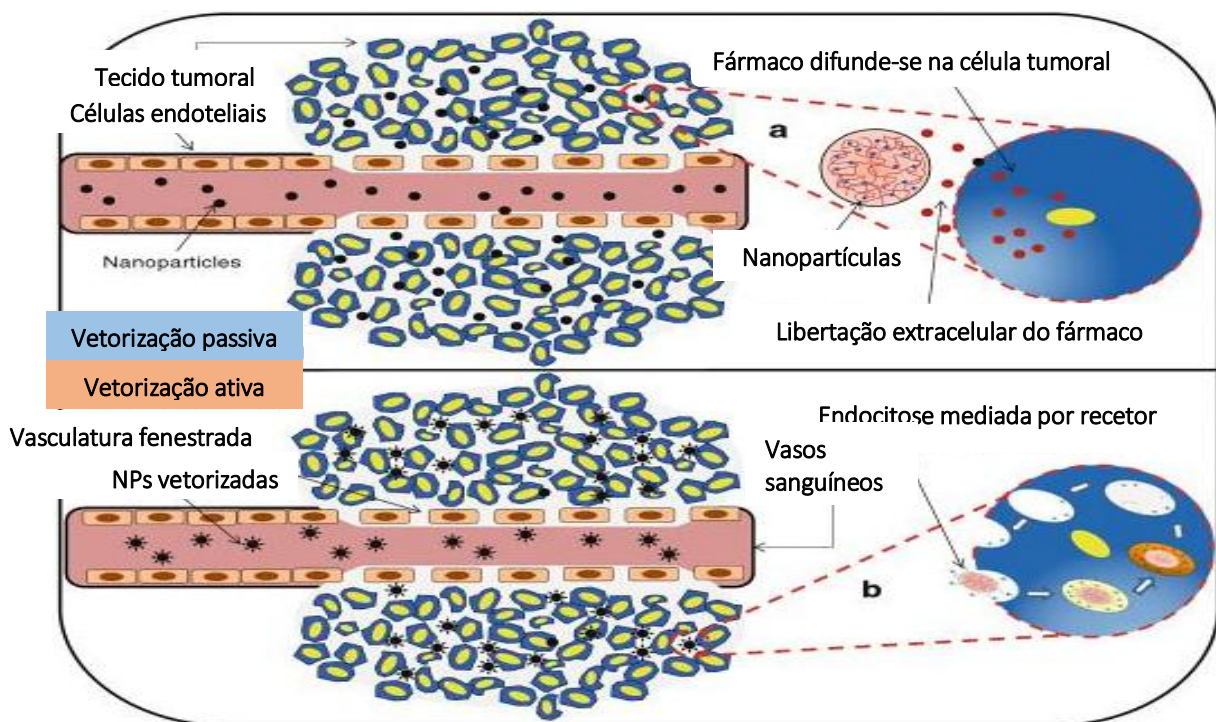


Figura 3.4 - Vetorização passiva *versus* vetorização ativa de nanossistemas. Adaptado de Domb et al. (2014) (58).

A aplicação da nanotecnologia no diagnóstico e tratamento do cancro colo-retal tem sido uma promessa no aperfeiçoamento dos métodos convencionais assim como no incentivo para o desenvolvimento de novas abordagens. No que diz respeito ao diagnóstico, sistemas nanotecnológicos podem ser aplicados à deteção *in vitro*, por exemplo, pelos testes ao soro sanguíneo ou ainda *in vivo*, através da imagiologia e da administração de agentes imagiológicos(12). Desta forma, graças à nanotecnologia torna-se possível desenvolver novos agentes com novos papéis em processos não-invasivos que permitem a deteção, estadiamento e controlo dos pacientes com cancro (59).

No que diz respeito à terapêutica, a vetorização de nanoestruturas oferece potenciais soluções para as limitações das modalidades padrão adotadas na quimio e radioterapia,

nomeadamente ao nível do dano dos tecidos saudáveis tanto na proximidade como afastados, das doses clínicas limitadas pela toxicidade, com várias restrições à eficácia do arsenal terapêutico atualmente disponível. No desenvolvimento pré-clínico, nanoestruturas vetorizadas especificamente para moléculas expressas pelo tumor têm sido utilizadas para aumentar a especificidade da entrega de citotóxicos e limitar os danos colaterais no tecido saudável. Assim sendo, as nanoestruturas têm sido utilizadas em conjunto com anticorpos, proteínas e ligandos vetorizados para recetores especificamente associados ao tumor permitindo uma eficácia farmacológica e clínica superior bem como uma diminuição de eventos adversos em modelos animais. Neste contexto, lipossomas vetorizados têm mostrado acumulação efetiva em células cancerígenas colo-retais de modelos animais (12).

Ao longo das últimas décadas, os lipossomas tornaram-se um ponto focal no desenvolvimento de sistemas de libertação de fármacos. Novos lipossomas, com novos constituintes abriram a possibilidade de tratamento seguro e eficiente para muitas doenças, entre as quais o cancro, por prolongarem o tempo de circulação ou entrega de fármaco especificamente num alvo terapêutico (6).

3.2. Nanossistemas aplicados à medicina

São inúmeros os nanossistemas a que a medicina recorre. Estes podem ser classificados como nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas cerâmicas, nanopartículas magnéticas, nanopartículas compostas por metais, micelas poliméricas, dendrímeros e lipossomas (60).

De um modo geral entendem-se como nanossistemas aqueles que apresentam diâmetros de 1 a 1000 nm (61). O foco deste trabalho prende-se com a aplicação de lipossomas e, por isso, serão o sistema mais extensamente abordado.

3.2.1. Lipossomas aplicados na terapêutica do cancro colo-retal

Os lipossomas foram inicialmente descritos por Bangham e colaboradores em 1965 na Universidade de Cambridge, correspondendo a sistemas coloidais que consistem em vesículas formadas por uma bicamada lipídica que encerra um núcleo aquoso. São estruturas esféricas constituídas por uma ou mais bicamadas de fosfolípidos anfipáticos, isto é, que possuem uma extremidade hidrofílica e duas caudas hidrofóbicas. Pelo facto de possuírem tanto uma fase lipídica como uma fase hidrofílica, estes constituintes agrupam-se em presença de água.

Formam-se assim os lipossomas por interação hidrofílica e hidrofóbica entre os fosfolípidos, constituindo uma cavidade hidrofílica e uma dupla membrana hidrofóbica, estruturas que podem ser utilizadas na encapsulação, transporte e libertação de materiais solúveis tanto em água como em lípidos (61).

Na sua composição podem ser utilizados fosfolípidos de carga neutra como por exemplo a fosfatidilcolina; aniónicos, como o ácido fosfatídico, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilglicerol; ou ainda catiónicos, como a estearilamina. Em função da sua composição, a elasticidade e rigidez da estrutura sofre alterações e, por isso, o colesterol faz muitas vezes parte da bicamada de fosfolípidos dos lipossomas. A dimensão, biocompatibilidade e propriedade anfílica dos lipossomas tornam-nos compatíveis com membranas celulares, permitindo uma libertação lenta e contínua dos fármacos encapsulados, pela infiltração ou degradação dos lipossomas, levando a uma redução no metabolismo e excreção do fármaco e consequentemente prolongando o seu período de ação (11).

Cada bicamada fosfolipídica é designada de lamela e em função do número de bicamadas, os lipossomas podem ser classificados como unilamelares ou multilamelares. Os lipossomas podem ainda ser classificados em função do seu tamanho, os unilamelares pequenos (SUV) possuem um diâmetro entre os 20 e 40 nm e os grandes entre os 40 e 80 nm. Por outro lado, os lipossomas multilamelares podem adotar dimensões entre 1 µm e 200 µm (62).

Relativamente à sua preparação, o método aplicado para tal irá influenciar o tamanho e número de camadas obtido, sendo os métodos mais comuns a hidratação de um filme lipídico seco e a injeção de um solvente orgânico no qual os lípidos estão dissolvidos. Na preparação de lipossomas existem passos comuns: a secagem dos lípidos dissolvidos no solvente orgânico por evaporação do mesmo; dispersão dos lípidos em meio aquoso; purificação do lipossoma resultante e análise do produto final (63). O método de hidratação de um filme lipídico seco consiste na adição de um meio aquoso que geralmente contém o fármaco (água, uma solução tampão ou salina), a um filme lipídico seco, sob temperatura controlada. A modulação da temperatura faz com que os lípidos se encontrem altamente hidratados e permite um controlo da sua rigidez. Em combinação com a agitação durante um período mínimo de uma hora, permitirá a obtenção de uma dispersão de vesículas maioritariamente multilamelares. Com vista à redução da dimensão destas vesículas recorre-

se posteriormente a um processo de sonicação ou extrusão. A sonicação consiste na exposição das vesículas multilamelares a ondas ultrassónicas conduzindo à formação de vesículas de menor dimensão, enquanto a extrusão diz respeito à passagem das vesículas multilamelares através de pequenos orifícios com dimensões bem definidas, que induzem a sua divisão (63).

No método de injeção de um solvente orgânico, os lípidos são dissolvidos em solvente orgânico, tal como o éter dietílico ou uma mistura de éter e metanol, a solução é lentamente adicionada à fase aquosa, na qual se encontra o material a ser encapsulado sob temperaturas entre os 55°C e os 65°C ou pressão reduzida, e em seguida, procede-se à extração do solvente da mistura por evaporação do solvente (63).

As principais vantagens que têm sido apontadas à utilização de lipossomas, sumarizadas na tabela 3.1, consistem na sua habilidade para controlar a taxa de libertação dos materiais incorporados, bem como para fazer a sua entrega no local e tempo pretendido. Além disso, os agentes encapsulados em lipossomas mostram genericamente melhorias na estabilidade farmacocinética, uma melhor distribuição, aumento de bioatividade e biodisponibilidade, maior acumulação nos alvos, menor toxicidade no tecido normal e torna-se possível distribuí-los em áreas usualmente inacessíveis para fármacos não-encapsulados (11,61,64).

Tabela 3.1 - Vantagens e desvantagens da utilização de lipossomas (60,65–67).

Vantagens dos lipossomas	Desvantagens dos lipossomas
<ul style="list-style-type: none"> - Aumento da eficácia terapêutica do fármaco; - Aumento do índice terapêutico do fármaco; - Aumento da estabilidade por encapsulação; - Proteção do fármaco da degradação; - Flexíveis, biocompatíveis, biodegradáveis; - Redução da toxicidade dos agentes encapsulados; - Diminuição da exposição de tecidos saudáveis; - Melhores parâmetros de distribuição; - Prolongamento da libertação do fármaco; - Aumento da biodisponibilidade do fármaco; - Permite incorporação de ligandos específicos; - Permite entrega de fármaco direcionada a um alvo; - Maior precisão na vetorização; - Formulação apropriada à forma de administração. 	<ul style="list-style-type: none"> - Baixa solubilidade; - Curto tempo de semi-vida; - Risco de oxidação e reações de hidrólise; - Risco de fugas e fusão das moléculas encapsuladas; - Custo de produção elevado.

Desde que os lipossomas foram inicialmente descritos, a sua produção tem evoluído desde lipossomas simples (Figura 3.5A) a lipossomas vetorizados passivamente (Figura 3.5C) vetorizados ativamente (Figura 3.5D, 3.5E) com componentes lípidos variáveis, mecanismos que despoletam a libertação do fármaco (Figura 3.5B) e conjugação de moléculas (6,11).

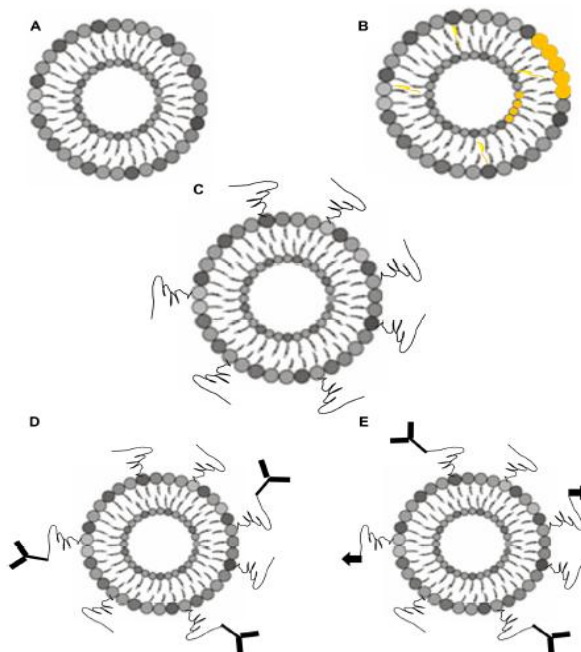


Figura 3.5 - Ilustração esquemática dos principais tipos de lipossomas. A- lipossomas tradicionais; B- lipossomas com moléculas desestabilizadoras ou componente lipídico adicional; C- lipossomas vetorizados passivamente; D- lipossomas vetorizados ativamente; E- lipossomas vetorizados ativamente com ligandos para alvos diferentes. Adaptado de Zhang et al. (2013) (6).

Estudos prévios demonstraram que lipossomas modificados poderão ser sistemas de libertação de fármacos mais efetivos (6,11). Segundo Yang e Fu, em 2014, em função das suas propriedades, os lipossomas podem ser divididos em três grupos: lipossomas de longa circulação (*stealth*); lipossomas de vetorização ativa; e lipossomas com propriedades especiais (11). A superfície dos lipossomas pode ser modificada de modo a atribuir novas capacidades. Exemplos deste efeito consistem na PEGuilação do lipossoma, ou na utilização de ligandos tais como anticorpos, péptidos, proteínas, hidratos de carbono ou outras moléculas de dimensões reduzidas com vista a promover a endocitose mediada por recetores, tal como se pode observar na figura 3.6 (54).

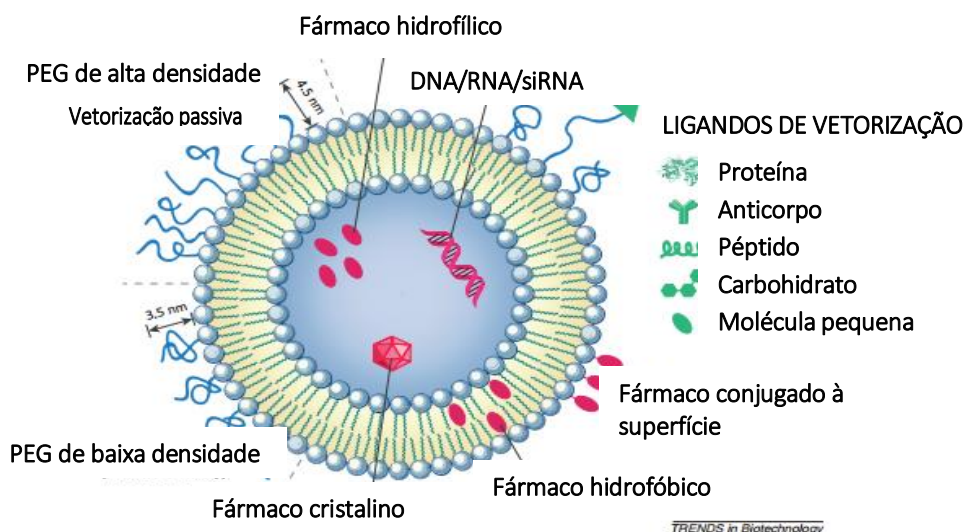


Figura 3.6 - Alterações aplicadas a lipossomas para otimizar a sua função como sistemas de libertação de fármacos. Adaptado de Noble et al. (2014) (54).

Devido às vantagens apresentadas, os lipossomas são um promissor sistema de libertação de fármacos que pode ser usado para encapsular efetivamente fármacos anticancerígenos, oligonucleótidos para a terapia génica, péptidos para o tratamento de doenças infecciosas, antigénios para a estimulação da resposta imunitária, assim como radiofármacos para imagiologia e radioterapia vetorizada (64).

Os lipossomas permitem uma fusão com as membranas celulares através da qual ocorre a libertação do conteúdo do lipossoma no interior das células ou, em alternativa, pela captação dos lipossomas, permitem a incorporação dos seus fosfolípidos na membrana celular com libertação do fármaco no meio celular. Sabe-se que a quimioterapia convencional não é absolutamente satisfatória devida, em parte, ao facto do fármaco não atingir o local ativo numa concentração efetiva, o que implica doses elevadas, com efeitos secundários muito adversos para o doente. A vetorização dos fármacos para as células tumorais poderá permitir ultrapassar essa limitação, o que será vantajoso para o tratamento do cancro. Nesse sentido, os lipossomas têm sido propostos como sistemas de libertação de moléculas anticancerígenas cuja entrega de fármaco anticancerígeno em tumores é otimizada graças a alterações na biodistribuição dos fármacos a eles associados (55).

O CCR apresenta uma taxa elevada de novos casos anualmente e a quimioterapia convencional é muitas vezes limitada pelos efeitos tóxicos a ela associada, pelo que as

formulações lipossomais são ferramentas úteis para o desenho de alternativas terapêuticas. Estes novos sistemas são mais eficientes e seguros, permitindo aumentar a eficácia terapêutica e reduzir os efeitos limitantes neste tipo de patologia (6).

Antes de mais importa esclarecer algumas definições. Os investigadores têm vindo a reconhecer que o mesmo fármaco quando combinado com outros a diferentes rácios pode obter diferenças significativas nos resultados obtidos, tanto em termos de segurança como de eficácia. Assim sendo, em função do rácio da combinação podemos ter: efeito aditivo, no qual se verifica que o efeito anticancerígeno dos fármacos é igual à soma dos fármacos individualmente; efeito sinérgico, que se caracteriza pelo facto da combinação de fármacos ser melhor do que a soma dos efeitos individuais de cada fármaco; e efeito antagonista que se define pela diminuição do efeito quando os fármacos estão combinados, relativamente aos fármacos individualizados (68).

Existem vários tipos de lipossomas e, no entanto, não existem atualmente normas uniformes em relação à sua aplicação, por isso a sua seleção deve ser realizada de acordo com as especificidades dos tratamentos ou requisitos experimentais (11). Nesse sentido, são apresentados alguns exemplos relativos aos diversos tipos de lipossomas aplicados na terapêutica do CCR.

3.2.1.1. Lipossomas vetorizados passivamente

Tal como já foi mencionado, comparativamente aos tecidos normais, a prematuridade dos capilares e imaturidade do sistema linfático no tecido tumoral permitem a passagem de macromoléculas para o tecido tumoral com extravasamento de lipossomas em alta concentração em tecidos tumorais por longos períodos de tempo (11,55). Devido a estas características, os sistemas de libertação de dimensões nano apresentam capacidade de atravessar o endotélio capilar e entrar no espaço intersticial. Os espaços entre as células endoteliais do tecido tumoral têm um tamanho que varia de 100 a 780 nm, em oposição ao endotélio normal, cujos valores oscilam entre 5 e 10 nm. Os lipossomas, ao contrário de moléculas de baixo peso molecular, são retidos no tumor, já que não experimentam uma re-entrada na circulação por difusão, resultando na sua acumulação em ambiente tumoral (69).

Nesse sentido, a vetorização passiva usufrui das propriedades fisiopatológicas do tecido tumoral para permitir uma maior acumulação no tecido tumoral alvo. Embora os lipossomas convencionais compostos exclusivamente por fosfolípidos naturais apresentem

atividade, têm sido feitos esforços com o objetivo de melhorar as suas características e funcionalidades, uma vez que estes continuam a ser absorvidos e eliminados pelo sistema reticulo-endotelial (SRE) *in vivo* (6).

Para tal, os sistemas de transporte de fármacos devem possuir três características principais: dimensões bastante inferiores a 400 nm para permitirem uma extravasão eficaz através das fenestrações da vasculatura, superiores a 10 nm para evitarem a filtração pelos rins, e inferiores a 100 nm para evitarem a captura específica pelo fígado. Assim sendo, de um modo geral, os nanossistemas utilizados para a entrega de fármacos possuem dimensões entre 10 e 100 nm. Além disso, a carga da partícula deve ser neutra para permitir uma evasão eficiente à eliminação renal e os nanocarregadores devem possuir características que minimizem o seu reconhecimento pelo SRE, que destrói material exógeno através de opsonização e fagocitose (70).

Com o objetivo de combater a rápida remoção dos lipossomas da circulação sanguínea tem sido investigada a modificação dos componentes dos lipossomas com vista a aumentar a sua biodisponibilidade (6). Nos lipossomas *stealth* há uma modificação da conformação da superfície pela adição de gangliósidos ou derivados do polietilenoglicol (PEG) à estrutura da bicamada fosfolipídica (11,60,71–75). Tal como se pode observar na figura 3.7, os lipossomas “*stealth*” são caracterizados por uma âncora hidrofóbica formada por fosfolípidos, ácidos gordos ou colesterol; um conector, constituído por grupos fosfato, éster, amidas entre outros; e um polímero hidrofílico, tal como polietilenoglicol, ácido poliamino, entre outros (76).

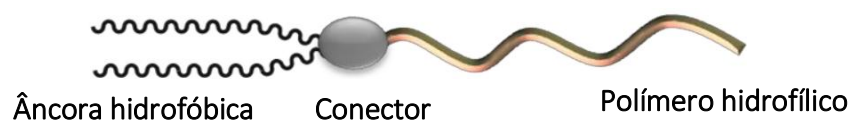


Figura 3.7 - Esquematização da constituição de um lipossoma "stealth". Adaptado de *Surface engineering of liposomes for stealth behavior*, 2013 (76).

Estes lipossomas possuem uma cadeia flexível que ocupa o espaço imediatamente adjacente à superfície do lipossoma, excluindo outras moléculas deste local e, de entre as várias vantagens que possuem (tabela 3.2), previnem que as opsoninas presentes no plasma sanguíneo se liguem à superfície do lipossoma e que este seja reconhecido e eliminado pelo

sistema imunitário, prolongando o seu tempo de semi-vida (76). Vários estudos têm concluído assim que a conjugação de PEG aos lipossomas reduz o reconhecimento pelos fagócitos, melhora os parâmetros farmacocinéticos, aumenta a estabilidade biológica, diminui a rápida eliminação do organismo pelo SRE e prolonga o tempo de circulação do fármaco. Adicionalmente, os lipossomas com PEG exibem um aumento do EPR dos nanolipossomas através dos espaços existentes na vasculatura do tumor em modelos animais de tumores (64).

Tabela 3.2 - Vantagens da utilização de lipossomas vetorizados passivamente (11,54,60,71–75).

Vantagens da utilização de lipossomas vetorizados passivamente
-Diminuição do reconhecimento pelo sistema imunitário;
-Diminuição da absorção não específica pelas proteínas do soro;
-Aumento do tempo de semi-vida;
-Redução da <i>clearance</i> ;
-Prolongamento do tempo de circulação;
-Aumento da estabilidade do lipossoma;
-Redução da toxicidade relativa;
-Aumento da eficácia de encapsulação.

Este tipo de lipossoma de vetorização passiva tem alcançado efeitos satisfatórios em diversos ensaios realizados (11,60,71–75). No entanto, há que ter em conta que a densidade em PEG determina a estrutura do lipossoma (54). APEGuilação excessiva poderá afetar o balanço de hidrofília e hidrofobia, quebrando a integridade da superfície da bicamada lipídica, enquanto uma baixa concentração de PEG poderá aumentar a captação pelo SRE com consequente eliminação renal e, por isso, a aplicação clínica das formulações é essencial para perceber a sua viabilidade *in vivo* (64). Nesse sentido, são apresentados em seguida alguns dos estudos referentes à aplicação deste tipo de lipossomas na terapêutica do CCR.

Testou-se a eficácia de lipossomas convencionais compostos por fosfatidilcolina de soja hidrogenada e colesterol carregados com paclitaxel (PTX) (90:10:8, rácio molar) perante lipossomas PEG carregados com PTX mas desta vez constituídos por fosfatidilcolina de soja hidrogenada, colesterol edistearoil de fosfatidiletanolamina-N-poliétilégnoglicol (DSFE-PEG) na sua composição (90:10:5:8) com uma dimensão de 100 nm e preparados por hidratação do filme hídrico. Quando testados as células C26, características de carcinoma colorretal, inoculadas em ratinhos os resultados mostraram um aumento na estabilidade *in vivo*, na entrega do fármaco no tecido tumoral e do efeito anticancerígeno (77).

Quando testada a formulação lipossomal DSFE-PEG carregada com oxaliplatina em linhas celulares de CCR (SW480) verificou-se uma indução da resposta por apoptose comparativamente à mesma dose do fármaco livre, graças à acumulação preferencial no tecido tumoral, induzida pela formulação lipossomal com PEGuilação(78). A mesma oxaliplatina foi encapsulada em lipossomas de distearoilglicerofosfoetanolamina e polietilenoglicol (DSPE-PEG), com dimensão média de 152 nm e foi feita uma análise *in vitro* e *in vivo*. Pela análise *in vitro*, observou-se que estes lipossomas aumentam a captação celular de forma prolongada no tempo e induzem a resposta apoptótica comparativamente à formulação lipossomal convencional. Após administração dos lipossomas ao modelo animal houve um efeito positivo no tempo de sobrevivência à doença, quer pela tendência para o lipossoma se acumular no tecido tumoral e ser captado por células endoteliais quer por ter havido indução de apoptose com redução do volume tumoral e por isso verifica-se uma associação favorável entre a utilização da formulação lipossomal e o efeito de retenção junto das células tumorais (55).

Messerer et al., (2004) testaram a utilização de lipossomas de 1,2-distearoilglicerol-3-fosfocolina (DSGFC) e colesterol em células tumorais (LS180) e de metástases coloretais (LS174T), que foram inoculadas em ratinhos para fazer uma análise *in vivo*. A formulação lipossomal de DSGFC/colesterol (55:45 rácio molar) com dimensão média de 115 nm conferiu uma proteção à hidrólise que inativa a forma carboxilada, com libertação constante durante 24 horas o que implicou uma alta exposição das células ao fármaco e uma eliminação muito menor comparativamente ao fármaco na forma livre e na mesma dose. Em comparação com o irinotecano livre, a formulação lipossomal foi significativamente mais efetiva não só para o CCR mas também no modelo desenhado para simular metástases localizadas ao nível do fígado pelo aumento do tempo médio de sobrevivência comparativamente quer à ausência de tratamento quer à utilização do fármaco livre (66).

Os lipossomas PEG têm sido utilizados como veículo na entrega de agentes terapêuticos como a doxorubicina (Dx) e a daunorubicina e encontra-se em vários estados de ensaios pré-clínicos e clínicos, por apresentarem inúmeras vantagens (6). A eficácia da Dx é limitada pelos efeitos adversos e a resistência que adquire graças ao efluxo de fármacos graças à glicoproteína-P (Pgp). Vários fatores afetam esta proteína, entre eles o conteúdo em colesterol na membrana plasmática, o que é essencial para manter a função da bomba de efluxo. A linha celular característica de CCR, HT29-dx, possui elevado efeito de resistência

a este fármaco pelo elevado conteúdo em colesterol na sua membrana plasmática com uma atividade da Pgp aumentada. Sabe-se que a sinvastatina é um fármaco responsável pela diminuição da síntese de colesterol e aumento da síntese dos recetores de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) com consequente diminuição da atividade da Pgp em células resistentes (79). Foram preparados lipossomas aniónicos contendo fosfatidilglicerol, PEG, colesterol, dimiristoilfosfatidilcolina e dimiristoilfosfatidilglicerol (4.2:11.4:15.2:11.4, 29 mg total de lipídios) incubados com 1.5 mmol/L de Dx. Para produzir os lipossomas conjugados apoB100 (“apo-Lipodox”), o péptido humano apoB100 foi sintetizado e inserido, obtendo-se um lipossoma com um cerca de 75 nm. Este apresenta características que lhe permitem ligar-se a recetores de LDL, pelo que nesta análise *in vitro* verificou um aumento na internalização nas células com resistência à Dx. Por outro lado, a sua eficácia foi aumentada pela sinvastatina, uma vez que propicia a sobre expressão de recetores LDL reduzindo a atividade da Pgp e consequentemente o efluxo do fármaco. Assim sendo, propõe-se que a associação entre formulações lipossomais de Dx e estatinas possa constituir uma estratégia promissora na reversão da resistência de células cancerígenas a fármacos (79).

Fanciullino et al. (2007), descreveram que o colesterol e o PEG conferem rigidez à membrana, podendo ser utilizados para reduzir a taxa de libertação de 5-Fluorouracilo (5-FU) a partir do lipossoma e aumentar a sua biodisponibilidade (56). A sobreexpressão de timidilatosintase (TS) tem sido associada à resistência ao 5-FU em pacientes com CCR. Nesse sentido, Fanciullino et al. (2007) testaram a aplicação de um lipossoma *stealth* onde combinaram 5-FU e 2'-desoxiinosina (d-Ino). D-Ino é um precursor não-tóxico do cofator da TS, desoxirribose 1-fosfato, que tem demonstrado aumentar a atividade anti-proliferativa do 5-FU em linhas celulares de CCR resistentes ao 5-FU. Criaram-se lipossomas *stealth* duplos compostos por fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, colesterol e PEG (7.3, 0.73, 1.43, 0.47, rácio molar) que permitiam a encapsulação tanto de 5-FU como do seu modelador, d-Ino em lipossomas homogéneos com um diâmetro de cerca de 100 nm, com vista a obter uma libertação controlada. A combinação terapêutica permite evitar uma das principais causas de falhas terapêuticas, a aquisição de resistências, pela ativação mais efetiva do pró-fármaco em metabolito ativo, interferindo com a enzima e aumentando tanto a morte celular como a apoptose. Os estudos foram levados a cabo em linhas celulares de CCR resistentes a 5-FU (CCL227) que sobreexpressam TS, mas quando expostos à formulação viram a atividade da enzima timidilatosintase reduzida em 98%. A injeção da formulação lipossomal em ratinhos

permitiu complementares resultados com uma análise *in vivo*, a qual conduziu a níveis sistematicamente aumentados de fármaco, com tempo de permanência superior ao fármaco na forma livre, e aumento significativo na eficácia do tratamento com consequente aumento na sobrevivência dos animais, o que sugere uma reversão na resistência à quimioterapia. Comparando os resultados com o grupo controlo verificou-se um aumento da sobrevivência em 94% para os animais tratados com a formulação lipossomal (56).

Brusa et al. (2007) testaram a aplicação de lipossomas contendo derivados de gemcitabina em ratinhos inoculados com células HT-29, as quais derivam de adenocarcinoma coloretal, o que despoletou crescimento tumoral a nível colo-retal. Neste estudo *in vivo* verificou-se que a formulação lipossomal apresentou atividade terapêutica, já que se verificou uma diminuição da massa tumoral e aumento na percentagem de regressão do tumor, em ratinhos inoculados com células HT29. Esta atividade terapêutica dos lipossomas pode ser atribuída ao elevado tempo de semi-vida e à lenta libertação através da formulação lipossomal, pelo que se extrapula que a modificação química da gemcitabina e a sua encapsulação em sistemas de libertação pode ser considerada uma abordagem anti-tumoral versátil contra diversos tipos de tumores (80).

Além disso, têm sido realizadas investigações em agentes cujos efeitos terapêuticos ainda levantam algumas questões. É exemplo disso a curcumina, um composto pró-apóptico com efeito antiproliferativo contra uma variedade de tumores *in vitro* por inibição da angiogénese e potenciação do efeito anti-tumoral de agentes quimioterápicos como a doxorrubicina, cisplatina e paclitaxel. Este composto é fracamente absorvido a nível gastrointestinal e por isso a sua utilização clínica é limitada. No entanto, graças à formulação lipossomal de 1,2-dimiristoilglicerofosfolina/colesterol e 1,2-dimiristoilglicerofosfoetanolamina-PEG-2000 num rácio com curcumina de 10:1 e diâmetro inferior a 220 nm, a sua utilização torna-se possível. Em estudos prévios comprovou-se o efeito anti-tumoral contra linhas celulares de CCR e quando inoculadas linhas celulares de CCR Lovo e Colo205 em ratinhos foi possível fazer uma análise *in vivo*, a qual revelou maior biodisponibilidade devida à administração intravenosa, sem toxicidade para o hospedeiro e com efeitos secundários mínimos (81).

Ainda como terapêutica adjuvante, testaram-se formulações lipossomais de fosfolbuprofeno, uma substância que inibe o crescimento de células cancerígenas em ratinhos. Pelo método clássico de hidratação do filme lipídico, prepararam-se lipossomas de sal de

amónio de DSPE-PEG com uma dimensão de 78 nm. Analisou-se a aplicação da formulação lipossomal deste composto em células características de CCR (SW480, HCT116 e HT-29) e posteriormente foram inoculadas no modelo animal. Pela análise *in vivo* verificou-se que o fármaco na forma livre foi rapidamente metabolizado enquanto a formulação lipossomal se revelou resistente à ação hidrolítica mediada por esterases. O lipossoma foi mais efetivo na inibição do crescimento do CRC em ratinhos, graças à otimização do perfil farmacocinético com atenuação da citotoxicidade em células normais, o que sugere que a formulação lipossomal atinge preferencialmente o alvo celular de interesse (82).

Posto isto, têm vindo a ser estudados em ensaios clínicos lipossomas vetorizados passivamente por apresentarem não só alta eficácia de encapsulação mas também prolongadas taxas de libertação (55).

3.2.1.2. Lipossomas vetorizados ativamente

Os lipossomas de vetorização passiva foram desenvolvidos com o objetivo de evitar a eliminação reticuloendotelial e aumentar a acumulação no tecido tumoral. No entanto, o seu tempo de circulação e a sua acumulação são influenciados pela condição fisiopatológica do organismo(6). Nesse sentido, novos estudos foram desenvolvidos com vista a construir sistemas que permitam ao lipossoma migrar para o órgão alvo e libertar o agente anticancerígeno, baseando-se na adesão de ligandos específicos da superfície dos lipossomas a marcadores da superfície de células patológicas (83,84).

Estes lipossomas, vetorizados ativamente, são formulados para se ligarem a anticorpos, péptidos, resíduos de glicósidos, hormonas e recetores. Assim sendo, a modificação da superfície dos lipossomas com ligandos específicos, tais como anticorpos monoclonais, péptidos, ácido fólico e transferrina, podem aumentar a eficácia dos lipossomas. Sem irrigação sanguínea, a sobrevivência do tumor fica comprometida e, nesse sentido, a vetorização para fatores de crescimento vascular pode ter um impacto significativo no benefício clínico (11).

O recetor da transferrina (TfR) é sobre expressado em muitos tipos de cancro e, por isso, é uma molécula atrativa para a terapêutica anticancerígena vetorizada, permitindo uma entrada mediada por endocitose, com aumento das concentrações de fármaco intracelular, inibição de crescimento tumoral superior e prolongamento da sobrevivência. Estudos *in vivo* e

in vitro verificaram que a conjugação de transferrina com lipossomas encapsulando Dx teve efeitos otimizados em células de adenocarcinoma CR (Lovo) (85).

A família das proteínas de adesão celular, como as integrinas, apresenta um papel importante na promoção da proliferação celular, angiogénese tumoral e metástase e, por isso, estas proteínas podem ser utilizadas como alvos na vetorização ativa de lipossomas (69,86).

Também a neurotensina e o recetor 1 da neurotensina têm sido identificados como fatores de promoção do crescimento tumoral e metastização (87). A funcionalização de lipossomas com péptidos de neurotensinas aumenta significativamente a capacidade dos lipossomas entregarem citotóxicos em células de CCR com aumentos consideráveis na citotoxicidade (88).

O recetor do fator de crescimento epidermal (EGFR/HER) e o recetor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) encontram-se sobre expressos em vários tipos de cancro, entre eles o CCR. Imunolipossomas Anti-HER2 e anti-VEGFR representam uma nova ferramenta para a segurança e eficácia da imunoquimioterapia em cancros gastrointestinais HER2 ou VEGFR positivos (89–91).

Park et al. (2002) analisaram imunolipossomas anti-HER2. Estes combinam a vetorização tumoral de anticorpos monoclonais com propriedades da formulação lipossomal que otimizam a farmacocinética e libertação do fármaco, com tempos prolongados de circulação. Utilizaram-se lipossomas compostos por fosfatidilcolina e colesterol, preparados por hidratação de filme lipídico com dimensões médias de 100 nm. Os fragmentos de anticorpos monoclonais (ACm) foram obtidos por recombinação e conjugados à superfície do lipossoma graças a ligações tioéter. Os imunolipossomas analisados anti-HER2 apresentaram resultados favoráveis relativos ao crescimento tumoral, regressão e cura, pelo facto dos imunolipossomas se ligarem e se internalizarem eficientemente em células que sobre-expressam HER2, o que conduz a uma libertação de fármaco a nível intracelular. Desta forma se comprovou que a encapsulação de doxorrubicina em imunolipossomas é possível, aumenta o índice terapêutico e a eficácia antitumoral, reduzindo os efeitos tóxicos sistémicos (92). Embora a maioria dos estudos demonstrem taxas de sobre expressão a nível membranar relativamente baixas, verifica-se uma sobre expressão citoplasmática de HER2 significativa em pacientes com CCR, pelo que esta estratégia deverá ser explorada uma vez que poderá representar um futuro promissor na terapêutica da doença (93).

Mamot et al. (2005) testaram a aplicação de imunolipossomas vetorizados para o recetor do fator de crescimento epidermal (EGFR/HER) contendo doxorrubicina. Estes lipossomas, compostos por DSGFCe colesterol (rácio molar 3:2) com DSPE-PEG foram produzidos por hidratação do filme lipídico seguido de extrusão. Estes lipossomas com um tamanho entre 80 e 100 nm foram covalentemente ligados a fragmentos de ACm C225 derivado de cetuximab e carregados com Dx. Por se tratar de imunolipossomas permitem uma ligação e internalização pelas células tumorais que sobreexpressam este recetor, com libertação intracelular do agente anticancerígeno. Utilizaram-se fragmentos do anticorpo (Fab) do cetuximab ligados covalentemente a lipossomas e, pelo facto de o nível de internalização celular ter sido superior para os imunolipossomas, conclui-se que esta é uma estratégia que permite a entrega efetiva de fármaco representando avanços promissores em terapêuticas futuras para tipos de cancro em que ocorre sobre-expressão de EGFR (94).

Vários estudos têm revelado que imunolipossomas contendo fragmentos de anticorpos monoclonais humanizado, anti-EGFR (EMD72000) permitem uma entrega de fármaco eficiente a nível intracelular, em casos de sobreexpressão de EGFR em células de CCR. Nesse sentido, Mamot et al. (2006) construíram lipossomas compostos por maleimida-DSPE-PEG2000 contendo fragmentos de matuzumab (EMD72000) ou cetuximab (C225) ligados por ligações covalentes. Os resultados mostraram que os imunolipossomas vetorizados para o EGFR ao contrário dos lipossomas não vetorizados foram eficazmente ligados e internalizados por células de CCR que sobreexpressavam EGFR. Cumulativamente, verificaram que a ligação do fragmento de anticorpo a uma cadeia de PEG longa resultou no aumento da captação do imunolipossoma. Desta forma se conclui que a formulação lipossomal contendo Dx e o anticorpo é significativamente mais citotóxica do que o lipossoma não vetorizado, ou quando testada em células que não sobre expressavam EGF e, portanto imunolipossomas vetorizados para EGFR com origem em anticorpos monoclonais humanizados possuem vetorização ativa em células de CCR que sobre expressam EGFR (95).

Zalba et al. (2015) testaram a utilização de lipossomas, compostos por fosfatidilcolina hidrogenada:colesterol:DSPE-PEG2000:DSPE-PEG2000-maleimida (1.85:1:0.12:0.03, rácio molar) e com diâmetro de cerca de 100 nm carregados com oxaliplatina e, por ligação tioéter, conectados ao fragmento de cetuximab. Nas células que sobre expressam EGFR a libertação de fármaco a nível intracelular aumentou até 3 vezes do que com lipossomas não vetorizados. A captação específica pelo recetor foi demonstrada por competição com o fármaco na forma

livre, para o qual se verifica uma redução nos níveis de internalização, semelhantes aos fármacos não vetorizados. Relativamente ao modelo animal, foram utilizadas linhas celulares de CCR que expressam EGFR e a libertação de fármacos foi altamente aumentada graças às formulações vetorizadas. Quando conjugados com fragmentos monovalentes CTX-Fab, verificou-se a maior acumulação a nível do tecido tumoral, quando comparado com os lipossomas não vetorizados. Desta forma conclui-se que o lipossoma vetorizado que encapsula oxaliplatina contém fragmentos de CTX permite aumentar a seletividade da terapêutica com conseqüente aumento da eficácia (96). Além disso, outros estudos têm suportado o facto de imunolipossomas contendo CTX serem mais captados em células de CCR que sobre-expressam EGFR comparativamente com lipossomas não vetorizados, o que vem dar suporte à premissa de que esta abordagem terapêutica deve ser aprofundada em investigações contínuas (97).

Koning et al. (1999) testaram a aplicação de gangliósidos, PEG e o anticorpo monoclonal CC52 específico para o antígeno CC531 das células tumorais de CCR. Foram criados lipossomas compostos por fosfatidilcolina e colesterol de cerca de 180 nm nos quais se carregou o pró-fármaco do 5-FU. A este lipossoma foi anexado um grupo PEG ou um gangliósido e o anticorpo monoclonal CC52 (IgG1) foi acoplado ao lipossoma por um método de ligação sulfidril-maleimida. Os dados demonstram que a aplicação de lipossomas com PEG é mais vantajosa do que com gangliósidos, uma vez que o soro possui na sua constituição natural anti-corpos para os gangliósidos, o que facilita a sua remoção. Além disso, verificou-se uma eficácia antiproliferativa superior em lipossomas contendo o anticorpo monoclonal específico para células tumorais de CCR na sua superfície. Neste estudo, encontrou-se uma formulação lipossomal capaz de entregar o fármaco em células de carcinoma do cólon com alta eficácia e concluiu-se que o estabelecimento de interações mais fortes entre o lipossoma e as células tumorais, pela presença de anticorpo, resultam num aumento da eficácia anti-proliferativa (98). Estudou-se a eficácia terapêutica da formulação lipossomal contendo o derivado anfifilicodipalmitoil do 5-fluorodesoxiuridina em células de CCR (CC53) comparativamente ao fármaco na forma livre ou à formulação lipossomal não vetorizada. Os imunolipossomas causaram um poder de inibição cerca de 13 vezes superior durante um tratamento de 72 horas comparativamente à utilização de lipossomas sem anticorpo. A associação de imunolipossomas específicos para células tumorais apresentou um efeito dez vezes superior à ausência de anticorpo ou com um IgG irrelevante, o que demonstrou que

existem interações específicas entre os lipossomas e o alvo celular, permitindo uma eficiente entrega de fármaco a nível intracelular. Os resultados evidenciam que a entrada de fármaco envolve a transferência direta do pró-fármaco a partir do imunolipossoma graças à membrana celular, durante as interações específicas entre as células, seguida de hidrólise originando altos níveis de metabolito ativo intracelularmente, alcançando-se o objetivo de uma terapêutica mais direcionada e seletiva (98).

3.2.1.3. Lipossomas com propriedades especiais

Este tipo de lipossomas inclui aqueles que apresentam mecanismos de resposta a determinados estímulos. Estes lipossomas são sensíveis ao pH, à temperatura ou a campos magnéticos (11,58). Embora a *PEGuilação* aumente o tempo de circulação do lipossoma e a acumulação de fármacos no tecido, a vetorização para o alvo e libertação do conteúdo ainda não é totalmente controlada pelos lipossomas PEG, por isso têm sido feitos esforços para desenvolver lipossomas cuja libertação de fármaco seja despoletada por mudanças fisiológicas (6).

Os lipossomas termosensíveis (TSLs) são uma ferramenta promissora para a libertação controlada de fármacos, em combinação com hipertermia local. TSLs de longa circulação associados a hipertermia local podem ser capazes de entregar no tecido tumoral, duas a seis vezes mais agente do que os lipossomas por si só ou o fármaco na forma livre, o que resulta numa inibição do crescimento do tumor e aumento do tempo de sobrevivência(99). Casadó et al. (2014) desenvolveram um TSL com resultados promissores associados às vantagens do sistema de libertação do fármaco, neste caso, o irinotecano, em modelos de células de CCR (100).

A procura por lipossomas com habilidades acrescidas no fornecimento intracelular de agentes terapêuticos resultou no desenvolvimento de lipossomas sensíveis ao pH, os quais representam potenciais aplicações no tratamento de doenças no trato digestivo tal como tumores ou tecidos inflamados, carateristicamente mais ácidos que os tecidos saudáveis (6). Exemplo disso são os lipossomas convencionais derivados da fosfatidiletanolamina (DOPE) sensíveis ao pH. As alterações na conformação da cadeia do polímero resultam na destabilização dos lipossomas em meio ácido com fusão da vesícula e libertação do material encapsulado. Desta forma é possível efetivar uma entrega de fármaco com aumento de apoptose e maior potencial terapêutico. Uma nova geração de lipossomas sensíveis ao pH

que emprega lípidos sensíveis ao pH recorre a derivados do ácido maleico poliestireno e tem revelado eficácia promissora na entrega de agentes em células cancerígenas (101).

Outra abordagem importante é a combinação de lipossomas sensíveis ao pH com recetores da superfície de células cancerígenas sobreexpressadas, a qual resulta em vetorização no combate a células com características específicas. Garg e Kokkoli (2011) demonstraram que lipossomas PEG sensíveis ao pH e vetorizadas com ligandos específicos para as integrinas, sob condições acídicas, se ligam preferencialmente a células CT26 que sobre-expressam integrinas. Esta ligação ocorre com taxas de internalização e entrega do fármaco intracelularmente superiores, quando comparado com outras formulações (102).

Outras abordagens têm sido investigadas para explorar diferentes tipos de lipossomas no tratamento do cancro GI com vista a aumentar a especificidade dos sistemas de transporte de fármacos (6). É exemplo disso, a injeção de fármacos anticancerígenos, tal como o doxetacel em magnetolipossomas seguido de exposição a corrente alternada, campo magnético e hipertemia local, com vista a obter efeitos positivos com redução da quantidade de fármaco necessária para causar inibição do crescimento do tecido oncológico (103).

Também os ultrassons têm sido utilizados para desencadear a libertação da cisplatina a partir de lipossomas estericamente estabilizados, com libertação seletiva no tecido tumoral, resultando em regressão do tumor colorectal (104).

Atualmente a imagiologia molecular é a aplicação mais comum para a medicina nuclear na manutenção do cancro (6). Recentemente têm sido feitos vários esforços para progredir na investigação de lipossomas com agentes radioquimioterapêuticos e radioimagiológicos. Também para este tipo de aplicação, os lipossomas são carregados com agentes com atividade comprovada e graças às propriedades dos lipossomas de aumento de retenção e vetorização para as células tumorais, os efeitos obtidos são melhorados. Como exemplo desta aplicação, podem referir-se o caso do lipossoma PEG contendo rénio na sua constituição e encapsulando ^{186}Re que se mostrou efetivo na radioquimioterapia de modelos de CCR (105).

A tenascina-C é uma matriz extracelular de glicoproteínas altamente expressa em meios ambientes de vários tumores sólidos, incluindo o CCR, ao contrário de tecidos maduros. Estudou-se um modelo animal de CCR, conhecido por expressar bastante tenascina-C para testar o sistema lipossomal constituído por sulfatido e dioleoilglicerofosfetanolamina. Sob pH fisiológico, a estrutura confere estabilidade a lipossomas contendo sulfatido,

presumivelmente pela hidratação da carga negativa do sulfato glicosfingolípido. Graças às propriedades fluorescentes da Dx, estudou-se a captação celular e, comparativamente aos controlos, verificou-se um aumento na retenção *in vitro* da formulação, e *in vivo* a minimização dos efeitos secundários limitantes da terapêutica, isto é, cardiotoxicidade e mielosupressão, redução da taxa de clearance, com aumento consequente da biodisponibilidade do fármaco e, portanto, da eficácia terapêutica (106).

Pelo facto de este estudo permitir observar a distribuição no tecido, verificou-se que existe uma captação celular pelas células de CCR, com elevada retenção 24 horas depois. Graças aos resultados obtidos e sabendo que a aquisição de resistências e intolerância ao fármaco são, muitas vezes, causas de falha terapêutica, conclui-se que esta pode ser uma estratégia a adotar para ultrapassar tais situações. Além disso, enquanto os lipossomas PEG se acumulam preferencialmente na pele, o que causa maior toxicidade cutânea, tal como o síndrome palmar-plantar, com esta formulação ultrapassa-se essa situação. Além disso, tendo em conta que a produção de tenascina-C aumenta a capacidade do tumor metastizar através de micro colónias que lhe permitem sobreviver e expandir, vetorizar a terapêutica para a tenascina oferece uma perspectiva de minimização das metástases distantes, tão comuns no CCR (106).

Novos estudos têm sido elaborados visando a aplicação da quimioterapia por via intraperitoneal (IP). Alguns autores defendem que esta abordagem é uma forma efetiva de tratamento peritoneal de carcinomatoses do CCR após completa citoredução. Os requisitos para um bom sistema de libertação nesta técnica incluem alta concentração de fármaco no local e a sua manutenção por longos períodos de tempo, em combinação com baixa toxicidade não específica. Analisando a aplicação de lipossomas neste tipo de administração, verificou-se que os lipossomas apresentam uma rápida clearance da cavidade abdominal. No entanto, alterando a composição e as características dos lipossomas, como a composição lipídica, as propriedades da superfície e a carga, é possível aumentar a sua retenção na cavidade abdominal (107,108). Ainda neste âmbito, verificou-se que a mudança no tipo de fosfolípido não apresentou efeitos no tempo de retenção da cavidade abdominal enquanto a incorporação de PEG na membrana do fosfolípido mostrou uma retenção de cerca de 30% superior comparado com o mesmo lipossoma sem PEG. Este efeito foi atribuído à capacidade de escapar à captura macrofágica por macrófagos presentes na cavidade peritoneal (109).

A combinação de anticancerígenos lipossomais com outros fármacos na forma livre ou lipossomal têm mostrado atividade anticancerígena sinérgica (6). São vários os estudos que defendem que o sinergismo de 5-fluorouracilo (5-FU) e irinotecano é superior ao efeito aditivo farmacológico. Embora o mecanismo exato deste sinergismo ainda não esteja esclarecido, acredita-se que o irinotecano recruta células na fase S aumentando a incorporação do 5-FU no ADN e a conseqüentemente apoptose da célula. Nesse sentido, prevê-se que a entrega de fármacos no mesmo lipossoma pode ajudar a coordenar a libertação do fármaco nas células (110).

Diferentes formulações lipossomais para diferentes agentes cancerígenos têm sido estudadas e vários são os exemplos que demonstram a sua capacidade para sensibilizar as células humanas de CCR (6).

As conclusões obtidas poderão ser importantes para novas abordagens terapêuticas ao CCR, as quais devem englobar uma análise do tipo de lipossoma, dos alvos terapêuticos e dos efeitos pretendidos, perante resultados *in vitro* e *in vivo*, tal como se pode verificar na figura 3.8 (54).

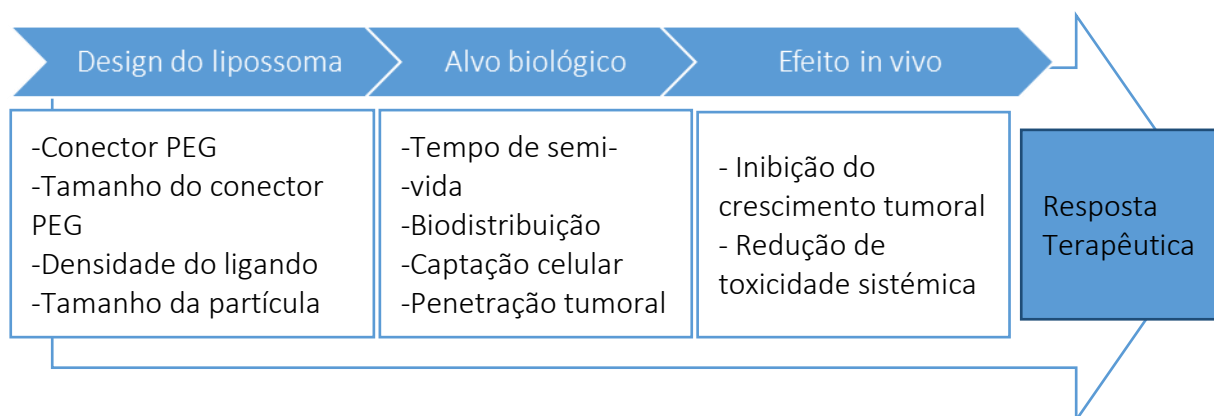


Figura 3.8- Fatores críticos nos lipossomas que afetam o efeito biológico e o resultado terapêutico. Adaptado de Noble et al. (2014) (54).

Desde a aprovação do irinotecano, em 1996, a combinação por administração intravenosa com 5-FU e leucovorina tem-se tornado a quimioterapia padrão, tanto sozinha como em combinação com fármacos vetorizados para agentes biológicos, tais como o bevacizumab e com os inibidores dos recetores do fator de crescimento epitelial. E, desdeentão, muita investigação tem sido feita com vista a melhorar a quimioterapia no combate a esta patologia (45,111–113).

Os lipossomas, como novos transportadores de fármacos, fornecem boas características de vetorização, um potencial de libertação lenta, alta estabilidade e baixa toxicidade em função da modificação da superfície do lipossoma. Estas alterações conduzem a alterações na distribuição biológica do agente anti-tumoral, reduzem ou revertem a resistência das células tumorais e aumentam a eficácia dos agentes terapêuticos, pelo que a contínua investigação nesta área é essencial para melhorar e otimizar a terapêutica anti-cancerígena (11).

Capítulo 4

Aplicação clínica de lipossomas na terapêutica do cancro colo-retal

As publicações incluindo lipossomas têm início na década de 60, com um total superior às dezenas de milhares e centenas de ensaios clínicos desenvolvidos. Ao longo dos anos a utilização de lipossomas tem sido investigada com vista à sua aplicação em terapêuticas anti-cancerígenas, anti-fúngicas, antibióticas, entrega de genes, anestésicos e anti-inflamatórios. Das muitas inovações em nanomedicina atualmente investigadas que melhoram a fraca solubilidade e a farmacocinética, diminuindo os efeitos secundários de muitos citotóxicos, apenas cerca de 5% dos que iniciam os ensaios clínicos chegam ao mercado (45).

Os sistemas lipídicos foram os primeiros a experimentar a transição do conceito para aplicação clínica e são atualmente considerados tecnologia com aceitação a nível de aplicação clínica (114). Formulações lipossomais de doxorubicina e daunorrubicina têm alcançado aprovação para aplicação clínica, enquanto muitos outros permanecem em ensaios clínicos (66). A existência de ensaios clínicos em curso que averiguam a utilização de formulações lipossomais no tratamento do CCR proporciona confiança na investigação e desenvolvimento de novos lipossomas com diferentes componentes ou novas formulações. É nesse sentido que serão apresentados alguns dos casos de sucesso de sistemas lipossomais estudados para esta patologia e que serão abordados seguidamente.

Doxil[®]

Comercializado como Caelyx[®], Myocet[®] ou Doxil[®], foi o primeiro lipossoma a ser aprovado pela FDA (115). Trata-se de uma preparação lipossomal de doxorubicina (Dx) que resulta em exposição farmacológica prolongada *in vivo*, sendo indicado para o tratamento de cancro do ovário e em combinação com Bortezomib, para o tratamento de pacientes com mieloma múltiplo (116).

Foi efetuado um ensaio clínico de fase II em pacientes com CCR avançado, para testar a eficácia desta formulação nesta patologia. Administrou-se intravenosamente a cada 3 semanas, e os cerca de dezassete pacientes que participaram no estudo receberam uma média de dois ciclos de tratamento. No entanto, embora a melhor resposta obtida tenha sido a estabilização da doença, um dos pacientes recebeu a terapia durante 17 ciclos e a sua

doença progrediu. Verificou-se que a terapêutica foi no geral bem tolerada, no entanto não se alcançou a eficácia desejada no tratamento deste grupo de pacientes, sendo necessário aprofundar o estudo desta formulação e a sua resposta no tratamento de doenças cancerígenas (117).

Em 2010, foi desenvolvido um ensaio clínico de fase I com a infusão arterial hepática de cisplatina em combinação com a administração intravenosa de Dxlipossomal em pacientes com cancro avançado e envolvimento maioritário no fígado. Neste estudo analisou-se o efeito desta combinação em 8 pacientes com CCR, no entanto os resultados obtidos para este tipo de cancro não se revelaram promissores (118).

Atualmente existem vários ensaios clínicos utilizando esta formulação lipossomal, mas nenhum deles é diretamente direcionado para a aplicação em CCR.

ThermoDox®

Um dos exemplos de sucesso nas abordagens de libertação desencadeada por estímulos é a associação de hipertemia ao ThermoDox®, uma formulação lipossomal de Dx que liberta o fármaco em resposta a um estímulo desencadeante hipertérmico ligeiro (114).

Em 2013, ThermoDox® encontrava-se em fase II de ensaios clínicos para metástases de CCR no fígado em combinação com radiofrequência de ablação (RFA) e em fase III de ensaios clínicos para carcinoma hepatocelular, também em combinação com RFA e em fase I em mulheres com cancro da mama recorrente (114). No estudo de fase II desenvolvido e que teve como propósito a determinação de segurança e eficácia da formulação, averiguou-se a possibilidade de utilizar ThermoDox® como adjuvante na terapia com ablação termal no tratamento de CCR metastizado (CCRm), no entanto este estudo foi terminado (119).

Atualmente, a Universidade de Oxford encontra-se a desenvolver um estudo intervencional de fase I com a finalidade de investigar a viabilidade da libertação no alvo de ThermoDox® usando ultrassom focalizado em pacientes com metástases no fígado de origem em tumores primários no pulmão, mama ou colo-retal. Este estudo de biodisponibilidade, *open-label*, cujo objetivo principal é o tratamento, iniciado em Junho de 2014 e com duração prevista de dois anos, propõe a administração de um agente citotóxico de largo espectro, a Dx, cuja aplicação especialmente formulada é ativada por hipertermia suave, com vista a alcançar concentrações intra-tumorais superiores às obtidas à mesma dose, por via sistémica. Verifica-se que até à data, as abordagens puramente farmacológicas falharam no que é

essencial: entrega de concentrações terapêuticamente ativas dos agentes na vasculatura tumoral, minimizando os efeitos secundários; transportar o fármaco até ao alvo; e melhorar a distribuição e difusão do agente terapêutico contra o gradiente de pressão intra-tumoral com vista a alcançar concentrações no interior do tumor relevantes terapêuticamente. Esta entrega específica de fármaco pela combinação de hipertermia com lipossomas sensíveis à temperatura (TSLs) tem-se revelado promissora na clínica e, nesse sentido, prevê-se que os TSLs multifuncionais se revelem um tópico de importância neste campo (120). Caso este estudo demonstre que a utilização de TSLs desencadeada por hipertermia leve permite uma libertação eficaz no local alvo em sujeitos humanos, poderá originar uma transformação no futuro da quimioterapia na prática clínica, já que recorre a uma ação não invasiva que poderá ser aplicada a vários tumores sólidos (121).

Estes ensaios clínicos foram realizados na sequência de investigações pré-clínicas que vieram comprovar a eficácia na libertação de fármacos recorrendo a este sistema. Segundo Yarmolenko (2010) em ensaios pré-clínicos a formulação de TSLs comercializada como ThermoDox® libertou 80 a 100% do fármaco encapsulado, Dx, entre 20 a 40 segundos a uma temperatura de 41.3° C, com uma libertação mínima de aproximadamente 15% a 39°C (122). Esta rápida libertação proporciona um contraste com a formulação Doxil™ não sensível à temperatura, cujas concentrações máximas de fármaco no tumor são atingidas até 48 horas após o tratamento e a libertação mais lenta, ocorrendo desde alguns dias até semanas (123). Além disso, estudos pré-clínicos recentes levados a cabo em Oxford utilizando ThermoDox® demonstraram que é possível o aumento de captação no local alvo, o que permite uma promissora aplicação desta combinação para alcançar aumento de captação tumoral com dose local equivalente à Dx utilizada em quimioterapia sistémica em sujeitos humanos, a qual está bem estabelecida em relação ao seu perfil de segurança e toxicidade (121).

Nesse sentido, pode concluir-se que a investigação nesta área deve continuar com vista a otimizar esta formulação e obter os resultados pretendidos.

IHL-305

A formulação lipossomal IHL-305 diz respeito a um novo lipossoma PEG contendo irinotecano, um fármaco com evidências terapêuticas no CCR. Atualmente está a decorrer um ensaio clínico de fase I relativo à aplicação desta formulação no tratamento de tumores

sólidos (124). Tendo conhecimento dos resultados deste estudo, poderá ser adequado especular acerca da adequabilidade desta formulação no tratamento do CCR.

Anteriormente, esta formulação foi testada em modelos animais, com resultados satisfatórios, razão pela qual os ensaios progrediram para um nível clínico. Após transplantação subcutânea de linhas celulares cancerígenas de diferentes naturezas para ratinhos, administrou-se por via intravenosa IHL-305 e irinotecano. Em todos os modelos testados, a formulação lipossomal mostrou atividade antitumoral superior à do fármaco livre e, ainda que a dose administrada por via lipossomal tenha sido cerca de oito vezes inferior, obtiveram-se valores de inibição do crescimento do tumor superiores ao obtido pelo fármaco livre contra uma vasta gama de tumores incluindo a linha celular HT-29, característica de CCR e resistente à ação deste fármaco. Uma simples injeção ou duas injeções de IHL-305 em vários esquemas de dosagens também resultaram num efeito antitumoral significativo, com efeito anticancerígeno comparável ao do veículo controlo para doses cerca de cinco vezes inferiores à dose máxima tolerada de irinotecano. Pela análise das concentrações de irinotecano e SN-38, o metabolito ativo deste fármaco, no plasma e nos tumores, revelou-se que para os ratinhos expostos a IHL-305 o irinotecano foi mantido em concentrações superiores, e que a presença de SN-38 no tumor foi prolongada comparativamente com os ratinhos tratados com o fármaco livre. Para além disso, observou-se que a formulação teve um baixo impacto na alteração do peso corporal, uma vez que os lipossomas contendo PEG permitem reduzir os efeitos tóxicos tais como a perda de peso e regular positivamente a dose máxima tolerável dos fármacos, com perfis terapêuticos benéficos comparativamente aos da terapêutica convencional (125). Sabendo que o CCR se trata de um tumor sólido e que os dados pré-clínicos retratam uma eficácia terapêutica em linhas celulares características do CCR, importa analisar os resultados que serão obtidos deste ensaio para, em função disso, analisar qual a viabilidade que esta formulação poderá ter especificamente no CCR.

LE-SN38

A formulação lipossomal LE-SN38 preparada pela mistura de cardiolipina, colesterol, fosfatidilcolina e α -tocoferol e encapsulação de SN-38, um metabolito do irinotecano foi analisada num estudo de fase I em participantes prospetivamente atribuídos em função do genótipo UGT1A1. Os pacientes receberam LE-SN38 por infusão intravenosa durante 90 minutos a cada 21 dias, a menos que se verificasse crescimento tumoral ou intolerância ao

tratamento e analisou-se a taxa de resposta tumoral global após o tratamento com LE-SN38, determinou-se o perfil de segurança da formulação nesta população e avaliou-se a sobrevivência livre de progressão (PFS) da doença e sobrevivência global para os doentes tratados com o objetivo de vir a estabelecer este tratamento como segunda linha em pacientes com CCRm (129). A distribuição farmacocinética do SN-38, o metabolito do irinotecano, revelou-se semelhante tanto nos pacientes WT/WT como nos heterozigotas e LE-SN38 foi bem tolerado em todos os pacientes sem relatos de casos de diarreia ainda que a exposição a SN-38 tenha sido bastante superior com a formulação lipossomal comparativamente à administração de irinotecano (126). A dose estabelecida permitiu avaliar ambos os grupos num estudo de fase II em pacientes com cancro colo-retal (128). Numa fase II de ensaio clínico, testaram-se pacientes com CCRm, no qual participaram 30 pacientes, 16 do sexo masculino e 14 do sexo feminino, com idade média entre os 50 e os 59 anos (129). Não se verificou resposta completa ou parcial, mas em onze pacientes constatou-se estabilização da doença, com uma sobrevivência livre de progressão média de 1,58 meses. Desta forma, concluiu-se que o LE-SN38 não atendeu aos critérios de atividade pré-especificados para PFS e, embora esteja associado a um perfil de toxicidade aceitável, esta formulação, na dose e horário aplicado não mereceu uma avaliação mais aprofundada em tratamento de pacientes com cancro mCCR (130).

Uma notícia divulgada pela FDA, em 2007, avançou que após divulgados os resultados dos ensaios clínicos de fase II para o LE-SN38 se verificou que não foram cumpridos os objetivos e que, por isso, não seriam inseridos novos pacientes neste estudo conduzido pelo *Cancer and Leukemia Group* do *National Cancer Institute*. Por sua vez, a NeoPharm foi aconselhada pela FDA a seguir ensaios clínicos de fase III com este tratamento experimental mas direcionado para o glioblastoma multiforme (131).

Estudos pré-clínicos anteriores demonstraram que SN-38 corresponde ao metabolito ativo do irinotecano (CPT-11), um inibidor da topoisomerase comercialmente disponível como Camptosar® com uma toxicidade cerca de 200 a 2000 vezes superior ao CPT-11. Além deste potencial anticancerígeno promissor, SN-38 tem sido pouco utilizado como fármaco anticancerígeno devido à sua fraca solubilidade em excipientes farmacêuticos e por se converter numa estrutura inativa pela abertura do anel de lactona a pH fisiológico (127). Estudos pré-clínicos revelaram resultados promissores em termos de aumento de citotoxicidade contra várias linhas celulares tumorais e eficácia terapêutica superior

comparativamente a CPT-11. Nesse sentido, a formulação lipossomal de SN-38 (LE-SN-38) com uma distribuição uniforme de tamanho inferior a 200 nm e eficácia de encapsulação superior a 95%, em estudos de estabilidade a longo-prazo indicaram que o LE-SN-38 liofilizado é fisiologicamente e quimicamente estável por 6 meses a uma temperatura de 2 a 8°C (127). Além disso, a NeoPharm efetuou um ensaio pré-clínico de segurança, farmacocinética e eficácia antitumoral para a formulação lipossomal de SN-38, no qual foram administradas múltiplas doses via i.v. e definidas as doses máximas toleradas para cada sexo, em ratos e cães, do qual se concluiu que o LE-SN38 revelou um perfil farmacocinético favorável e cuja administração de doses terapêuticas poderia ser efetivada com segurança (132). Nesse sentido, importa continuar a investigar as potencialidades desta formulação e novos e continuados ensaios clínicos devem ser efetuados com o objetivo de procurar novas e inovadoras terapêuticas adaptadas a cada tipo de cancro.

CPX-1

O CPX-1 é um outro exemplo de formulação lipossomal promissora para aplicação na terapêutica do CCR (69,114). Baseado no potencial das vantagens dos rácios sinérgicos, foi desenvolvido o CPX-1, uma formulação lipossomal com rácio molar sinérgico de 1:1 de irinotecano e floxuridina (5-fluorodesoxiuridina) (133). Trata-se de uma formulação de administração intra-venosa cujas bases terapêuticas assentam em fármacos aprovados para o tratamento do CCR (68,111). Neste momento CPX-1 está em fase II de ensaios clínicos, e tem sido estudado como potencial tratamento para pacientes com CCR, por apresentar benefícios para este tipo de tumor (68).

O centro Segal Cancer, no Canadá, levou a cabo um ensaio clínico de fase I com o CPX-1 com o objetivo de averiguar a segurança, farmacocinética e eficácia da injeção do lipossoma CPX-1 em pacientes com tumor sólido avançado. Este estudo de fase I, *open-label*, ou seja, em que tanto o médico como o utente sabem qual o tratamento que estão a utilizar; de um só braço e com aumento de dose, foi desenhado para determinar qual a dose máxima tolerada em pacientes com tumores sólidos avançados. Estes pacientes receberam CPX-1 a 30, 60, 100, 150, 210, ou 270 unidades/m², sendo que uma unidade corresponde a 1 mg de irinotecano e 0.36 mg de floxuridina, por infusão, durante 90 minutos a cada 14 dias, em ciclos de 28 dias e as amostras farmacocinéticas foram recolhidas nos dias 1 e 15 do ciclo 1. O estudo de fase I contou com 33 pacientes, pré-tratados, com tumores sólidos, sendo que 15

pacientes possuíam CCR avançado. O rácio molar pretendido de Irinotecano e floxuridina foi mantido no plasma e ambos os fármacos apresentaram biodisponibilidade, tal como indicado pela presença dos seus metabolitos (SN-38 e 5-FU) no plasma de todos os sujeitos. Os efeitos adversos foram previsíveis, relacionados com a dose e qualitativamente similares com os regimes convencionais de irinotecano e 5-FU, ainda assim, foi revelada toxicidade de grau 3 e 4 que incluiu diarreia (24.2%), neutropénia (12.1%) e hipocaliémia (12.1%) e, para além disso, um paciente que tomou 270 unidades/m² morreu após diarreia persistente com desidratação e falha renal, registando-se toxicidade de grau 5. Neste estudo de aumento de escala, 73% dos pacientes mostraram benefícios clínicos, incluindo regressão parcial do tumor ou estabilização da doença. Dos 33 pacientes estudados verificou-se que em 9 deles houve um atraso na progressão da doença por mais de 6 meses, 6 dos quais com cancro colo-retal (68,111). O controlo da doença foi de 73% com uma mediana na sobrevida sem progressão da doença de 5,3 meses. Verifica-se que existe atividade anti-tumoral comprovada em pacientes com tumor sólido avançado e que este tratamento é relativamente bem tolerado. Relativamente ao objetivo do estudo concluiu-se que a dose recomendada para observações futuras é de 210 unidades/m² e que os resultados obtidos são superiores aos do tratamento convencional envolvendo irinotecano em monoterapia ou no esquema anteriormente abordado que engloba o irinotecano, 5-FU e leucovorina tal como reportado pela literatura em estudos anteriores (68,111).

Baseado na segurança e eficácia observada no estudo de fase I foi conduzido um estudo de fase II em 59 pacientes com CCR avançado. Verificou-se que os efeitos adversos observados foram qualitativamente semelhantes aos do irinotecano, embora tenha sido possível aumentar a segurança e diminuir as interrupções para uma dose inicial de 150u/m². Os resultados obtidos para o CPX-1 foram 3,9 meses de sobrevida sem progressão da doença (PFS), uma taxa de resposta de 7.7%; uma percentagem de controlo da doença de 45%; sendo que 23% dos pacientes alcançaram um PFS superior a 6 meses. Além disso, os resultados obtidos parecem ser tão ou ligeiramente mais efetivos do que o reportado na literatura para a monoterapia com panitumumab ou cetuximab (68).

Além destes ensaios clínicos, foi feito um estudo relativo à dependência do rácio de irinotecano e floxuridina em 11 linhas celulares tumorais e de acordo com essa investigação, verificou-se que irinotecano e floxuridina expostos a um rácio molar de 1:1 apresentam geralmente um efeito benéfico sinérgico (68,112). Além deste, vários resultados pré-

clínicos indicam que CPX-1 produz um aumento significativo na atividade terapêutica quando comparado com o cocktail convencional de irinotecano e floxuridine, assim como relativamente a outros regimes convencionais (68,111,112,134).

Lipoxal™ e Lipoplatin™

Lipoxal™ e Lipoplatin™ são formulações lipossomais de oxaliplatina e cisplatina, desenhadas com o objetivo de reduzir a toxicidade sistêmica, enquanto aumentam o tempo de circulação do fármaco encapsulado que é lentamente libertado no decorrer da degradação do lipossoma. Tem sido sugerido que poderá ser uma ferramenta para ultrapassar os transportadores de efluxo e aumentar a entrega dos fármacos derivados da platina na forma livre às células tumorais. Para além disso, apresenta um melhor perfil de tolerância e maior acumulação no tumor, propriedades que permitem uma ótima radiosensibilização (135).

Por reduzir as reações adversas associadas ao agente citotóxico sem reduzir a sua efetividade, foi feito um estudo de fase I para testar a aplicação do lipossoma de oxaliplatina, Lipoxal™, no tratamento de cancros avançados que contou com 12 participantes (44%) com CCR em fase IV. Neste estudo não se observaram efeitos secundários sérios para as quatro doses mais baixas, enquanto se verificou mielotoxicidade e náuseas para concentrações superiores. Além disso, constatou-se que a reação adversa mais comum foi a neuropatia periférica de grau 2 e 3 para níveis de 300 e 350 mg/m² e considerou-se como dose mínima tolerável 300 mg/m². Dos 27 pacientes, 3 alcançaram resposta parcial e 18 deles conseguiram estabilizar a doença por 4 meses (44,136). De um modo geral o Lipoxal foi bem tolerado e os efeitos adversos da oxaliplatina foram reduzidos, especialmente a mielotoxicidade e a nível do trato gastrointestinal, além disso a taxa de resposta observada de 11% em doentes pré-tratados pode ser um indicador importante da necessidade de adotar combinação de modelos quimioterapêuticos (44).

Aroplatin™

A Aroplatin™ é uma formulação lipossomal multilamelar que emprega fosfolípidos saturados, isto é, dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG). Esta formulação lipossomal de neodecanoatodiaminociclohexano de platina (II) (L-NDPP), um análogo estrutural hidrofóbico da oxaliplatina encontra-se em ensaios clínicos para uma

grande variedade de tumores e mais recentemente para tumores sólidos e linfomas das células B (72,137).

Em estudos de fase I, demonstrou-se que a dose máxima tolerada (DMT) do L-NNDP foi de 312,5 mg/m² sendo limitante da dose a toxicidade causada pela mielosupressão (137–139). Nesse sentido, foi conduzido um estudo de fase II utilizando o lipossoma di-amino-ciclohexano de L-NDDP em pacientes com CCR avançado e refratário à terapêutica com 5-FU/leucovorina ou capecitabina e irinotecano de forma a investigar a resposta anti-tumoral do L-NDDP e proceder a uma caracterização mais detalhada do perfil de toxicidade na população. Foi administrada por via i.v. a formulação durante 28 dias a 20 participantes, com uma dose inicial de 300 mg/m² até se verificar progressão da doença ou toxicidade inaceitável. Dos resultados obtidos verificou-se toxicidade hematológica incluindo anemia de grau 1 a 4 em 20% dos pacientes e leucopénia, neutropénia e trombocitopénia (grau 1/2) em 5% dos pacientes. Reportaram-se ainda náuseas (75%), vômitos (60%), fadiga (70%), dor no peito e falta de ar a atingir os 40%, aumento transiente das transaminases (35%) e hiperbilirrubinémia (20%). Na toxicidade de grau 3 e 4 incluíram-se a reações à infusão (20%), vômito (15%), fadiga (15%) e anemia (10%) e verificou-se neuropatia periférica de grau 1/2 em 15% dos pacientes (137,140,141). Neste estudo a resposta observada foi modesta; com 5,6% apresentando uma resposta parcial; 16,7% alcançando a estabilização da doença durante 3 meses; e 77,8% com desenvolvimento da progressão da doença. Concluiu-se que este estudo de fase II não traria informações adicionais relevantes pelo que se terá iniciado estudos pré-clínicos recorrendo à formulação modificada de L-NDDP, com o objetivo de melhorar a tolerabilidade. Ainda assim, a informação obtida é de que este ensaio clínico está a decorrer, no entanto, sem recrutamento de participantes (136,137,142).

Além deste, foi desenvolvido outro ensaio clínico de fase II, para testar o efeito da combinação de Aroplatina e Capecitabina em pacientes com CCR avançado e resistente à terapêutica padrão. Segundo a informação disponível este estudo estará ainda ativo, no entanto sem recrutamento de participantes (140).

Pelo facto de os dados pré-clínicos demonstrarem que L-NDDP apresenta uma distribuição diferente da primeira e segunda geração de derivados da platina, com acumulação da platina elementar em órgãos tais como o fígado, baço, nódulos linfáticos, um perfil de toxicidade melhorado e com claras evidências de benefícios ao nível do CCR, importa

insistir em investigações clínicas, com vista a otimizar as terapêuticas oncológicas, mais especificamente a do CCR (137).

Ensaio clínicos concluídos com sucesso providenciam a confiança necessária para investigar e desenhar novos lipossomas com diferentes componentes ou novas formulações de fármacos no desenvolvimento de terapêutica para o CCR (6). A título de resumo, segue-se a tabela 4.1, com referência às formulações em ensaios clínicos anteriormente apresentadas.

Apesar dos inúmeros artigos e da inovação constatada nesta área, a encapsulação de vários agentes terapêuticos tem falhado no seu perfil terapêutico, enquanto outros evoluem para ensaios clínicos e, uma vez nesta fase, conclui-se que a sua utilização é limitada. Até ao momento, vários têm sido os esforços no sentido de encontrar formulações lipossomais que sejam uma mais-valia, recorrendo a fármacos anticancerígenos aprovados, no entanto, muitas das vezes não se alcançam os objetivos definidos. Além das especificidades de segurança e da eficácia que tem que ser garantida, há que ter em conta que a localização da doença tem o potencial de minimizar a eficácia da terapêutica lipossomal (66).

Relativamente à existência de lipossomas comercializados aplicados na terapêutica do CCR, ainda que esteja demonstrada a sua utilidade na redução da toxicidade mantendo ou até aumentando a sua eficácia, apenas algumas formulações lipossomais chegaram ao mercado, tal como é o caso do Caelyx®. Muitos outros têm estado em prolongados ensaios clínicos, tais como formulações de gemcitabina, metotrexato e derivados da platina, no entanto, ainda não atingiram a fase de comercialização e não possuem indicação terapêutica para o CCR (44,56,80).

Tabela 4.1 - Lipossomas em aplicação clínica na terapêutica do CCR.

Nome do produto	Indústria Farmacêutica	Fármaco	Indicação	Estado	Referência
Doxil®	JanssenProducts	Doxorrubicina	CCR avançado	Fase II Terminado	(117)
ThermoDox®	Celsion	Doxorrubicinat ermosensível	CCR+ metástases no fígado + RFA ²	Fase II Terminado	(69,114)
			CCR+ metástases no fígado + ultrasom	Fase I A decorrer	(121)
IHL-305	YakultHonsha Co.	Lipossoma PEG de irinotecano	Tumores sólidos avançados	Fase I A decorrer	(124)
LE-SN38	NeoPharmInc	SN-38 ¹	CCR metastizado	Fase II Terminado	(69,72,126 ,133,143)
CPX-1	Celator	Combinação irinotecanoHCl :floxuridina (rácio 1:1)	CCR avançado	Fase II A decorrer	(68,69,111 ,112,114)
Lipoxal™	Mebiopharm	Oxaliplatina	CCR avançado	Fase I Terminado	(44,136)
Aroplatin™	AntigenicsInc	Análogo da oxaliplatina (NDDP)	Tumores sólidos avançados (no qual se inclui CCR)	Fase II A decorrer	(72,136,13 7,139)
Aroplatin™	AntigenicsInc	Análogo da oxaliplatina (NDDP)	CCR avançado com resistência a terapêuticas padrão	Fase II Terminado	(72,136,13 7,142)
Aroplatin e Capecitabina	AntigenicsInc	Análogo da oxaliplatina (NDDP) e derivado de fluoropirimidin a	CCR avançado com resistência a terapêuticas padrão	Fase II A decorrer	(140)

Legenda: ¹SN-38 (7-etil-10-hidroxi-camptotequina) - metabolito ativo do pro-fármaco irinotecano (CPT-11)(69); ² RFA – radiofrequência de ablação.

Capítulo 5

Conclusões e recomendações

O cancro é considerado uma das principais causas de morte e apresenta custos elevados, associados não só ao diagnóstico e à investigação necessária ao estabelecimento de terapêuticas, mas também pelo tempo prolongado a que está associada a terapêutica, a qual requer muitas vezes cuidados hospitalares especializados. Para que um fármaco seja eficaz, deve alcançar o tecido tumoral em grande concentração, permitindo a sua interação com o alvo e conseqüente internalização celular da molécula farmacologicamente ativa. Portanto, ao longo do tempo muitos esforços têm sido feitos com vista à descoberta de inovadores sistemas de libertação de fármacos, que permitam ultrapassar a falta de seletividade dos fármacos entre o tecido normal e o patológico. Esta inabilidade muitas vezes condiciona a dose utilizada, sob pena dos pacientes não resistirem aos efeitos tóxicos inerentes à terapêutica.

A presente dissertação de mestrado procura expor e, na medida do possível, responder às questões levantadas pela investigação na área das alternativas terapêuticas do CCR, sendo estas fundamentadas na informação proveniente da análise dos resultados e alicerçadas pelo conhecimento teórico oriundo da revisão bibliográfica. Como se demonstrou ao longo desta monografia, os lipossomas vetorizados passivamente apresentam características que prolongam o tempo de circulação do fármaco graças à diminuição da sua deteção e eliminação pelo sistema reticuloendotelial. Por outro lado, por vetorização ativa é possível, através da adição de ligandos direcionados para alvos específicos, aumentar a seletividade pela célula tumoral propiciando uma acumulação no alvo pretendido e minimizando os efeitos em células normais.

Além disso é possível promover a acumulação no sítio alvo por aumento da captação celular, em função das variações de pH, temperatura, luz, ultrassom ou magnetismo. Combinando estratégias de vetorização que recorram a ligandos funcionalizantes tais como anticorpos, fatores de crescimento, péptidos, carboidratos, lipoproteínas, entre outros, torna-se viável obter uma libertação de fármaco controlada e prolongada.

Como foi possível verificar ao longo desta monografia têm sido feitos estudos para as diversas estratégias de vetorização, tanto isoladamente, como em associação. No futuro, prevê-se a criação de nanossistemas aliando as diferentes estratégias de vetorização numa

mesma formulação lipossomal, na busca de sistemas cada vez mais seletivos e eficazes. Além disso, os estudos têm sido direcionados para a análise dos efeitos benéficos do sinergismo de terapêuticas em combinação no mesmo nanossistema.

Uma vez apresentadas as conclusões dos vários estudos analisados, importa continuar a desenhar e a testar novas formulações lipossomais, com vista a otimizar os processos de produção, a caracterização dos sistemas e as vantagens da combinação de técnicas de vetorização e terapêuticas perante contínuos ensaios clínicos *in vitro* e *in vivo*. Conseguindo este objetivo, serão obtidas formulações mais seletivas, eficazes e seguras para o tratamento do cancro colo-retal, com menos efeitos agressivos para os pacientes, menor progressão ou, idealmente, regressão da doença e, conseqüentemente, maior sobrevida. As limitações da investigação passam essencialmente pelo facto de as condições em que decorrem os estudos variarem no que diz respeito ao tipo de formulação e aos modelos utilizados para as testar, o que não permite fazer uma comparação concreta entre formulações. Além disso, é preciso ter em conta que os lipossomas vetorizados dependem do estado fisiopatológico dos modelos que é muito variável e que, por isso, a análise *in vivo* é essencial e deve ser feita continuamente. A aprovação de uma formulação lipossomal exige uma análise extensiva de todos os processos de modo a garantir a segurança e replicação da sua aplicação, o que implica o cumprimento de objetivos rigorosos e nem sempre fáceis de reproduzir, dificultando, por vezes a introdução deste tipo de formulações no mercado.

A nanomedicina e os nanossistemas são uma tecnologia com enorme potencial e com um papel importantíssimo no futuro da terapêutica clínica e na qualidade de vida dos indivíduos com esta patologia. Posto isto, é crucial insistir na investigação nesta área para que novos e cada vez mais seletivos sistemas de libertação de fármacos estejam disponíveis numa sociedade em que a incidência e a prevalência deste tipo de cancro continuam a aumentar.

Bibliografia

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A; Global cancer statistics; CA: Cancer Journal for Clinicians; 2012; 65 (2); 87-108
2. Miranda N, Portugal C, Nogueira PJ, Farinha CS, Soares A, Alves MI, et al.; Programa Nacional para as Doenças Oncológicas – 2014; Lisboa; 2014
3. Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, et al. ;Cancer treatment and survivorship statistics;CA: Cancer Journal for Clinicians; 2012; 62 (4); 220-41
4. Markman JL, Rekechenetskiy A, Holler E, Ljubimova JY; Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance; Advanced Drug Delivery Reviews; 2013; 65 (13); 1866-79
5. Brenner S. ; The Clinical Nanomedicine Handbook; 1ª ed; Boca Raton; CRC Press; 2014; 321-70
6. Zhang J-X, Wang K, Mao Z-F, Fan X, Jiang D-L, Chen M, et al.; Application of liposomes in drug development-focus on gastroenterological targets; International Journal of Nanomedicine; 2013; 8; 1325-34
7. American Cancer Society's; What are the key statistics about colorectal cancer?;2014; [acedido a 2 de Fevereiro de 2015]; disponível em: www.cancer.org/cancer/colonandrectumcancer/detailedguide/colorectal-cancer-key-statistics
8. Hobbs R, Kerr D, Young A; ABC of Colorectal Cancer; 2ª ed; West Sussex; Wiley-Blackwell; 2011
9. Jeffrey S. Tobias DH; Cancer and Its Management; 6ª ed; West Sussex; Wiley-Blackwell; 2015
10. Pantel K, Cote RJ, Fodstad O; Detection and Clinical Importance of Micrometastatic Disease; Journal of the Nacional Cancer Institute; 1999; 91 (13); 1113-24
11. Yang C, Fu Z-X; Liposomal delivery and polyethylene glycol-liposomal oxaliplatin for the treatment of colorectal cancer (Review); Biomed reports; 2014; 2(3); 335-9
12. Fortina P, Kricka LJ, Graves DJ, Park J, Hyslop T, Tam F, et al; Applications of nanoparticles to diagnostics and therapeutics in colorectal cancer; Trends in Biotechnology; 2007; 25 (4); 145-52
13. Hagggar FA, Boushey RP; Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors; Clinics in Colon and Rectal Surgery; 2009; 22 (4); 191-7

14. World Health Organization; Health topics > Cancer; 2015; [acedido a 5 de Março de 2015]; disponível em: <http://www.who.int/topics/cancer/en>
15. National Cancer Institute; Dictionary of Cancer Terms; 2015; [acedido a 17 de Março de 2015]; disponível em: <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>
16. National Cancer Institute; What Is Cancer?; 2015; [acedido a 25 de Maio de 2015]; disponível em: <http://www.cancer.gov>.
17. Colorectal Cancer Facts & Figures (2014-2016); Legal department of the American Cancer Society; Atlanta; 2014
18. VanPutte C, Regan J, Russo A, Seeley R, Stephens T, Tate P; Digestive System; Seeley's Anatomy & physiology; 10^a ed; New York; McGraw-Hill; 2014; 859–97.
19. National Cancer Institute; Colon Cancer Treatment; 2015 [acedido a 25 de Maio de 2015]; disponível em: <http://www.cancer.gov/types/colorectal/patient/colon-treatment-pdq#section/all>
20. Terese Winslow; Small Intestine Cancer Treatment; National Cancer Institute; U.S. Gov.; 2013; [acedido a 18 de Julho de 2015]; disponível em: http://www.cancer.gov/types/small-intestine/patient/small-intestine-treatment-pdq#section/_1
21. Terese Winslow LLC; Metastasis-enlarge.jpg; U.S. Government; 2014; [acedido a 18 de Julho de 2015]; disponível em: <http://www.cancer.gov/PublishedContent/Images/images/cancer-types/metastasis-enlarge.jpg>
22. National Cancer Institute; Dictionary of Cancer Terms; [acedido a 17 de Março de 2015]; disponível em: <http://www.cancer.gov/dictionary?cdrid=46216>
23. National Cancer Institute; Rectal Cancer Treatment; [acedido a 26 de Maio de 2015]; disponível em: http://www.cancer.gov/types/colorectal/hp/rectal-treatment-pdq#link/_1079_toc
24. Huxley RR, Ansary-Moghaddam A, Clifton P, Czernichow S, Parr CL, Woodward M; The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence; *International Journal of Cancer*; 2009; 125(1); 171-80
25. Stracci F, Zorzi M, Grazzini G; Colorectal cancer screening: tests, strategies, and perspectives; *Frontiers in public health*; 2014; (2); 210
26. Burke C, Pox CP, Schmiegel W, Keuchel M; Video Capsule Endoscopy; editores: Keuchel M, Hagenmüller F, Tajiri H; Berlim; Springer Berlin Heidelberg; 2014; 359-65

27. Mansoor-ul-Haq, Faisal N; Familial adenomatous polyposis; Journal of the College of Physicians and Surgeons; Pakistan; 2011; 21(1); 46-8
28. Campbell PT, Deka A, Jacobs EJ, Newton CC, Hildebrand JS, McCullough ML, et al.; Prospective study reveals associations between colorectal cancer and type 2 diabetes mellitus or insulin use in men; Gastroenterology; 2010; 139(4); 1138-46
29. Campbell PT, Patel A V, Newton CC, Jacobs EJ, Gapstur SM; Associations of recreational physical activity and leisure time spent sitting with colorectal cancer survival; Journal of Clinical Oncology; 2013; 31(7); 876-85
30. Frezza EE, Wachtel MS, Chiriva-Internati M; Influence of obesity on the risk of developing colon cancer; Gut -International journal of Gastroenterology and Hepatology; 2006; 55(2); 285-91
31. Norat T, Bingham S, Ferrari P, Slimani N, Jenab M, Mazuir M, et al; Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition; Journal of National Cancer Institute; 2005; 97(12); 906-16
32. Cross AJ, Ferrucci LM, Risch A, Graubard BI, Ward MH, Park Y, et al.; A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association; Cancer Research; 2010; 70(6); 2406-14
33. Liang PS, Chen T-Y, Giovannucci E; Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis; International Journal of Cancer; 2009; 124(10); 2406-15
34. Cho E, Smith-Warner SA, Ritz J, van den Brandt PA, Colditz GA, Folsom AR, et al.; Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies; Annals of Internal Medicine; 2004; 140(8); 603-13
35. Astin M, Griffin T, Neal RD, Rose P, Hamilton W; The diagnostic value of symptoms for colorectal cancer in primary care: a systematic review; The British Journal of General Practice; 2011; 61; 231-43
36. Blausen Medical Communications I.; Location and appearance of two example colorectal tumors; 2013 [acedido a 19 de Julho de 2015]. Disponível em: https://en.wikipedia.org/wiki/Colorectal_cancer#/media/File:Blausen_0246_Colorectal_Cancer.png
37. Nacional Cancer Institute; Colonoscopia.jpg (554x599); [acedido a 19 de Julho de 2015]. Disponível em: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/73/Colonoscopia.jpg>
38. Bresalier RS; Early detection of and screening for colorectal neoplasia; Gut and Liver; 2009; 3(2); 69-80

39. Ponce P, Fernandes JP, Quintela A, Rodrigues R, Custódio MP; Manual de Terapêutica Médica; Lisboa; LIDEL; 2009.
40. Baker JHE, Lam J, Kyle AH, Sy J, Oliver T, Co SJ, et al.; Irinophore C, a novel nanoformulation of irinotecan, alters tumor vascular function and enhances the distribution of 5-fluorouracil and doxorubicin; *Clinical Cancer Research*; 2008; 14(22); 7260-71
41. Caramona M, Esteves AP, Gonçalves J, Macedo T, Mendonça J, Osswald W, et al.; *Prontuário Terapêutico online*; Ministério da Saúde; Lisboa; Infarmed; 2011
42. Akporiaye ET, Aminoff MJ, Basbaum AI, et. al.; Fármacos Quimioterápicos; In Bertram G. Katzung et al., *Farmacologia básica e clínica*. 10ª edição; San Francisco; McGraw-Hill; 2008; 797–821.
43. Van Cutsem E; Raltitrexed: current clinical status and future directions; *Annals of Oncology*; 2002; 13(4); 513-22
44. Stathopoulos GP, Boulikas T, Kourvetaris A, Stathopoulos J; Liposomal oxaliplatin in the treatment of advanced cancer: a phase I study; *Anticancer Research*; 2006; 26(2); 1489-93
45. Venditto VJ, Szoka FC; Cancer nanomedicines: so many papers and so few drugs!; *National Institute of Health*; 2013; 65(1); 80-8
46. Gustavsson B, Carlsson G, Machover D, Petrelli N, Roth A, Schmoll H-J, et al.; A Review of the Evolution of Systemic Chemotherapy in the Management of Colorectal Cancer; *Clinical Colorectal Cancer*; 2014; 14(1)
47. Stintzing S.; Management of colorectal cancer; *F1000Prime Reports*; 2014; 6
48. European Medicines Agency; Zaltrap; [acedido a 31 de Maio de 2015]. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002532/human_med_001617.jsp&mid=WC0b01ac058001d124
49. National Cancer Institute; Impacts on Cancer; [acedido a 3 de Fevereiro de 2015]; disponível em: <http://nano.cancer.gov/learn/impact/>
50. Malsch I, Emond C.; *Nanotechnology and Human Health*; Boca Raton; CRC Press; 2014.
51. Silva J, Fernandes A, Baptista P; *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*; editor Sezer AD, InTech; 2014; Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/application-of-nanotechnology-in-drug-delivery/application-of-nanotechnology-in-drug-delivery>
52. Freitas RA; What is nanomedicine?; *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*; 2005; 1(1); 2–9.

53. The British Society for Nanomedicine; What is Nanomedicine; [acedido a 15 de Junho de 2015]; disponível em: <http://www.britishsocietynanomedicine.org/what-is-nanomedicine.html>
54. Noble GT, Stefanick JF, Ashley JD, Kiziltepe T, Bilgicer B; Ligand-targeted liposome design: challenges and fundamental considerations; *Trends in Biotechnology*; 2014; 32(1); 32–45
55. Yang C, Liu HZ, Fu ZX, Lu WD; Oxaliplatin long-circulating liposomes improved therapeutic index of colorectal carcinoma; *BioMed Central Biotechnology*; 2011; 11
56. Fanciullino R, Giacometti S, Mercier C, Aubert C, Blanquicett C, Piccerelle P, et al.; In vitro and in vivo reversal of resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cells with a novel stealth double-liposomal formulation; *British Journal of Cancer*; 2007; 97(7); 919-26
57. Fang J, Sawa T, Maeda H; Factors and mechanism of “EPR” effect and the enhanced antitumor effects of macromolecular drugs including SMANCS; *Advances in Experimental Medicine and Biology*; 2003; 519; 29-49
58. Domb AJ, Khan W; Systemic Targeting Systems - EPR Effect, Ligand Targeting Systems; *Focal Controlled Drug Delivery*; Londres; Springer S.; 2014; p. 61–85.
59. Theiss AL, Laroui H, Obertone TS, Chowdhury I, Thompson WE, Merlin D, et al.; Nanoparticle-based therapeutic delivery of prohibitin to the colonic epithelial cells ameliorates acute murine colitis; *Inflamm Bowel Dis*; 2011; 17(5);1163-76
60. Parveen S, Misra R, Sahoo SK; Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging; *Nanomedicine*; 2012; 8(2); 147-66
61. Fang Z, Bhandari B; Encapsulation of polyphenols – a review; *Trends in Food Science & Technology*; 2010; 21(10); 510–523.
62. Jesorka A, Orwar O. Liposomes: technologies and analytical applications; *Annual Review of Analytical Chemistry*; 2008 ; 1; 801–32
63. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, et al.; Liposome: classification, preparation, and applications; *Nanoscale Research Letters*; 2013; 8(1)
64. Chow T-H, Lin Y-Y, Hwang J-J, Wang H-E, Tseng Y-L, Wang S-J, et al.; Improvement of biodistribution and therapeutic index via increase of polyethylene glycol on drug-carrying liposomes in an HT-29/luc xenografted mouse model; *Anticancer Research*; 2009; 29(6);2111–20
65. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, et al.; Liposome: classification, preparation, and applications; *Nanoscale Research Letters*; Springer; 2013; 8(1)

66. Messerer CL, Ramsay EC, Waterhouse D, Ng R, Simms E-M, Harasym N, et al.; Liposomal irinotecan: formulation development and therapeutic assessment in murine xenograft models of colorectal cancer; *Clinical Cancer Research*; 2004; 10(19); 6638–49
67. Kordatou Z, Kountourakis P, Papamichael D; Treatment of older patients with colorectal cancer: a perspective review; *The Advances in Medical Oncology*; 2014; 6(3); 128–40.
68. Liposome for Injection; CPX-1 (irinotecan:floxuridine); 2014; [acedido a 11 de Fevereiro de 2015]; disponível em: <http://www.celatorpharma.com/#!cpx-1/c1xju>
69. Deshpande PP, Biswas S, Torchilin VP; Current trends in the use of liposomes for tumor targeting; *Nanomedicine*; London; 2013; 8(9); 1509–28
70. Danhier F, Feron O, Pr at V; To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery; *Journal of Controlled Release*; 2010; 148(2); 135–46
71. Yu NY, Conway C, Pena RLS, Chen JY; Stealth liposomal CKD-602, a topoisomerase I inhibitor, improves the therapeutic index in human tumor xenograft models; *Anticancer Research*; 2007; 27(4); 2541–5
72. Immordino ML, Dosio F, Cattel L; Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential; *International Journal of Nanomedicine*; 2006; 1(3); 297–315
73. Garg A, Tisdale AW, Haidari E, Kokkoli E; Targeting colon cancer cells using PEGylated liposomes modified with a fibronectin-mimetic peptide; *Internacional Journal of Pharmaceutics*; 2009; 366(1); 201–10
74. Nakamura H, Doi Y, Abu Lila AS, Nagao A, Ishida T, Kiwada H; Sequential treatment of oxaliplatin-containing PEGylated liposome together with S-1 improves intratumor distribution of subsequent doses of oxaliplatin-containing PEGylated liposome; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*; 2014; 87(1); 142–51
75. Gabizon A, Amitay Y, Tzemach D, Gorin J, Shmeeda H, Zalipsky S; Therapeutic efficacy of a lipid-based prodrug of mitomycin C in pegylated liposomes: studies with human gastro-entero-pancreatic ectopic tumor models; *Journal of Controlled Release*; 2012; 160(2); 245–53
76. Nag OK, Awasthi V; Surface engineering of liposomes for stealth behavior; *Pharmaceutics*; Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2013; 5(4); 542–69
77. Yoshizawa Y, Kono Y, Ogawara K, Kimura T, Higaki K; PEG liposomalization of paclitaxel improved its in vivo disposition and anti-tumor efficacy; *Internacional Journal of Pharmaceutics*; 2011; 412(1); 132–41

78. Yang C, Liu H-Z, Lu W-D, Fu Z-X; PEG-liposomal oxaliplatin potentialization of antitumor efficiency in a nude mouse tumor-xenograft model of colorectal carcinoma; *Oncology Reports*; 2011; 25(6); 1621–8
79. Kopecka J, Campia I, Olivero P, Pescarmona G, Ghigo D, Bosia A, et al.; A LDL-masked liposomal-doxorubicin reverses drug resistance in human cancer cells; *Journal of Controlled Release*; 2011; 149(2); 196–205
80. Brusa P, Immordino ML, Rocco F, Cattel L.; Antitumor activity and pharmacokinetics of liposomes containing lipophilic gemcitabine prodrugs; *Anticancer Research*; 2007; 27(1); 195–9
81. Li L, Ahmed B, Mehta K, Kurzrock R; Liposomal curcumin with and without oxaliplatin: effects on cell growth, apoptosis, and angiogenesis in colorectal cancer; *Molecular Cancer Therapeutics*; 2007; 6(4); 1276–82
82. Nie T, Wong CC, Alston N, Aro P, Constantinides PP, Rigas B; Phospho-ibuprofen (MDC-917) incorporated in nanocarriers: anti-cancer activity in vitro and in vivo; *British Journal of Pharmacology*; 2012; 166(3); 991–1001
83. Huang H, Pierstorff E, Osawa E, Ho D; Active nanodiamond hydrogels for chemotherapeutic delivery; *Nano Letters*; 2007; 7(11); 3305–14
84. Hirsjärvi S, Passirani C, Benoit J-P; Passive and active tumour targeting with nanocarriers; *Current Drug Discovery Technologies*; 2011; 8(3); 188–96
85. Daniels TR, Bernabeu E, Rodríguez JA, Patel S, Kozman M, Chiappetta DA, et al.; The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer; *Biochim Biophys Acta*; 2012; 1820(3); 291–317
86. Jin H, Varner J; Integrins: roles in cancer development and as treatment targets; *British Journal of Cancer*; 2004; 90(3); 561–5
87. Dupouy S, Mourra N, Doan VK, Gompel A, Alifano M, Forgez P; The potential use of the neurotensin high affinity receptor 1 as a biomarker for cancer progression and as a component of personalized medicine in selective cancer; *Biochimie*; 2011; 93(9); 1369–78
88. Falciani C, Accardo A, Brunetti J, Tesauro D, Lelli B, Pini A, et al.; Target-selective drug delivery through liposomes labeled with oligobranched neurotensin peptides; *ChemMedChem*; 2011; 6(4); 678–85
89. Ochs A-M, Wong L, Kakani V, Neerukonda S, Gorske J, Rao A, et al.; Expression of vascular endothelial growth factor and HER2/neu in stage II colon cancer and correlation with survival; *Clinical Colorectal Cancer*; 2004; 4(4); 262–7
90. Park JW, Kirpotin DB, Hong K, Shalaby R, Shao Y, Nielsen UB, et al.; Tumor targeting using anti-her2 immunoliposomes; *Journal of Controlled Release*; 2001; 74(1); 95–113

91. Wicki A, Rochlitz C, Orleth A, Ritschard R, Albrecht I, Herrmann R, et al.; Targeting tumor-associated endothelial cells: anti-VEGFR2 immunoliposomes mediate tumor vessel disruption and inhibit tumor growth; *Clinical Cancer Research*; 2012; 18(2); 454–64
92. Park JW, Hong K, Kirpotin DB, Colbern G, Shalaby R, Baselga J, et al.; Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery; *Clinical Cancer Research*; 2002; 8(4); 1172–81
93. Blok EJ, Kuppen PJ, van Leeuwen JE, Sier CF; Cytoplasmic Overexpression of HER2: a Key Factor in Colorectal Cancer; *Clinical Medicine Insights: Oncology*; 2013; 7; 41–51
94. Mamot C, Drummond DC, Noble CO, Kallab V, Guo Z, Hong K, et al.; Epidermal growth factor receptor-targeted immunoliposomes significantly enhance the efficacy of multiple anticancer drugs in vivo; *Cancer Research*; 2005; 65(24); 11631–8
95. Mamot C, Ritschard R, Küng W, Park JW, Herrmann R, Rochlitz CF; EGFR-targeted immunoliposomes derived from the monoclonal antibody EMD72000 mediate specific and efficient drug delivery to a variety of colorectal cancer cells; *Journal of Drug Targeting*; 2006; 14(4); 215–23
96. Zalba S, Contreras AM, Haeri A, ten Hagen TLM, Navarro I, Koning G, et al.; Cetuximab-oxaliplatin-liposomes for Epidermal Growth Factor receptor targeted chemotherapy of colorectal cancer; *Journal of Controlled Release*; 2015; 210; 26–38
97. Limasale YDP, Tezcaner A, Özen C, Keskin D, Banerjee S; Epidermal growth factor receptor-targeted immunoliposomes for delivery of celecoxib to cancer cells; *Internacional Journal of Pharmaceutics*; 2015; 479(2); 364–73
98. Koning GA, Gorter A, Scherphof GL, Kamps JA; Antiproliferative effect of immunoliposomes containing 5-fluorodeoxyuridine-dipalmitate on colon cancer cells; *British Journal of Cancer*; 1999; 80(11); 1718–25
99. Wells J, Sen A, Hui SW. Localized delivery to CT-26 tumors in mice using thermosensitive liposomes; *Internacional Journal of Pharmaceutics*; 2003; 261(1); 105–14
100. Casadó A, Sagristá ML, Mora M; Formulation and in vitro characterization of thermosensitive liposomes for the delivery of irinotecan; *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 2014; 103(10); 3127–38
101. Banerjee S, Sen K, Pal TK, Guha SK; Poly(styrene-co-maleic acid)-based pH-sensitive liposomes mediate cytosolic delivery of drugs for enhanced cancer chemotherapy; *Internacional Journal of Pharmaceutics*; 2012; 436(1); 786–97
102. Garg A, Kokkoli E; pH-Sensitive PEGylated liposomes functionalized with a fibronectin-mimetic peptide show enhanced intracellular delivery to colon cancer cell; *Current Pharmaceutical Biotechnology*; 2011; 12(8); 1135–43

103. Yoshida M, Watanabe Y, Sato M, Maehara T, Aono H, Naohara T, et al.; Feasibility of chemohyperthermia with docetaxel-embedded magnetoliposomes as minimally invasive local treatment for cancer; *International Journal of Cancer*; 2010; 126(8); 1955–65
104. Schroeder A, Honen R, Turjeman K, Gabizon A, Kost J, Barenholz Y; Ultrasound triggered release of cisplatin from liposomes in murine tumors; *Journal of Controlled Release*; 2009; 137(1); 63–8
105. Lin Y-Y, Chang C-H, Li J-J, Stabin MG, Chang Y-J, Chen L-C, et al; Pharmacokinetics and dosimetry of (111)In/(188)Re-labeled PEGylated liposomal drugs in two colon carcinoma-bearing mouse models; *Cancer Biotherapy Radiopharmaceuticals*; 2011; 26(3); 373–80
106. Lin J, Yu Y, Shigdar S, Fang DZ, Du JR, Wei MQ, et al.; Enhanced antitumor efficacy and reduced systemic toxicity of sulfatide-containing nanoliposomal doxorubicin in a xenograft model of colorectal cancer; *PLoS One*; 2012; 7(11)
107. De Smet L, Ceelen W, Remon JP, Vervaet C; Optimization of drug delivery systems for intraperitoneal therapy to extend the residence time of the chemotherapeutic agent; *Scientific World Journal*, 2013.
108. Sadzuka Y, Hirota S, Sonobe T; Intraperitoneal administration of doxorubicin encapsulating liposomes against peritoneal dissemination; *Toxicology Letters*; 2000; 116(1); 51–9
109. Dadashzadeh S, Mirahmadi N, Babaei MH, Vali AM; Peritoneal retention of liposomes: Effects of lipid composition, PEG coating and liposome charge; *Journal of Controlled Release*; 2010; 148(2); 177–86
110. Riviere K, Kieler-Ferguson HM, Jerger K, Szoka FC; Anti-tumor activity of liposome encapsulated fluorouracil as a single agent and in combination with liposome irinotecan; *Journal of Controlled Release*; 2011; 153(3); 288–96
111. Batist G, Gelmon KA, Chi KN, Miller WH, Chia SKL, Mayer LD, et al.; Safety, pharmacokinetics, and efficacy of CPX-1 liposome injection in patients with advanced solid tumors; *Clinical Cancer Research*; 2009; 15(2); 692–700
112. Mayer LD, Harasym TO, Tardi PG, Harasym NL, Shew CR, Johnstone SA, et al.; Ratiometric dosing of anticancer drug combinations: controlling drug ratios after systemic administration regulates therapeutic activity in tumor-bearing mice; *Molecular Cancer Therapeutics*; 2006; 5(7); 1854–63
113. Etheridge ML, Campbell SA, Erdman AG, Haynes CL, Wolf SM, McCullough J; The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products; *Nanomedicine*; 2013; 9(1); 1–14

114. Allen TM, Cullis PR; Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications; *Advanced Drug Delivery Reviews*; 2013; 65(1); 36–48
115. Voorde M, Werner M, Fecht H; *The Nano-Micro Interface: Bridging the Micro and Nano Worlds*; 2ª edição; Weinheim; Wiley-VCH; 2015; 480
116. Janssen Products; Doxil; 2014; [acedido a 17 de fevereiro de 2015]; disponível em: <http://www.doxil.com/>
117. Shields AF, Lange LM, Zalupski MM; Phase II study of liposomal doxorubicin in patients with advanced colorectal cancer; *American Journal of Clinical Oncology*; 2001; 24(1); 96–8
118. Tsimberidou AM, Moulder S, Fu S, Wen S, Naing A, Bedikian AY, et al.; Phase I clinical trial of hepatic arterial infusion of cisplatin in combination with intravenous liposomal doxorubicin in patients with advanced cancer and dominant liver involvement; *Cancer Chemother Pharmacol*; 2010; 66(6); 1087–93
119. ClinicalTrials.gov; Phase 2 Study of Thermodox as Adjuvant Therapy With Thermal Ablation (RFA) in Treatment of Metastatic Colorectal Cancer(mCRC); 2015; [acedido a 17 de Fevereiro de 2015]; disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01464593?term=THERMODOX&rank=3>
120. May JP, Li S-D; Hyperthermia-induced drug targeting; *Expert Opinion in Drug Delivery*; 2013; 10(4); 511–27
121. ClinicalTrials.gov; Targeted Chemotherapy Using Focused Ultrasound for Liver Metastases; 2015; [acedido a 16 de Fevereiro de 2015]; disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02181075?term=THERMODOX&rank=4>
122. Mills JK, Needham D; Lysolipid incorporation in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes enhances the ion permeability and drug release rates at the membrane phase transition; *Biochimica et Biophysica Acta*; 2005; 1716(2); 77–96
123. Yarmolenko PS, Zhao Y, Landon C, Spasojevic I, Yuan F, Needham D, et al.; Comparative effects of thermosensitive doxorubicin-containing liposomes and hyperthermia in human and murine tumours; *International Journal of Hyperthermia*; 2010; 26(5); 485–98
124. ClinicalTrials.gov; Safety Study of IHL-305 (Irinotecan Liposome Injection) to Treat Advanced Solid Tumors; 2012; [acedido a 18 de Fevereiro de 2015]; disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT00364143?term=IHL-305&rank=1>
125. Matsuzaki T, Takagi A, Furuta T, Ueno S, Kurita A, Nohara G, et al; Antitumor activity of IHL-305, a novel pegylated liposome containing irinotecan, in human xenograft models; *Oncology Reports*; 2012; 27(1); 189–97
126. Chabner BA, Longo DL; *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice*; Lippincott Williams & Wilkins; 2011; 848

127. Zhang JA, Xuan T, Parmar M, Ma L, Ugwu S, Ali S, et al.; Development and characterization of a novel liposome-based formulation of SN-38; *International Journal of Pharmaceutics*; 2004; 270(1); 93–107
128. Kraut EH, Fishman MN, Lorusso PM, Gordon MS, Rubin EH, Haas A, et al.; Final results of a phase I study of liposome encapsulated SN-38 (LE-SN38): Safety, pharmacogenomics, pharmacokinetics, and tumor response; *American Society of Clinical Oncology Annual Meeting*; 2005; 23(16S)
129. Arndt P; Phase II Clinical Trial of NeoPharm's LE-SN38 Initiated by NCI CALGB in Patients with Metastatic Colorectal Cancer - First Patients Treated; 2006; [acedido a 17 de Junho de 2015], disponível em: http://files.shareholder.com/downloads/NEOL/0x0x246353/a654692d-b30e-4c97-885d-1f2342dd2865/NEOL_News_2006_5_30_General_Releases.pdf
130. Ocean AJ, Niedzwiecki D, Atkins JN, Parker B, O'Neil BH, Lee JW, et al; LE-SN38 for metastatic colorectal cancer after progression on oxaliplatin: Results of CALGB 80402; *American Society of Clinical Oncology Annual Meeting*; 2008; 26(15S)
131. NeoPharm's Colorectal Cancer Trial Misses Endpoint; *FDA NEWS*; 2007; [acedido a 17 de Junho de 2015], disponível em: <http://www.fdanews.com/articles/91470-neopharm-s-colorectal-cancer-trial-misses-endpoint>
132. Pal A, Khan S, Wang Y-F, Kamath N, Sarkar AK, Ahmad A, et al.; Preclinical safety, pharmacokinetics and antitumor efficacy profile of liposome-entrapped SN-38 formulation; *Anticancer Research*; 2005 Jan; 25(1); 331–41
133. Svenson S.; Clinical translation of nanomedicines; *Current Opinion in Solid State and Materials Science*; 2012; 16(6); 287-94
134. Lee KD, Jeong Y-I, Kim DH, Lim G-T, Choi K-C; Cisplatin-incorporated nanoparticles of poly(acrylic acid-co-methyl methacrylate) copolymer; *Internacional Journal of Nanomedicine*; 2013; 8; 2835–45
135. Tippayamontri T, Kotb R, Paquette B, Sanche L; Synergism in concomitant chemoradiotherapy of cisplatin and oxaliplatin and their liposomal formulation in the human colorectal cancer HCT116 model; *Anticancer Research*; 2012; 32(10); 4395–404
136. Liu D, He C, Wang AZ, Lin W; Application of liposomal technologies for delivery of platinum analogs in oncology; *International Journal of Nanomedicine*; 2013; 8; 3309–19
137. Dragovich T, Mendelson D, Kurtin S, Richardson K, Von Hoff D, Hoos A; A Phase 2 trial of the liposomal DACH platinum L-NDDP in patients with therapy-refractory advanced colorectal cancer; *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*; 2006; 58(6); 759–64

138. ClinicalTrials.gov; Study of L-NDDP (Aroplatin) in Patients With Advanced Solid Malignancies or B-Cell Lymphoma; 2008; [acedido a 18 de Fevereiro de 2015]; disponível em:
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00316511?term=aroplatin&rank=1>
139. ClinicalTrials.gov; A Safety and Effectiveness Study of Aroplatin in Patients With Advanced Solid Malignancies; 2005; [acedido a 18 de Fevereiro de 2015]; disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00057395?term=aroplatin&rank=5>
140. ClinicalTrials.gov; Aroplatin and Capecitabine in Patients With Advanced Colorectal Cancer Resistant to Standard Therapies; 2005; [acedido a 18 de Fevereiro de 2015]; disponível em:
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00081536?term=aroplatin&rank=3>
141. Dragovich T, Mendelson D, Hoos A, Lewis J, Kurtin S, Richardson K, et al.; A phase II trial of aroplatin (L-NDDP), a liposomal DACH platinum, in patients with metastatic colorectal cancer (CRC) - a preliminary report; *European Journal of Cancer Supplements*; Elsevier; 2003; 1(5); 82–3
142. ClinicalTrials.gov; A Safety and Effectiveness Study of Aroplatin in Patients With Advanced Colorectal Cancer Resistant to Standard Therapies; 2005 [acedido a 18 de Fevereiro de 2015]; disponível em:
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT00043199?term=aroplatin&rank=4>
143. Kraft JC, Freeling JP, Wang Z, Ho RYJ; Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems; *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 2014; 103(1); 29–52
144. Kuehr T, J.Thaler, E.Woell; *Chemotherapy Protocols 2015*; 2013; 16ª edição; Innsbruck; 139-163

Anexo A

Tipos de mutações genéticas e alterações epigenéticas no cancro.

Tabela A - Tipos de mutações genéticas e alterações epigenéticas no cancro. Adaptado de Hobbs et al. (2011) (8).

Tipo de alterações		Efeito no DNA	Efeito na Proteína
Genética: mutações de pequena escala	Mutação pontual	Alteração de um nucleótido por outro	Silencioso: codifica para o mesmo aminoácido; Missense: codifica para outro aminoácido; Nonsense: cria codão de stop; Local de <i>splicing</i> : remove ou cria um local de <i>splicing</i>
	Inserção/deleção	Adição ou remoção de um ou mais nucleótido	<i>Frameshift</i> : altera o quadro de leitura da proteína; <i>In frame</i> : adição ou remoção de um ou mais aminoácidos; Local de <i>splicing</i> : remove ou cria um local de <i>splicing</i>
Genética: mutações de larga escala	Duplicação/amplificação	Ganho de uma ou mais cópias de grande parte da região cromossomal ou de um cromossoma inteiro	Aumento do número de genes únicos ou múltiplos.
	Deleção	Perda de uma grande parte da região cromossomal ou de um cromossoma inteiro.	Diminuição do número de genes únicos ou múltiplos. Criação de novos genes de fusão. Expressão de genes aberrantes em novo contexto.
	Translocação	Troca entre cromossomas não homólogo	Criação de novos genes de fusão; expressão de genes aberrantes em novo contexto.
	Inversão	Inversão da orientação de um segmento cromossomal.	Criação de novos genes de fusão; expressão de genes aberrantes em novo contexto.
	Perda de heterogeneidade	Perda de um alelo, quer por deleção ou recombinação.	Redução de dois alelos para um alelo para um único ou múltiplos genes.
Epigenética	Adição ou remoção de um grupo metil do DNA	Nos locais de CpG, conversão de citosina em 5-metilcitosina.	Silenciamento ou ativação da expressão do gene.
	Modificação das histonas	Acetilação, metilação, ubiquitilação, fosforilação	Silenciamento ou ativação da expressão do gene.

Anexo B

Esquematização de protocolos de quimioterapia aplicados ao cancro colo-retal

Segundo a compilação de protocolos de quimioterapia de 2015 de Kuehretal. (2013), existem várias combinações possíveis para a terapêutica do CCR, tal como será evidenciado em seguida, na tabela B.

Tabela B - Protocolos de quimioterapia a aplicar no cancro colo-retal. Adaptado de Kuehr et al. (2013) (144).

Fármacos		Dias	Dose (mg/m ²)	Dia de repetição	Nº de ciclos
5-FU		1,2,15,16	(400+600) +200	29	6
+ LEUCOVORINA					
FOLFIRI	5-FU	1,2,15,16 *1,15*	(400+600) +200 +180	29	6
	+ LEUCOVORINA				
	+ IRINOTECANO*				
5-FU		1,2,15,16 *1,15*	(400+600) +200 +180 + 5mg/kg	29	6
+ LEUCOVORINA					
+ IRINOTECANO*					
+ BEVACIZUMAB*					
FOLFIRI		1,15	(400+2400) +400 +180 +4 mg/Kg	29	6
+ AFLIBERCEPT					
FOLFOX IV	5-FU	1,2,15,16 *1,15*	(400+600) +200 +85 +5 mg/kg	29	6
	+ LEUCOVORINA				
	+ OXALIPLATINA*				
	+ BEVACIZUMAB*				
FOLFOX IV	5-FU	1,2,15,16 *1,15*	(400+600) +200 +85 + 6mg/Kg	29	6
	+ LEUCOVORINA				
	+ OXALIPLATINA*				
	+ PANITUMUMAB*				

FOLFOX IV	5-FU	1,15	(400+ 2400)	29	6
	+ LEUCOVORINA		+400		
	+ OXALIPLATINA		+100		
FOLFIRI	5-FU*	1,8,15,22	(400+2400)	29	6
	+ LEUCOVORINA*		+400		
	+ IRINOTECANO*		+180		
	+ CETUXIMAB		+250		
IRINOTECANO		1,8,15,22	125	36	4ou+
IRINOTECANO + CETUXIMAB		1	125 +250	8	Até progressão da doença
(HD 5-FU) 5-FU + LEUCOVORINA		1,8,15,22,29,36	2600 +500	50	Se bem tolerado, manter até progressão da doença
CAPECITABINA		1-14	2500	22	Se bem tolerado, manter até progressão da doença
CAPECITABINA* + IRINOTECANO		(1-14)*, 1,8	2000 +80	22	6
CAPECITABINA* + OXALIPLATINA		(1-14)*, 1,8	2000 +70	22	6
RALTITREXED		1	3	22	6
PANITUMUMAB		1	6 mg/Kg	15	
REGORAFENIB		1-21	160 mg	29	

Nota: Leucovorina, também referida como folinato de cálcio ou ácido folínico é utilizado como modulador do 5-FU e, por isso, deve ser administrada antes do 5-FU; cetuximab: 1 hora de gap entre cetuximab e outro agente quimioterápico.