



Nanopartículas de ouro no tratamento do cancro da mama

Raquel Patrícia Marques

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob orientação de
Professora Doutora Ana Margarida Grenha

2017



Nanopartículas de ouro no tratamento do cancro da mama

Raquel Patrícia Marques

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob orientação de
Professora Doutora Ana Margarida Grenha

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2017

Nanopartículas de ouro no tratamento do cancro da mama

Declaração de autoria de trabalho

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

(Assinatura do Autor)

Copyright© Raquel Marques.

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

Agradecimentos

Começo por agradecer à minha orientadora, a Professora Doutora Ana Margarida Grenha por todo o apoio e disponibilidade que demonstrou na realização da presente monografia.

Aos meus pais e irmão agradeço imenso todos os esforços realizados, a dedicação, carinho, reconhecimento e todo o apoio que demonstraram sempre ao longo de todo o meu percurso.

A todos os meus amigos, especialmente aos mais próximos, e a todas as pessoas com quem me cruzei nesta jornada agradeço toda a amizade e todas as memórias.

Agradeço a todos os que de alguma forma se cruzaram comigo e contribuíram ao longo desta caminhada.

A todos, muito obrigada!

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
LISTA SIGLAS E ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	4
3. METODOLOGIA.....	4
4. CANCRO DA MAMA.....	5
4.1. Classificação fisiológica e molecular.....	5
4.2. Epidemiologia.....	5
4.3. Diagnóstico e Estadiamento.....	5
4.4. Sintomas e Tratamento convencional.....	7
5. SISTEMAS NANOPARTICULADOS.....	10
5.1. Nanopartículas magnéticas.....	11
5.1.1. Nanopartículas de ouro.....	14
5.1.1.1. Aplicação de nanopartículas de ouro no diagnóstico de cancro....	17
5.1.1.2. Aplicação de nanopartículas de ouro no tratamento fototérmico de cancro.....	18
6. NANOPARTÍCULAS DE OURO E A SUA APLICAÇÃO NO CANCRO DA MAMA.....	20
6.1. Vetorização das nanopartículas.....	20
6.2. Funcionalização da superfície.....	25
6.2.1. Tiol.....	25
6.2.2. PEG.....	27
6.2.3. Folato.....	29
6.2.4. Transferrina.....	29
6.2.5. Conjugação de componentes.....	30
6.3. Toxicidade das nanopartículas.....	32
6.4. Perspetivas Futuras.....	34
7. CONCLUSÃO.....	36

8. REFERÊNCIAS.....37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 5.1. Tipos de sistemas utilizados em nanomedicina.....	11
Figura 5.2. Várias formas das nanopartículas.....	16
Figura 6.1. Natureza funcional das NPO.....	21
Figura 6.2. Esquema que representa a ‘vetorização passiva’ e a ‘vetorização ativa’.....	22
Figura 6.3. Imagens de microscopia de fluorescência dos efeitos citotóxicos em células de cancro da mama de <i>nanorods</i> de ouro sozinhos e nas combinações com nanopartículas de albumina e nanopartículas de albumina com PTX, num tratamento com e sem radiação.....	27
Figura 6.4. Curvas dose-resposta dependentes do tempo para a viabilidade celular de células de cancro da mama incubadas com concentrações equivalentes de TMX-PEG-tiol como fármaco livre (a) e como conjugado de NPO (b); e comparação dos valores de IC ₅₀ das duas estratégias (c).....	31

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1. Taxa de incidência (por 100 000 habitantes) e mortalidade dos tumores malignos por patologia em Portugal (2014).....	6
--	---

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

α -HFR	Recetor do folato humano α
β -CD	β -Ciclodextrina
CF	Ciclofosfamida
CP	Cisplatina
CTAB	Brometo de cetrimónio
DGS	Direção-Geral de Saúde
DOX	Doxorrubicina
DTX	Docetaxel
EPR	Fenómeno de permeabilidade e retenção aumentada
HER2	Fator de crescimento epidérmico humano 2
IARC	Internacional Agency for Research of Cancer
LHRH	Hormona libertadora da hormona luteinizante
MTX	Metotrexato
NIR	Infra-vermelho próximo
NPM	Nanopartículas magnéticas
NPO	Nanopartículas de ouro
PEG	Polietilenoglicol
PTX	Paclitaxel
PVA	Álcool polivinílico
rhTNF	Fator de necrose tumoral recombinante do vírus humano
siRNA	small interfering RNA
TF	Transferrina
TGF- β 1	Fator de transformação do crescimento β 1
TMX	Tamoxifeno
uPAR	Recetor ativador de plasminogénio do tipo uroquinase
U11	Péptido curto de 11 aminoácidos

RESUMO

O cancro é uma importante causa de morte e um grave problema de saúde pública no mundo. Apesar de todos os esforços feitos para desenvolver novas opções terapêuticas e fármacos anti-tumorais, o cancro da mama é a terceira causa de morte devida ao cancro em Portugal e o mais comum nas mulheres. Embora tenham sido obtidos desenvolvimentos notáveis no tratamento do cancro da mama, ainda permanecem muitos obstáculos, incluindo a redução dos efeitos adversos devido ao tratamento e o equilíbrio entre a toxicidade do tratamento e a qualidade de vida dos doentes com cancro metastático que já realizaram tratamento extensivo.

As nanopartículas têm sido apresentadas nesta área do desenvolvimento de terapêuticas como uma ferramenta de elevado valor. A aplicação de nanopartículas de ouro, em particular, em imagem e tratamento do cancro, é particularmente promissora. Além de serem biocompatíveis e não tóxicas, a ressonância plasmónica à superfície melhora a dispersão e absorção de luz. Assim, é também melhorada a sua capacidade de converter a luz absorvida em calor localizado, tornando-as adequadas como agentes para o tratamento fototérmico do cancro, que resulta em eliminação térmica das células cancerígenas. Além disso, a elevada relação superfície/volume das nanopartículas de ouro permite a biofuncionalização da sua superfície com ligandos e com polímeros biocompatíveis que as podem direcionar especificamente para as células cancerígenas, tornando-as mais adequadas para aplicações *in vivo*.

O objetivo deste trabalho é apresentar as potencialidades das nanopartículas de ouro no tratamento do cancro da mama, exemplificando as moléculas que podem funcionalizar a superfície e algumas conjugações com fármacos anticancerígenos com o objetivo de maximizar a eficácia terapêutica. Será também efetuada uma revisão geral quanto às nanopartículas sendo abordados os seus tipos, vectorização e potencialidades e uma revisão quanto à patologia do cancro da mama, incluindo tópicos como classificação, diagnóstico e tratamento convencional.

Palavras-chave: cancro da mama; entrega de fármacos; hipertermia; nanopartículas de ouro; quimioterapia

ABSTRACT

Cancer is an important cause of death and a serious problem of public health worldwide. Despite all efforts made to develop new therapeutic options and anti-tumoral drugs, breast cancer is still the third cause of death due to cancer in Portugal and the most common in women. Although notable developments have been achieved in the treatment of breast cancer, some obstacles still remain, including reducing treatment-related adverse events and balancing treatment toxicity with quality of life in patients with metastatic cancer who have already received extensive therapy.

Nanoparticles have been presented in this area of the development of therapeutics as a very valuable tool. Application of gold nanoparticles, particularly, in cancer imaging and therapy, is notably promising. Apart from being biocompatible and non-toxic, surface plasmon resonance enhanced light scattering and absorption. Thus, its ability to convert absorbed light into localized heat is also improved, making them suitable as agents for the photothermal treatment of cancer, resulting in thermal elimination of cancer cells. Moreover, the high surface-to-volume ratio of gold nanoparticles supports the bio-functionalization of their surface with ligands and biocompatible polymers that can specifically target cancer cells, making them more suitable for *in vivo* applications.

The objective of this work is to present the potentialities of gold nanoparticles in the treatment of breast cancer, exemplifying the molecules that can functionalize the surface and some conjugations with anticancer drugs in order to maximize the therapeutic efficacy. It will also be made a general review of the nanoparticles, including their types, vectorization and potentialities, and a review of the pathology of breast cancer, including topics such as classification, diagnosis and conventional treatment.

Keywords: breast cancer; chemotherapy; drug delivery; gold nanoparticles; hyperthermia

1. INTRODUÇÃO

O cancro é um problema de saúde pública em todo o mundo. Segundo estimativas da International Agency for Research on Cancer (IARC), em 2012 verificaram-se 8.2 milhões de mortes devido ao cancro e o aparecimento de 14.1 milhões de casos no mundo, sendo que não estão incluídos cancros de pele não melanoma (1). O cancro é um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo, caracterizadas pelo crescimento descontrolado de células anormais e difusão além dos seus limites normais, podendo invadir partes adjacentes do corpo e alastrar para outros órgãos, sendo este processo referido como metastização. Se o crescimento não for controlado pode resultar em morte (2-4). O cancro é causado por fatores externos, como tabaco, álcool, infeções, hábitos alimentares, obesidade e estilo de vida sedentário, e fatores intrínsecos, tais como mutações genéticas hereditárias, hormonas e condições imunológicas (3, 5).

O cancro da mama é o mais comum em mulheres em todo o mundo com cerca de 1.7 milhões de novos casos diagnosticados em 2012, representando 25% de todos os novos casos de cancro em mulheres. Este cancro é a principal causa de morte por cancro entre as mulheres nos países em desenvolvimento e a segunda principal causa de morte por cancro (após o cancro do pulmão) entre as mulheres nos países desenvolvidos (3).

O cancro da mama é normalmente detetado durante um exame de rastreio, antes dos sintomas se desenvolverem, ou depois do reconhecimento da presença de um nódulo. A maioria das massas observadas num mamograma e a maioria dos nódulos mamários tornam-se benignos, ou seja não são cancerígenos, não crescem descontroladamente nem se difundem, e não são fatais. Quando existe suspeita de cancro é necessária análise microscópica do tecido mamário para um diagnóstico definitivo e para determinar a extensão do alastramento (*in situ* ou invasiva) e caracterizar o tipo de doença. O tecido para análise microscópica pode ser obtido através de uma agulha ou biópsia cirúrgica (6).

Existem várias hipóteses de tratamento, de acordo com o estadió da doença, que incluem quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, imunoterapia e cirurgia. O tratamento com certos fármacos com seletividade para o cancro tem demonstrado ter maior eficácia terapêutica e menores efeitos adversos. Apesar dos avanços observados

nos últimos anos no sentido de entender a natureza clínica e biológica do cancro da mama e dos avanços registados ao nível do seu tratamento, este é um problema que permanece e que se tem tornado cada vez mais complexo (7, 8).

É neste contexto que tem surgido a nanomedicina, que se apresenta como uma opção terapêutica deveras promissora e que consiste na aplicação da nanotecnologia em medicina. Por sua vez a nanotecnologia é a criação e utilização de materiais, dispositivos e sistemas através do controlo da matéria à nanoescala, em dimensões de aproximadamente 1-100 nm (9, 10). Trabalhar a esta escala pode constituir importantes avanços na deteção, diagnóstico e tratamento do cancro. As nanopartículas são um tipo de nanotecnologia e têm sido desenvolvidas com a finalidade de obter imagens tumorais *in vivo*, através do desenvolvimento de um perfil biomolecular de biomarcadores de cancro, e de adquirir distribuição seletiva de fármacos, podendo estas técnicas ser amplamente aplicadas em diferentes doenças (11).

Existem vários tipos de sistemas de entrega de fármacos à escala nano, entre os quais se encontram quantum dots, nanocristais, dendrímeros, lipossomas, nanopartículas lipídicas, nanopartículas magnéticas e nanopartículas poliméricas, entre outros. As nanopartículas magnéticas (NPM) constituem uma importante classe de nanomateriais amplamente estudada devido ao seu potencial uso em biomedicina. Estas requerem um revestimento superficial especial para apresentarem utilidade em medicina, que não só tem de ser não tóxico e biocompatível, como também se pretende que permita uma distribuição seletiva. A natureza dos revestimentos superficiais das nanopartículas não só determina o tamanho global do colóide, mas também desempenha um papel significativo na bioquímica e na biodistribuição das nanopartículas no organismo. As NPM podem ser funcionalizadas através da ligação a fármacos, proteínas, enzimas, anticorpos ou nucleótidos e podem ser dirigidas a um órgão, tecido ou tumor usando um campo magnético externo. Alternativamente podem ser aquecidas utilizando campos magnéticos alternados para aplicação em hipertermia (10). Um dos tipos de NPM mais comuns são as nanopartículas de ouro, que têm propriedades físico-químicas únicas e a capacidade de ligação a vários tipos de moléculas, possibilitando a funcionalização da superfície e permitindo o seu uso em medicina. A funcionalização da superfície das nanopartículas tem sido alvo de intensa investigação e têm sido observados progressos no que se refere ao desenvolvimento de

partículas biocompatíveis e multifuncionais para aplicação no diagnóstico e tratamento do cancro (12).

2. OBJETIVO

Esta monografia tem o intuito de demonstrar as potencialidades das nanopartículas de ouro no tratamento do cancro da mama exemplificando as várias moléculas que podem ser utilizadas para funcionalizar a sua superfície e, deste modo, aumentar a sua seletividade e eficácia terapêutica. Para melhor contextualizar este tema será realizada uma abordagem geral do cancro da mama e uma apresentação ao tema das nanopartículas.

3. METODOLOGIA

No desenvolvimento da presente monografia foram utilizadas várias fontes bibliográficas.

Inicialmente foi realizada uma recolha de informação científica relevante através de pesquisa bibliográfica, tendo sido utilizadas as bases de dados PubMed, B-On e Google Scholar. A pesquisa foi efetuada utilizando os termos “breast cancer”, “gold nanoparticles” e “gold nanoparticles in breast cancer”. Esta pesquisa permitiu o acesso a diversos artigos sobre o tema, tendo sido considerados os que tinham sido publicados desde 2012 até setembro de 2017.

Foram também consultadas algumas páginas de internet de instituições/organizações relacionadas com o tema para a recolha de informação sobre a patologia, tais como a Organização Mundial de Saúde (OMS), a Direção Geral de Saúde (DGS) e a Laço.

Após a recolha bibliográfica foi efetuada a seleção da informação científica, tendo em conta a atualidade e relevância da mesma. Toda a informação utilizada para o desenvolvimento da presente monografia encontra-se devidamente referenciada.

4. CANCRO DA MAMA

A mama é constituída por glândulas mamárias sendo, estes órgãos os principais responsáveis pela produção de leite (13). O cancro da mama surge quando as células da mama começam a multiplicar-se de forma descontrolada, provocando uma massa de células anormais ou tumor. O tumor é considerado maligno se as células cancerígenas entrarem no sangue ou sistema linfático. Se estas células forem transportadas para outras partes do corpo podem originar novos tumores, designados metástases. Quando o cancro inicial surge na mama as metástases aparecem mais frequentemente nos pulmões, nos ossos, no cérebro e no fígado. A maioria dos cancros da mama ocorre em mulheres, mas os homens também podem ter a doença (14, 15). Esta monografia irá apenas abordar o cancro da mama feminino.

4.1. Classificação fisiológica e molecular

O cancro da mama pode começar a partir de diferentes partes da mama podendo ser dividido em cancro ductal, se começar nos ductos que transportam leite para o mamilo; cancro lobular, se iniciar nas glândulas que produzem o leite materno; cancro da mama inflamatório, em que as células cancerígenas bloqueiam os vasos linfáticos na pele; podendo ainda existir outros tipos que são menos comuns (14, 15).

O cancro que se mantenha dentro dos “limites” dos ductos ou dos lóbulos designa-se ‘carcinoma *in situ*’, quanto o cancro que tenha ultrapassado estes “limites” se designa ‘invasivo’ (16).

Existem vários subtipos moleculares de cancro da mama, os quais se distinguem em relação à presença ou ausência dos recetores de estrogénio, recetores de progesterona e sobre expressão do recetor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2). O cancro pode assim ser classificado em luminal A, luminal B, HER2 e o cancro que não possui nenhum destes recetores é denominado cancro da mama triplo negativo (17). Assim sendo, existe um risco acrescido de desenvolvimento de cancro se houver sobre expressão destes recetores, além dos fatores de risco como idade, sexo, raça e história familiar. Além destes, o estilo de vida, a dieta, o uso de contraceptivos hormonais orais ou a terapia de reposição hormonal podem influenciar o aparecimento do cancro (18-20).

4.2. Epidemiologia

Em 2016, segundo a American Cancer Society, o cancro da mama foi o mais comum nas mulheres em todo o mundo e o segundo cancro com a taxa de mortalidade mais elevada (21).

Segundo a Direção-Geral de Saúde (DGS), em Portugal o cancro da mama é o segundo cancro mais incidente entre a população, seguindo-se ao cancro da próstata sendo a terceira neoplasia com mais mortalidade depois do cancro da traqueia, brônquios e pulmão e do cancro da próstata (Tabela 4.1.) (22).

Tabela 4.1. Taxa de incidência (por 100 000 habitantes) e mortalidade dos tumores malignos por patologia em Portugal (2014) [Adaptado de (22)].

Tumores malignos	Incidência	Tumores malignos	Mortalidade
Próstata	120,3	Traqueia, brônquios e pulmão	37,8
Mama	62,5	Próstata	36,2
Cólon	47,6	Mama (feminina)	30,4
Traqueia, brônquios e pulmão	35,8	Cólon	25,8
Estômago	27,8	Estômago	22,0

4.3. Diagnóstico e Estadiamento

A deteção do cancro da mama pode ser efetuada através de exames imagiológicos de rastreio ou de profilaxia, considerando a idade, história familiar em combinação com um exame físico e a avaliação dos antecedentes pessoais e confirmado com avaliação patológica (23, 24).

A mamografia utiliza raios-X para avaliar o tecido mamário e permanece o método de eleição na deteção imagiológica do cancro da mama bem como na primeira abordagem no diagnóstico de cancros que se manifestam clinicamente (16, 23).

A ecografia contribui também para a deteção de algumas neoplasias, sendo utilizada sobretudo como complemento da mamografia na deteção de cancros em mulheres com alta densidade mamária, melhorando a sensibilidade e a especificidade ao permitir uma melhor caracterização das lesões detetadas no exame mamográfico. Esta técnica é a primeira linha de diagnóstico em mulheres jovens (< 35 anos). A ecografia é bastante útil para distinguir um nódulo sólido de um quisto preenchido com

líquido, sendo que uma massa sólida tem mais probabilidade de ser um cancro do que um quisto (16, 23, 25).

A ressonância magnética é o método mais sensível na deteção do cancro da mama, contribuindo principalmente nas doentes de alto risco e no carcinoma oculto. Nesta técnica é utilizada a injeção de material de contraste para diferenciar áreas de tecido anormal e áreas de tecido normal. A ressonância magnética é recomendada na avaliação pré-terapêutica das doentes de alto risco (16, 23).

Um diagnóstico pode conter falsos negativos e falsos positivos pelo que as imagens radiológicas que, pelas suas características morfológicas, são suspeitas de malignidade, implicam um diagnóstico histológico definitivo antes de qualquer abordagem terapêutica. Na biópsia é retirado tecido ou fluido mamário de modo a ser analisado (16, 23, 26).

Depois da mulher ser diagnosticada com cancro da mama, os médicos irão determinar se o cancro se espalhou e, em caso afirmativo, qual a proporção. Este processo é chamado de estadiamento. O estadio normalmente é expresso como um número numa escala de 0 a IV, sendo o estadio 0 o que descreve cancros não-invasivos que permanecem dentro da localização original e o estadio IV o que descreve cancros invasivos que se difundem para fora do peito, para outras partes do corpo. Alguns estadiamentos têm sub-estadios designados com as letras A, B e C sendo que uma letra inferior significa um estadio inferior (27).

O cancro da mama pode ainda ser classificado consoante o sistema TNM do American Joint Committee on Cancer, que depende do tamanho do tumor da mama (T) e se ele cresceu em tecidos próximos; se o cancro atingiu os nódulos linfáticos próximos (N); se o cancro está metastizado (M). O estadiamento é um fator bastante importante para decidir procedimento para o tratamento e, deste modo, determinar o seu sucesso (27).

4.4. Sintomas e Tratamento convencional

Esta patologia pode não apresentar sintomas, mas quando existem podem variar consoante a pessoa, podendo o cancro apenas ser descoberto após uma mamografia de rotina. Alguns sinais de alerta de cancro da mama são: um novo nódulo no peito ou nas axilas; dor em qualquer área do peito; espessamento ou inchaço de alguma parte do

peito; irritação da pele da mama; mudança na posição do mamilo; vermelhidão ou pele escamosa na área do mamilo ou na mama; saída de líquido do mamilo em mulheres que não estão grávidas ou a amamentar; qualquer alteração no tamanho ou na forma do peito (28, 29).

O tratamento do cancro da mama tem evoluído bastante nos últimos anos, com tendência a abordagens cada vez menos invasivas. Para o cancro da mama as opções terapêuticas incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia e terapêutica dirigida. A maior parte dos oncologistas recomendam uma ou mais destas combinações tendo em conta a informação sobre os recetores hormonais e do HER2, o grau, a dimensão e a disseminação do tumor para outros órgãos (16, 30).

A cirurgia pode consistir em remover a porção da mama com cancro ou a totalidade da mama (30).

A radioterapia consiste na exposição de uma área específica do corpo a radiação de alta energia para destruir as células cancerígenas. Este tratamento pode ser realizado externa ou internamente. O uso de radiação como tratamento adjuvante combina esta com cirurgia, quimioterapia ou ambos para tratar possíveis células cancerígenas residuais. Normalmente a quimioterapia é administrada antes do início do tratamento com radiação (23, 30).

Existe uma grande variedade de fármacos utilizados em quimioterapia, tendo esta como finalidade impedir a propagação do cancro para outras partes do corpo, diminuir o crescimento do tumor, eliminar as células cancerígenas, de modo a impedir a propagação destas para outros tecidos e diminuir a taxa de recidivas. A quimioterapia pode ser administrada antes ou depois da cirurgia, em conjugação ou não com outros tratamentos, e muitas vezes é utilizada uma combinação de fármacos (30, 31). Os regimes de quimioterapia são normalmente adaptados para cada doente e variam muito (30). Os regimes mais utilizados geralmente contêm antraciclinas (como a doxorrubicina) e/ou taxanos (como o paclitaxel), embora a combinação de ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluouracilo também seja muito utilizada (24).

Os citotóxicos utilizados em quimioterapia, devido à falta de seletividade, afetam não só as células cancerígenas como as células normais, uma vez que também se dividem e crescem constantemente o que pode conduzir a efeitos secundários. Alguns efeitos secundários são normalmente temporários uma vez que as células normais se

reparam a si próprias. Alguns dos efeitos secundários mais comuns são náuseas, vômitos, dor na boca e nos olhos, alopecia, supressão da medula óssea, cansaço, diarreia, problemas urinários e alteração da fertilidade (32).

A maioria das terapêuticas biológicas existentes para o cancro da mama são agentes que têm como alvo o recetor HER2, incluindo anticorpos monoclonais, inibidores de pequenas moléculas e conjugados de fármaco-anticorpo. São exemplos destes tratamentos o Trastuzumab e o Pertuzumab que são anticorpos monoclonais humanizados e o Lapatinib que é um inibidor da tirosina cinase (33, 34).

Para além das terapêuticas já aprovadas para o cancro da mama, existem atualmente muitos trabalhos de investigação que analisam a aplicação de sistemas nanoparticulados no tratamento da patologia devido às suas vantagens, que incluem a maior seletividade. Estes sistemas serão abordados com maior detalhe no próximo capítulo.

5. SISTEMAS NANOPARTICULADOS

A nanotecnologia consiste na ciência, engenharia e tecnologia utilizadas à nanoescala, ou seja, em dimensões de aproximadamente 1 a 100 nanómetros (35). A nanotecnologia envolve uma nova e ampla ciência, onde convergem diversas áreas como a física, a química, a biologia e engenharia à escala nano. A manipulação em nanoescala requer uma compreensão dos vários tipos e dimensões dos materiais, sendo que estes são denominados consoante as suas formas e dimensões (36).

A nanotecnologia pode ser aplicada na medicina em diversas áreas, como o diagnóstico baseado na utilização de sistemas nanoparticulados; medicina regenerativa, utilizando a nanotecnologia para reconstrução de tecidos; tratamento do cancro baseado em nanosistemas; desenho de novos fármacos; colocação de implantes como tecidos e órgãos artificiais com a finalidade de diminuir a probabilidade de rejeição (10, 37).

A nanotecnologia permite que os físicos, químicos e engenheiros produzam sistemas com tamanho nano, nos quais as leis clássicas da física são diferentes. À medida que o tamanho da partícula diminui, a proporção entre a área da superfície e o volume da partícula aumenta. Para as nanopartículas, esta proporção torna-se significativamente grande, fazendo com que uma grande fração de átomos resida na superfície em comparação com aqueles no núcleo da partícula. Por exemplo, numa partícula com 1 μm de diâmetro, cerca de 0,15% de seus átomos estão na superfície, enquanto que numa partícula de 6 nm de diâmetro, quase 20% dos seus átomos estão na superfície (38). A grande relação superfície/volume das nanopartículas é o fator chave para as novas propriedades físicas, químicas e mecânicas em comparação com as do material correspondente de maior tamanho. As propriedades físicas incluem as propriedades óticas, elétricas e magnéticas, enquanto que um exemplo das propriedades químicas é a taxa de reativação química, e a força e a dureza são exemplos de propriedades mecânicas.

As nanopartículas de diferentes tipos e tamanhos estão atualmente a ser produzidas através de vários métodos físicos e químicos e podem ser caracterizadas recorrendo a várias técnicas experimentais. A sua morfologia pode ser caracterizada

usando microscopia de força atômica, microscopia de tunelamento com varrimento e microscopia eletrônica de transmissão (38).

Existem vários tipos de sistemas usados em nanomedicina, muitos dos quais têm sido utilizados no tratamento do cancro. Estes incluem vetores virais, conjugados de fármacos, nanotransportadores à base de lipídios, de polímeros e inorgânicos, como se exemplifica na Figura 5.1. (39). Esta última classe tem vindo a ganhar reconhecimento, tendo particular impacto no tratamento do cancro e, especificamente, no cancro da mama. Em seguida serão detalhadas as características destas nanopartículas.

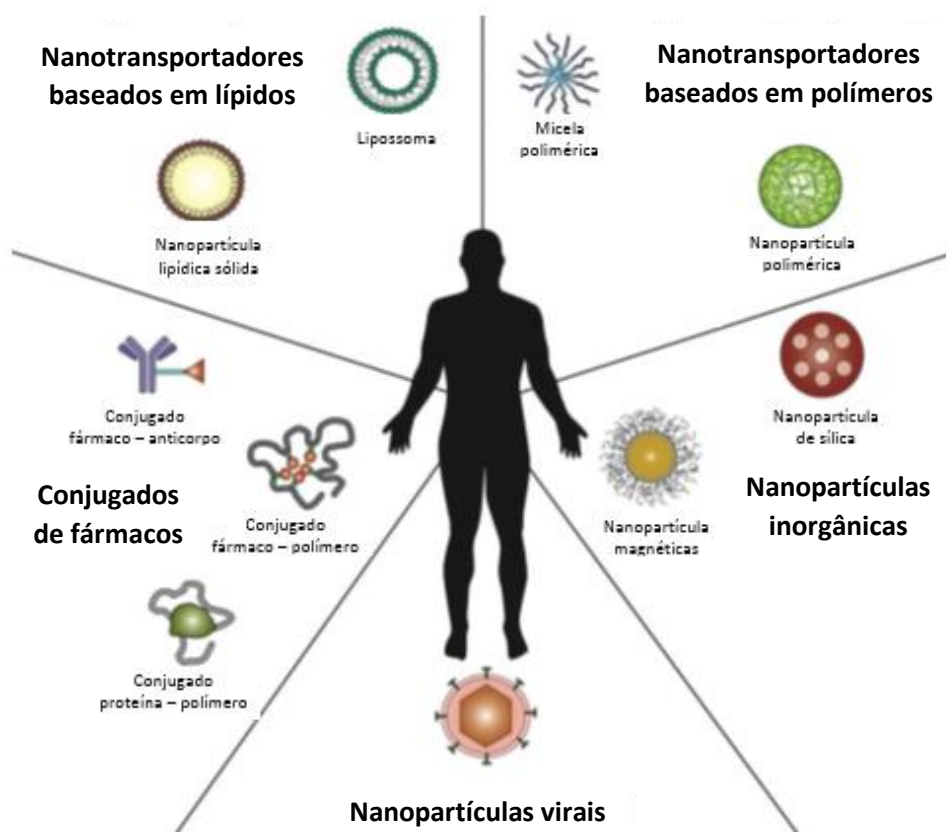


Figura 5.1. Tipos de sistemas utilizados em nanomedicina [Adaptado de (39)].

5.1. Nanopartículas magnéticas

As NPM pertencem à classe das inorgânicas, tais como as NP de sílica, e são sistemas que mostram alguma resposta quando é aplicado um campo magnético (38). Entre os muitos nanosistemas desenvolvidos até ao momento, as nanopartículas inorgânicas constituem um dos progressos mais importantes devido às suas características únicas e possibilidade de funcionalização da superfície. As nanopartículas inorgânicas abrangem um grande grupo de substâncias incluindo metais no estado

elementar, óxidos metálicos e sais metálicos. Incluídas nesta categoria de nanopartículas encontram-se, por exemplo, as nanopartículas de prata, que são usadas em muitos produtos como bactericida, enquanto que as nanopartículas de ouro têm sido investigadas para muitas aplicações devido à sua atividade catalítica (40). As nanopartículas inorgânicas exibem propriedades interessantes e distintas das observadas nos materiais correspondentes de tamanho maior como por exemplo os nanomateriais semicondutores que normalmente apresentam uma variação significativa das propriedades eletrônicas, em função do tamanho. Tais propriedades podem ser usadas para sintonizar as características de absorção de luz nas regiões ultravioleta para o infravermelho próximo. Além disso, as frequências de ressonância plasmática, que resultam da oscilação de elétrons livres em fase com uma onda eletromagnética, mudam à medida que os tamanhos ou formas dos nanomateriais metálicos variam (40, 41).

Nas aplicações biomédicas, as nanopartículas podem ser administradas por via intravenosa ou por injeção direta localizada no local de ação. Ambos os métodos exigem que as partículas não aglomerem e, portanto, não inibam a sua própria distribuição. Esta estabilidade pode ser auxiliada pela modificação química da sua superfície, que consiste no revestimento das nanopartículas com polímeros de alto peso molecular, tem o efeito mais direto de aumentar o tamanho hidrodinâmico das partículas (reduzindo assim as suas propriedades de difusão) e modificando as propriedades de transporte e biodistribuição. O revestimento também desempenha um papel na estabilidade coloidal das partículas contra agregação e sedimentação gravitacional, reduzindo as forças dipolo-dipolo entre partículas. Os revestimentos mais comuns são os derivados de dextrano, álcool polivinílico (PVA), polietilenoglicol (PEG). Por exemplo, demonstrou-se que a simples redução do açúcar terminal num revestimento de dextrano tem um efeito significativo não apenas na estabilidade do revestimento, mas também no tamanho da partícula e propriedades magnéticas. O revestimento à base de micela de fosfolípido-PEG foi utilizado para encapsular nanopartículas de óxido de ferro monocristalino o que demonstrou ter a vantagem de controlar a espessura da camada de revestimento independentemente do núcleo magnético. Isto foi conseguido simplesmente variando o comprimento do polímero de PEG que está na superfície externa da partícula (38).

As NPM injetadas por via intravenosa, no que respeita à entrega do fármaco no tecido alvo, atravessam três etapas sucessivas: (1) são dirigidas magneticamente para o tecido alvo; (2) são immobilizadas no tecido enquanto o medicamento é libertado, usando um campo magnético externo; e (3) são submetidas a eliminação do organismo. O transporte das NPM injetadas por via intravenosa através dos vasos sanguíneos é favorecido pelas forças hidrodinâmicas do fluxo sanguíneo. Logo após injeção intravenosa, ocorre uma interação imediata entre as nanopartículas e as proteínas plasmáticas (opsoninas). Esta interação resulta na adsorção de proteínas plasmáticas nos colóides magnéticos, num processo denominado opsonização. Esse processo de adsorção desempenha um papel fundamental no destino biológico das nanopartículas (isto é, biodistribuição e eliminação). Quando as proteínas opsonicas se aproximam da superfície das NPM, as interações facilitam a ligação da opsonina à superfície da nanopartícula. Em geral, a opsonização das partículas hidrofóbicas ocorre mais rapidamente em comparação com a das partículas hidrofílicas. O processo de opsonização resulta no reconhecimento por macrófagos e eliminação sistémica das nanopartículas (42).

Existem vários fatores que influenciam a farmacocinética e a biodistribuição das nanopartículas injetadas por via intravenosa, entre eles o tamanho das nanopartículas, uma vez que deste depende a adsorção de proteínas plasmáticas na superfície das nanopartículas. A quantidade de proteína plasmática adsorvida é inferior para as NP menores (6% de proteína adsorvida em partículas com 80 nm) e é superior para as NP de tamanho relativamente maior (23% e 34 % de proteína adsorvida em partículas entre 171 e 240 nm de tamanho). Consequentemente a eliminação sistémica das partículas menores é mais lenta do que a das NP maiores. Além disso, as NP de tamanho superior a 200 nm passam por filtração no baço, resultando na absorção neste local, enquanto que as partículas de tamanho entre 50 e 100 nm têm elevada probabilidade de ficarem absorvidas no parênquima hepático. As NP superiores a 4 µm de diâmetro ficam retidas principalmente nos pulmões e podem levar ao risco de embolia. Assim, o tamanho e a distribuição de tamanho das NP devem ser adaptadas de acordo com a farmacocinética e distribuição pretendidas (42). A carga da superfície das nanopartículas também pode ter influência na biodistribuição após a injeção intravenosa. A carga neutra interage minimamente com as proteínas plasmáticas (menor opsonização) e, assim, aumenta o

tempo de circulação das nanopartículas, enquanto que uma alta carga superficial (positiva ou negativa) aumenta o processo de fagocitose. Ao contrário do efeito geralmente esperado de que a densidade de carga global negativa na membrana da célula limitava as interações electrostáticas eficientes entre a superfície da célula e as nanopartículas aniónicas, foi relatado que as NPM aniónicas interagem eficientemente com as células e eram internalizadas por endocitose adsortiva. Além das características físico-químicas, a via de administração também pode influenciar a biodistribuição das nanopartículas. Quando injetadas localmente (por exemplo, subcutaneamente ou intratumoralmente) no local da doença, as partículas magnéticas pequenas passam por infiltração passiva nos espaços intersticiais em torno do local de injeção e são gradualmente absorvidas pelo sistema capilar linfático. Por esta razão, as nanopartículas injetadas localmente (≤ 60 nm) são usadas como alvo do sistema linfático (por exemplo, quimioterapia ou imagem de tumores linfáticos). Neste caso, o magnetismo pode não ser um pré-requisito, mas pode ser uma propriedade útil para imobilizar as partículas no lugar por um período mais longo ou para permitir a hipertermia (42-44).

Devido à potencialidade das nanopartículas de ouro como os novos agentes promissores no tratamento do cancro, esta monografia incide neste tema, especificando a aplicação no cancro da mama.

5.1.1. Nanopartículas de ouro

O estudo das nanopartículas de ouro (NPO) provém desde o século XIX em que Michael Faraday publicou o primeiro artigo científico sobre a sua síntese, descrevendo a produção de ouro coloidal pela redução do ácido cloroáurico pelo fósforo (45). No final do século XX, técnicas como a microscopia eletrónica de transmissão e a microscopia de força atómica permitiram a imagem direta das NPO, o que permitiu melhorar o controlo de propriedades como o tamanho e o revestimento superficial (46).

Considerando o tamanho e a funcionalidade da superfície, as NPO podem ser divididas principalmente em três grupos: colóides de ouro, NPO protegidas por uma monocamada orgânica e pequenos aglomerados de ouro. Os colóides de ouro são grandes partículas de metal com uma gama de tamanho entre 10 e 100 nm, geralmente obtidas por redução de sais de Au (III) na presença de agentes redutores leves, mais comumente citrato trissódico, em procedimentos criados por Turkevich e Frens e

melhorados por Natan (40, 47). As partículas resultantes são estabilizadas através do citrato adsorvido à superfície de modo a limitar a agregação por repulsão eletrostática. Esta estabilização, de natureza eletrostática, não permite o uso de colóides em meios de força iónica elevada, uma vez que a adição de sais a uma suspensão coloidal resulta em agregação irreversível. No entanto, os colóides de ouro podem ser estabilizados por adsorção de uma grande variedade de compostos tais como proteínas ou polímeros mas também por interação com outros compostos, tais como os tióis, que formam uma monocamada compacta à superfície. A síntese dos colóides é muitas vezes realizada sob controlo cinético em vez de termodinâmico, o que não permite a obtenção da estrutura mais estável possível nas condições de reação empregadas. Como consequência, as preparações de colóides de ouro contêm frequentemente partículas com uma grande variedade de formas e são normalmente polidispersas, tendo uma distribuição de tamanhos relativamente grande. Atualmente, estão disponíveis os procedimentos para a obtenção de *nanorods* e nanocubos de ouro que frequentemente dependem do uso de modificadores de superfície específicos e moléculas inicias utilizadas durante a síntese (40).

As nanopartículas protegidas por monocamada são partículas com um núcleo de ouro com um tamanho na gama entre 1 e 10 nm, rodeado por uma monocamada de ligandos fortemente ligados, sendo que os sistemas mais estudados são estabilizados pelos tióis. Os materiais resultantes são muito estáveis, devido à força da ligação entre o ouro e o enxofre (40). As nanopartículas protegidas por monocamada ficaram disponíveis após a síntese desenvolvida por Brust e Schiffrin (48). Ao contrário dos colóides, as nanopartículas protegidas por monocamada são estáveis em solução e no estado sólido. A presença de uma monocamada funcionalizada impede a agregação irreversível e transmite solubilidade numa ampla gama de solventes, incluindo soluções aquosas e meios biológicos. As nanopartículas protegidas por monocamada são, em geral, preparadas sob controle cinético, têm uma polidispersão característica e são comuns os núcleos de metal com formas diferentes. Recentemente realizou-se uma análise termodinâmica teórica destinada a identificar as morfologias mais estáveis de pequenas nanopartículas de ouro, indicando que as formas de equilíbrio não dependem apenas da temperatura, mas também do tamanho das partículas, com transições de formas bem definidas que ocorrem em certos tamanhos críticos. Em geral, as formas

mais estáveis das partículas são aquelas com o desenvolvimento preferencial de superfícies de baixa energia. Os pequenos aglomerados de ouro representam o "limite inferior" das nanopartículas protegidas por monocamada sendo que estas entidades moleculares compreendem algumas dezenas de átomos e são tipicamente "atomicamente precisas", ou seja, estritamente monodispersas. A monodispersão dessas espécies é o resultado da sua estabilidade inerente sendo que, em vários casos, a preparação de pequenos aglomerados de ouro depende de um processo de "dimensionamento de tamanho" ou de um "ataque de tiol" que converta misturas polidispersas de aglomerados instáveis para uns mais estáveis. A monodispersão desses sistemas permite a sua cristalização e a obtenção de várias estruturas de aglomerados de ouro-tiolato através da detecção por raios-X (40).

As NPO podem assumir várias formas, como forma esférica, octaédrica, *nanorod*, entre outras (Figura 5.2.). Os *nanorods* de ouro são uma das estruturas preferenciais para tratamento fototérmico, uma vez que exibem alta absorção na região com luz da gama do infra-vermelha próximo (NIR), que é o comprimento de onda ótimo para a penetração em tecidos profundos no tratamento do cancro (49).

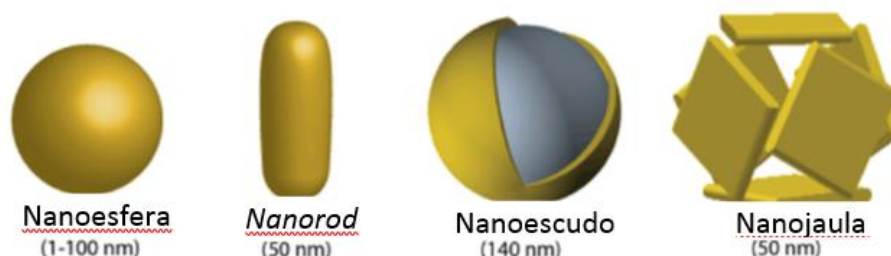


Figura 5.2. Várias formas das nanopartículas [Adaptado de (49)]

As nanoesferas de ouro são esferas sólidas de ouro obtidas pela redução do ácido cloroáurico, variando o seu diâmetro entre 5 e 100 nm. Estas nanopartículas são úteis para a obtenção de imagens biomédicas. Outro tipo de nanomateriais de ouro são os nanoescudos de ouro. Estas são também estruturas esféricas de tamanho entre 50 e 150 nm e são constituídos por um núcleo de sílica com uma fina camada de ouro envolvente. Os nanoescudos de ouro têm muitas aplicações em microscopia e imagem, pois as suas propriedades óticas podem ser ajustadas por ajuste do diâmetro do núcleo e da espessura do invólucro. Os *nanorods* de ouro são obtidos a partir de ouro e brometo de cetrimónio (CTAB) como agente estabilizador, a partir de ácido cloroáurico. Outras

formas de NPO incluem nanojaulas e nanoesferas de ouro oco e essas estruturas possuem excelentes atividades fototérmicas plasmónicas. As diferenças de tamanho, forma e propriedades superficiais das NPO são manipuladas para fins terapêuticos específicos, dependendo da natureza da aplicação pré-clínica ou clínica. As NPO são ideais para a seletividade dos fármacos e para a deteção de doenças com base em imagens num estágio inicial, porque os seus tamanhos são menores do que os alvos biológicos, o que permite que se liguem especificamente às biomoléculas localizadas na superfície celular ou dentro do citoplasma celular e organelos celulares (50).

Têm sido várias as vantagens atribuídas às nanopartículas de ouro, as quais incluem: (i) propriedades óticas, físicas e químicas únicas devido ao seu tamanho e forma; (ii) elevada área superficial, o que proporciona a ligação de vários fármacos; (iii) são biocompatíveis e permitem conjugação com pequenas biomoléculas, como proteínas, enzimas, ácido carboxílico, DNA e aminoácidos; (iv) têm dispersão de tamanhocontrolada; (v) devido ao tamanho pequeno e à dispersão uniforme, podem facilmente chegar ao local alvo com o fluxo sanguíneo; (vi) não são citotóxicas para as células normais; (vii) são facilmente sintetizadas por vários métodos com controlo do tamanho e da forma (51). Estas vantagens têm sido a base da sua proposta para aplicação no diagnóstico e tratamento de cancro, como se detalha nas secções seguintes.

5.1.1.1. Aplicação de nanopartículas de ouro no diagnóstico de cancro

As NPO exibem muitas aplicações no campo do diagnóstico molecular. O desenvolvimento de métodos para deteção precoce é importante para reduzir o impacto das doenças e para melhorar as taxas de sobrevivência. Como foi referido, as NPO têm elevada relação superfície/volume e podem ser funcionalizadas para alcançarem alvos específicos, oferecendo limites de deteção mais reduzidos e maior seletividade do que as estratégias convencionais. As NPO apresentam vantagens em relação aos corantes orgânicos de baixa toxicidade, como por exemplo muito melhor contraste do que os corantes orgânicos e propriedades óticas melhoradas na superfície (52, 53).

A abordagem de biodiagnóstico mais frequente envolve o conhecimento das sequências de nucleotídeos que são cruciais para o diagnóstico de doenças genéticas

como o cancro. Os conjugados de NPO – oligonucleótidos são utilizados para esse diagnóstico devido às suas propriedades óticas, uma área para a qual o grupo de Mirkin realizou contribuições importantes e numerosas. A hibridação não se limita à ligação dos nucleótidos à sequência alvo, mas consiste na formação de uma rede polimérica estendida e é detetada por colorimetria. De fato, as NPO são vermelhas, mas a hibridação de nucleotídeos entre as nanopartículas encurta a sua distância e as nanopartículas hibridizadas tornam-se azuis. Além disso, os nucleotídeos híbridos das nanopartículas exibem uma temperatura de transição mais baixa quando são desnaturados. Este recurso permite diferenciar sequências diretas imperfeitas e, assim, detetar doenças. Algumas NPO são funcionalizadas com a metade da sequência complementar da sequência alvo, e a outra parte com a outra metade. Quando as nanopartículas estão alinhadas de cauda a cauda, são detetadas imperfeições como as inserções (53).

A expressão de alguns antígenos no cancro é importante uma vez que as NPO funcionalizadas com anticorpos podem permitir o seu diagnóstico. Foram realizadas experiências utilizando antígenos específicos para o cancro da próstata. As NPO foram funcionalizadas com anticorpos para os antígenos específicos e depois foram incubadas com estes antígenos. Foi demonstrado que uma camada de ouro em torno da nanopartícula funcionalizada era mais eficiente do que uma camada de prata, levando ainda a um aumento da sensibilidade (53).

5.1.1.2. Aplicação de nanopartículas de ouro no tratamento fototérmico de cancro

As NPO, por possuírem ressonâncias plasmónicas altamente ajustáveis, têm a capacidade de absorver luz e converter rapidamente a energia luminosa absorvida em energia calorífica localizada. Esta propriedade pode ser aproveitada para causar morte térmica das células cancerígenas num processo chamado de tratamento hipertérmico/fototérmico do cancro. Dependendo do tamanho e da forma das NPO, a capacidade da nanopartícula de ouro para absorver a luz também varia. A hipertermia é uma técnica minimamente invasiva que induz apoptose celular em muitos tecidos,

usando-se geralmente em combinação com outros tratamentos, incluindo radioterapia (54).

As NPO têm sido demonstradas como tendo aplicações interessantes no tratamento do cancro da mama. Deste modo, o capítulo seguinte irá detalhar este tema.

6. NANOPARTÍCULAS DE OURO E A SUA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DO CANCRO DA MAMA

Recentemente, o ouro ganhou ampla atenção e estão a ser conduzidas pesquisas em larga escala em relação à sua aplicação médica devido, à sua natureza inerte e não tóxica. As NPO possuem propriedades físicas, químicas e biológicas únicas, sendo fáceis de produzir e o seu tamanho e forma podem ser controlados com precisão para influenciar a absorção celular. Além disso, o ouro é conhecido por ser um metal inerte, o que torna as nanopartículas biocompatíveis e adequadas para aplicações biológicas. As modificações de superfície das NPO expandem sua utilidade, permitindo-lhes ter como alvos sítios específicos na superfície celular, organelos, o núcleo ou a matriz extracelular (55).

6.1. Vetorização das nanopartículas

Existem muitos novos fármacos e biomoléculas para o tratamento do cancro, no entanto, o seu potencial clínico encontra certas limitações fisiológicas, terapêuticas e toxicológicas, tais como o efeito de barreira da membrana celular, um comportamento de resistência a fármacos desenvolvido pelas células cancerígenas através da expressão elevada de transportadores ou enzimas metabolizadoras de fármacos. Tal como observado no caso de quimioterapia convencional, a maioria dos agentes quimioterápicos exibe um grande volume de distribuição e penetra em órgãos e tecidos saudáveis. Pelo contrário, as estratégias para aumentar a seletividade dos fármacos restringem a distribuição de medicamentos a órgãos específicos e, assim, contribuem para reduzir os efeitos colaterais e aumentar a eficácia. A fraca solubilidade, em água e no fluido fisiológico, inerente à maioria dos fármacos anticancerígenos é outro problema associado à quimioterapia que requer o uso de outros solventes para sua administração. As abordagens de entrega dos fármacos baseadas na nanotecnologia podem superar os problemas de solubilidade. As nanopartículas têm potencial para melhorar o tratamento do cancro, prevenindo a resistência a múltiplos medicamentos e aumentando o índice terapêutico de fármacos anticancerígenos ao prolongar a circulação sistémica do fármaco, a sua entrega direcionada, a libertação como resposta a estímulos, a absorção endocítica e co-entrega de agentes de sensibilização à quimioterapia (56).

A Figura 6.1. ilustra a natureza multifuncional das NPO e diferentes moléculas que podem efetivamente entregar ao tecido e às células alvo. Existem vários ligandos que podem ser conjugados quimicamente com a nanopartícula através da troca / substituição de ligandos ou electrostaticamente e, alternativamente, podem ser utilizadas moléculas de ligação. As funcionalizações dependem dos grupos funcionais disponíveis tanto na superfície da nanopartícula como no ligando desejado (57).

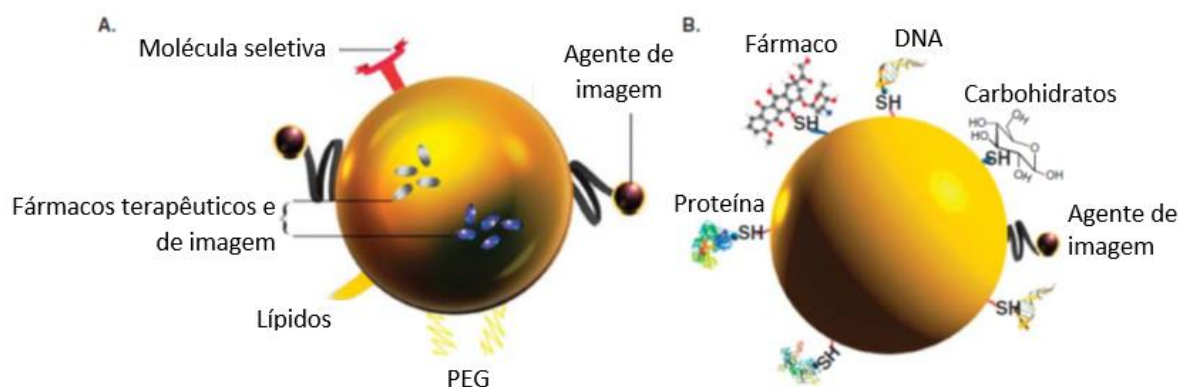


Figura 6.1. Natureza funcional das NPO. A) Ligandos como ácido fólico, anticorpos ou péptidos podem ser conjugados com as NPO de forma a permitir ‘vetorização ativa’. A funcionalização da superfície com polímeros hidrofílicos, como o PEG, podem aumentar as características para a ‘vetorização passiva’. B) Diferentes tipos de moléculas bioativas podem ser conjugadas ou incorporadas com as NPO de modo a atingir os seus alvos em células e tecidos [Adaptado de (56)].

Existem duas estratégias para a terapêutica visando os tecidos cancerígenos sendo elas a ‘vetorização passiva’ que depende da vasculatura vazante dos tecidos doentes que proporcionam o efeito de ‘permeabilidade e retenção aumentada’ (EPR) aos sistemas de suporte e a ‘vetorização ativa’ que envolve a funcionalização do sistema de distribuição terapêutico por ligação de moléculas de afinidade que interagem com recetores celulares específicos (Figura 6.2.). Foram adotadas abordagens estratégicas semelhantes no caso das NPO em oncologia. A superfície altamente ajustável e multivalente das nanopartículas permite integrar múltiplas terapêuticas por conjugação covalente ou não covalente (56, 58).

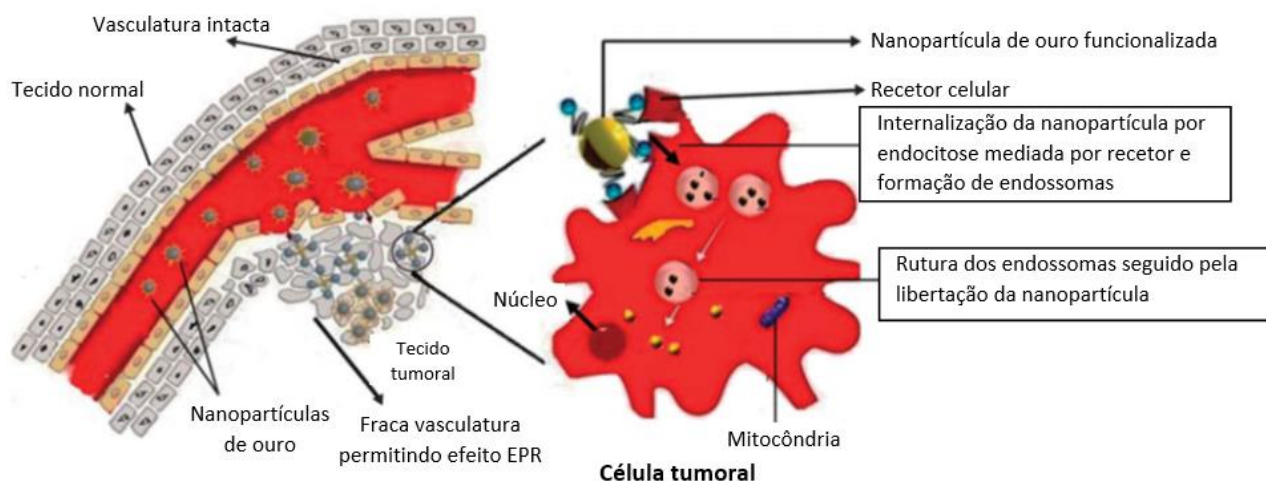


Figura 6.2. Esquema que representa a ‘vetorização passiva’ e a ‘vetorização ativa’ [Adaptado de (56)].

Uma estratégia promissora para atingir os tumores é a ‘vetorização ativa’ através do desenvolvimento de alvos ativos de células cancerígenas através do tratamento com formulações magnéticas ou através da interação mediada por ligandos, como anticorpos folatos, lectinas e péptidos apresentados à superfície das nanopartículas. Nos tratamentos de fármacos magnéticos, o fármaco ou outras moléculas ativas são conjugados numa superfície de uma nanopartícula magnética ou podem ser encapsulados com uma molécula magnética numa plataforma de nanosistemas tais como lipossomas, micelas ou dendrímeros. O alvo de formulações magnéticas tem sido estudado em tumores e várias doenças. Um campo magnético externo aplicado em tumores à superfície, deve atrair e manter os nanosistemas carregados com moléculas ativas na área de interesse (59).

A ‘vetorização passiva’ é considerada muito importante, uma vez que a acumulação de nanopartículas magnéticas livres na área do tumor pode aumentar a sua deteção e facilitar o diagnóstico. Na verdade, os tumores desenvolvem o seu próprio fornecimento de sangue a partir do sistema vascular existente. A angiogénese induzida pelo cancro produz vasos com características anormais, que apresentam fissuras e através deste estado de vasculatura com vazamento, as nanopartículas podem-se acumular nos tumores. No entanto, a ‘vetorização passiva’ depende também das diferentes propriedades físico-químicas das nanopartículas, como o seu tamanho, a carga superficial e a hidrofobia. De fato, as nanopartículas pequenas (< 20 nm) são

excretadas pelos rins, enquanto as nanopartículas de tamanho médio (30 -150 nm) foram já encontradas na medula óssea, coração, rim e estômago. Em contraste, grandes nanopartículas (> 150 nm) tendem a acumular no fígado e no baço. Alguns tumores têm efeito de permeabilidade e retenção aumentada, sendo este devido ao sistema de drenagem linfática deficiente em tumores sólidos causados pelo aumento da espessura da parede endotelial. Em consequência, as nanopartículas grandes não penetram facilmente no tumor, enquanto que as pequenas podem facilmente aceder ao mesmo. Prevê-se que as nanopartículas entre aproximadamente 10 e 100 nm, se acumulam preferencialmente nos tumores em oposição aos tecidos normais. Quanto às outras propriedades das nanopartículas, é sugerido que as hidrófobas e carregadas positivamente têm tempos de circulação curtos devido à opsonização, enquanto que as nanopartículas hidrofílicas e carregadas negativamente têm tempos de circulação prolongados. Em resumo, embora a vasculatura com vazamento seja uma vantagem enorme para a vetorização de tumores, a 'vetorização passiva' pode não permitir a acumulação de nanopartículas suficientes na área do tumor para imagem e tratamento com sucesso (59).

Existem vários tipos de ligandos que podem ser utilizados na 'vetorização ativa' de NPO (56). Como primeiro exemplo de 'vetorização ativa' podem citar-se as NPO conjugadas com PEG que foram desenvolvidas e conjugadas com transferrina (TF) humana demonstrando uma absorção significativamente melhor nas células cancerígenas. Destaca-se que a biodistribuição das nanopartículas foi independente do conteúdo de TF, mas a subsequente absorção pelas células alvo foi melhorada (60). Noutro estudo, no entanto, a distribuição das nanopartículas nos órgãos foi influenciada pela quantidade de TF acoplada às nanopartículas e verificou-se que as NPO foram pouco absorvidas pelas células alvo e, portanto, pequenas quantidades de nanopartículas acumularam-se nos hepatócitos (61).

A expressão excessiva de recetores de folato é uma característica comum de muitos tumores. Estes recetores podem ser usados seletivamente como alvos terapêuticos utilizando como ligandos ácido fólico, metotrexato e seus derivados. Foi demonstrada a entrega de metotrexato por NPO combinadas com metotrexato e ácido fólico em células KB positivas ao recetor de folato (62). Foram relatados trabalhos em que foi realizada conjugação simultânea de ácido fólico e doxorubicina (DOX) ou

metotrexato (MTX) e cisplatina (CP) (63, 64). As NPO ligadas à DOX demonstraram um comportamento de libertação rápida em pH ácido (pH-5-6). Esse efeito é particularmente vantajoso para a libertação de fármaco desencadeada pelo pH para o ambiente ligeiramente ácido dos tecidos tumorais (64).

A adição de PEG às NPO aumenta a 'vetorização passiva', uma vez que esta molécula reduz a interação com as células e prolonga o tempo de circulação das nanopartículas. Esta conjugação é uma estratégia muito aplicada que reduz a eliminação de nanopartículas pelo sistema reticuloendotelial. Foram sintetizadas NPO conjugadas com PEG e ligadas à beta-ciclodextrina (β -CD), que foram posteriormente conjugadas com paclitaxel (PTX) ou rodamina B, sendo que esta é usada para o diagnóstico e tratamento do cancro em simultâneo. Este tipo de NPO libertaram o PTX de maneira controlada dependendo do nível de glutathione intracelular (56). Além da conjugação com ligandos que aumentam a seletividade, a superfície das NPO pode ser funcionalizada com ligandos que alteram a carga à superfície. Num estudo foram desenvolvidas NPO (~ 2nm) que foram covalentemente conjugadas com PTX. A análise termográfica desta conjugação mostrou que o conteúdo do fármaco anexado covalentemente era de quase 67%, correspondendo à internalização de PTX de 70:1 para NPO (65).

Kim et al. investigaram a influência da carga superficial na localização das NPO demonstrando que a taxa de absorção celular das nanopartículas positivas e negativas foi rápida em tecidos apoptóticos e necróticos. Curiosamente, a cinética de absorção das nanopartículas positivas foi irreversível, enquanto que é reversível para as nanopartículas negativas. Esta descoberta sugeriu que as nanopartículas carregadas positivamente podem servir como um transportador terapêutico efetivo, pois são significativamente mais acumuladas nas células em proliferação. Num estudo semelhante, foi analisada a libertação de DOX das NPO dependente da glutathione intracelular, tendo sido demonstrada a importância de uma superfície carregada positivamente das nanopartículas na promoção do aumento da permeabilidade e da acumulação de fármacos na célula (66).

A irradiação de nanopartículas com NIR gera calor, o que pode ser utilizado para a libertação de fármaco desencadeada a partir de formulações sensíveis ao calor. O calor gerado pode aumentar o efeito anticancerígeno de fármacos que visam alvos cancerígenos (56). As NPO podem também induzir hipertermia quando estimuladas com

a iluminação laser NIR no tecido tumoral, com pouco dano aos tecidos normais (58). Essas teorias foram adotadas no desenvolvimento de NPO revestidas com uma superfície sensível ao calor, de hidrogel de poli (N-isopropilacrilamida) (servem como reservatório de fármacos) (56).

6.2. Funcionalização da superfície

Dada a sua área superficial relativamente grande e o efeito EPR, a funcionalização das NPO com uma variedade de ligandos pode aumentar a libertação ou controlar a libertação dos agentes terapêuticos para o tumor. Quando as NPO são absorvidas pelas células tumorais e localizada dentro dos endossomas, o pH mais baixo dentro destes endossomas permite a libertação do fármaco (58). Seguidamente serão descritos os vários ligandos que podem ser utilizados para funcionalizar a superfície das NPO e a sua conjugação com fármacos anticancerígenos.

6.2.1. Tiol

Os ligandos tiol têm sido usados para anexar uma ampla gama de ligandos às nanopartículas, incluindo polímeros como o PEG, corantes e fármacos como o PTX. Os péptidos também podem ser conjugados diretamente à superfície da nanopartícula usando um grupo tiol numa unidade de cisteína ou por meio do N-terminal de uma amina primária (57).

As NPO funcionalizadas através de tióis têm sido bastante investigadas para uma variedade de aplicações terapêuticas, incluindo entrega de medicamentos e imagem médica. A reação de permuta do ligando é normalmente conduzida à temperatura ambiente num solvente, como o tolueno, durante um período de vários dias. No entanto, existem inconvenientes para este método, incluindo uma maior probabilidade de agregação irreversível das nanopartículas, dificuldade em determinar a quantidade exata de ligando trocado e potencial para a substituição incompleta do ligando. Uma abordagem eficaz para a substituição do ligando é substituir um ligando ligado fracamente à nanopartícula através de uma ligação de citrato ou fosfina com um ligando terminado em tiol. A reação na superfície da nanopartícula de ouro, entre um grupo tiol e a nanopartícula, resulta na substituição do hidrogénio por ouro no grupo tiol (57).

As nanopartículas também podem ser funcionalizadas electrostaticamente, por exemplo, um ligando carregado positivamente seria atraído para o revestimento de citrato carregado negativamente dependendo, assim, de efeitos eletrostáticos. No entanto, esta abordagem tem vários inconvenientes, como ser apenas adequada para o uso de ligandos adequadamente carregados, os ligandos não estão ligados numa orientação particular tornando a resposta biológica difícil de controlar e a ligação é afetada pelas mudanças no pH (57).

Nanorods de ouro foram encapsulados em nanopartículas de albumina e funcionalizadas com tiol, associando PTX à superfície das nanopartículas de albumina, sendo que esta abordagem combinada permite a eliminação de células cancerígenas tanto por hipertermia, como por tratamento de quimioterapia localizada. As células com resistência ao calor serão mortas pelo PTX, e as células que são resistentes ao PTX serão mortas por hipertermia, diminuindo drasticamente a probabilidade de sobrevivência celular. A abordagem fototérmica não só resulta em tratamento hipertérmico, mas também serve para ativar a libertação do fármaco, quando as partículas atingirem o seu tecido alvo. Esta estratégia de encapsulação originou um sistema híbrido coloidal de tratamento capaz de aumentar a permeabilidade e efeitos de retenção, eliminação fototérmica seletiva de células cancerígenas e a libertação de PTX ativo em apenas 15 minutos de sessão de irradiação. Quando tratadas com a conjugação de PTX com *nanorods* de ouro e nanopartículas de albumina, as células de cancro da mama registaram aproximadamente 82% de morte celular sem irradiação e aproximadamente 94% de morte celular após apenas uma sessão de irradiação. A Figura 6.3. ilustra os efeitos citotóxicos de *nanorods* de ouro sozinhos e nas combinações com nanopartículas de albumina e nanopartículas de albumina com PTX, em células de cancro da mama, num tratamento com e sem radiação. Estes resultados foram melhores em comparação com os resultados do PTX sozinho, que apenas eliminou aproximadamente 77% das células sem irradiação e aproximadamente 80% com irradiação. O aprisionamento interno de combinações de fármacos adaptados ao doente é também possível com esta forma de tratamento combinado, o que pode resultar em melhoria da qualidade de vida para as pessoas submetidas a tratamentos (67).

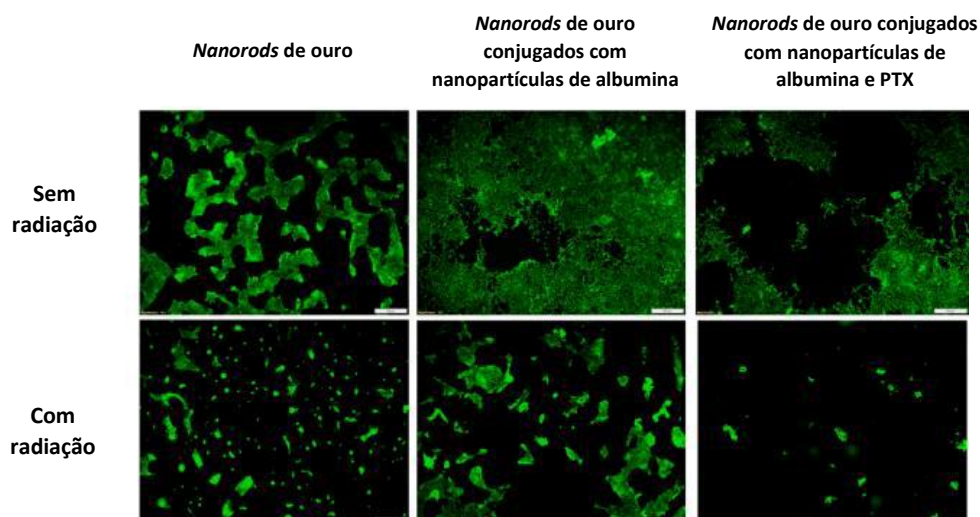


Figura 6.3. Imagens de microscopia de fluorescência dos efeitos citotóxicos em células de cancro da mama de *nanorods* de ouro sozinhos e nas combinações com nanopartículas de albumina e nanopartículas de albumina com PTX, num tratamento com e sem radiação [Adaptado de (67)].

6.2.2. PEG

Para criar um tratamento ou diagnóstico adequados para o uso clínico com NPO, é necessário produzir a nanopartícula com uma série de ligandos para funções específicas. Estes estão tipicamente ligados à superfície das nanopartículas sob a forma de uma monocamada mista, sendo que as monocamadas mistas de PEG com terminação em álcool se têm destacado nas aplicações *in vivo*, sem toxicidade, sem resposta imune e alta solubilidade e estabilidade na água. Tais revestimentos mistos da monocamada podem ser facilmente preparados a partir de NPO produzidas por redução de citrato através da reação da nanopartícula com uma quantidade apropriada de PEG tiolado para produzir uma camada incompleta seguida pela reação da nanopartícula parcialmente revestida com outro ligando terminal conforme o interesse. Uma abordagem alternativa é anexar os ligandos necessários à nanopartícula por meio de uma molécula vinculadora. Nesta disposição, a superfície da NPO é totalmente funcionalizada com uma cadeia de polímero, tal como PEG ou um hidrocarboneto de cadeia curta. O ligando de interesse é então ligado à outra extremidade da cadeia de ligação. Isso pode ser referido como funcionalização sequencial, uma vez que um ligando é anexado ao final de outro. A cadeia de ligação proporciona a estabilidade requerida enquanto o ligando funcional ligado à extremidade livre está prontamente disponível para a interação biológica (57).

Por exemplo, as NPO foram funcionalizadas com tamoxifeno e PEG com tiol e foram seletivamente encontradas em células de cancro da mama humano, demonstrando uma potência muito maior do que o fármaco livre (68).

Teoricamente a conjugação de NPO com trastuzumab tem principalmente duas vantagens para o tratamento do cancro da mama, sendo a primeira a de aumentar a absorção de NPO e a segunda a de superar a resistência ao trastuzumab. Estudos indicam que NPO revestidas com PEG e conjugadas com trastuzumab são toleradas pelas células, não agregam quando expostas ao microambiente sanguíneo *in vitro* e preservam as suas propriedades de ligação seletiva no sangue. A aplicação de radiação em células de cancro da mama que sobre expressam HER-2 levou a quebras 5 vezes superiores de DNA de dupla cadeia de na conjugação de trastuzumab com PEG em NPO do que PEG com NPO (69, 70).

Os conjugados de trastuzumab com *nanorods* de ouro demonstraram ser absorvidos em endossomas de células tumorais e lipossomas em vez de se ligarem à membrana celular. A adição de PEG aos conjugados de trastuzumab com nanorods pode preservar a sua afinidade de ligação durante o seu tempo de latência no sangue. Embora o trastuzumab tenha demonstrado ser eficaz contra o cancro da mama com sobre expressão de HER-2, 15% dos pacientes que receberam trastuzumab como terapia adjuvante e 66-88% dos pacientes que receberam trastuzumab para a doença metastática, eventualmente desenvolveram resistência ao agente (58).

NPO revestidas com PEG e conjugadas com DOX demonstraram ser um sistema biocompatível projetado para direcionar seletiva e efetivamente a entrega de DOX a células cancerígenas e facilitar a terapia fototérmica adjuvante (71, 72). Foi descoberto que, em comparação com DOX livre ou lipossômica, nanoescudos de ouro oco conjugadas com DOX estimuladas com um laser NIR eram mais citotóxicas para células do cancro da mama *in vitro* e melhoravam a erradicação de tumores *in vivo*. Além disso, os conjugados de ouro estimulados não só eram mais eficazes em tumores de ablação, mas também menos cardiotóxicos do que a DOX lipossomal, presumivelmente porque a forma conjugada estava associada a DOX menos livre no sangue (73).

6.2.3. Folato

NPO foram funcionalizadas MTX, anticorpo de TGF- β 1 (fator de crescimento) e o folato como ligando de funcionalização, tendo sido direcionadas para células de cancro da mama. Foi detetada elevada concentração intracelular de MTX e folato e menor concentração de TGF- β 1 extracelular (74).

Noutro estudo foram funcionalizadas NPO com folato e conjugadas com ciclofosfamida (CF) de modo a ter como alvo o recetor folato humano alfa (α HFR), para aplicação em hipertermia de modo a potenciar a citotoxicidade da CF em células de cancro da mama positivas para α HFR. Estas nanopartículas foram estudadas em duas linhas celulares de cancro da mama, uma contendo α HFR na sua superfície e outra não contendo níveis detetáveis de α HFR, e de seguida foi realizada a hipertermia. As NPO funcionalizadas com folato, que se acumularam na linha celular com α HFR positivo através de endocitose mediada pelo recetor folato, resultaram na permeabilidade da membrana celular, causada pela hipertermia, para a CF devido ao dano da membrana celular após a fotoexcitação das NPO. Pelo contrário, não ocorreu nenhuma acumulação de nanopartículas funcionalizadas com folato na linha celular que não expressa níveis detetáveis de α HFRs. As NPO orientadas pra α HFR após terapia fototérmica foram capazes de sensibilizar as células de cancro da mama positivas para α HFR no tratamento com CF, tornando esta uma abordagem promissora para o tratamento de cancros positivos para recetores folato (75).

6.2.4. Transferrina

O recetor de TF participa na proliferação celular e foi detetada a sobre expressão deste recetor nos tumores mamários. Assim, a absorção tumoral de NPO seria aumentada conjugando-os com TF. As células de cancro da mama também possuem uma alta expressão de recetores da hormona libertadora da hormona luteinizante (LHRH). Foram revestidas NPO com Fe₃O₄ e conjugadas com um análogo de LHRH, tendo sido descoberto que esta conjugação não afetou a afinidade de ligação ou a atividade biológica do recetor de LHRH. Além disso, estes conjugados tiveram efeitos dependentes da dose significativos na sobrevivência e proliferação de células de cancro da mama expressando o recetor LHRH (58).

6.2.5. Conjugação de componentes

O tratamento do cancro da mama com tamoxifeno (TMX) tem sido usado há mais de três décadas. Esta pequena molécula compete com a hormona estradiol para a ligação ao recetor de estrogénio, um recetor regulado positivamente na maioria dos cancros da mama, iniciando subseqüentemente a morte celular programada. Foi sintetizado um derivado de TMX com tiol-PEG que pode ser usado para direccionar seletivamente e entregar NPO em células de cancro da mama positivas para recetores de estrogénio, com elevada potência *in vitro*. Num estudo células de cancro da mama foram incubadas com concentrações equivalentes de TMX-PEG-tiol na forma de fármaco livre e conjugado de nanopartículas, sendo que as figuras a) e b), da Figura 6.4., ilustram as curvas dose-resposta dependentes do tempo para a viabilidade celular, respetivamente. A comparação dos valores de IC_{50} (50% de concentração inibitória) dependentes do tempo obtidos para o fármaco livre e o seu conjugado de NPO indicam a potência aumentada 1,3 - 2,7 vezes (Figura c)) para o conjugado das nanopartículas com TMX-PEG-tiol. Esta atividade aumentada deve-se ao aumento das taxas de transporte de TMX intracelular por endocitose de nanopartículas. A entrega intracelular de NPO dependente de ligandos e recetores sugerem que o recetor alfa de estrogénio localizado na membrana plasmática pode facilitar a absorção seletiva e retenção deste e outros conjugados de nanopartículas terapêuticas. A seletividade da vetorização combinada e a potência avançada proporcionam oportunidades tanto para estratégias de tratamento endócrino multimodal quanto para terapia fototérmica laser complementar (68).

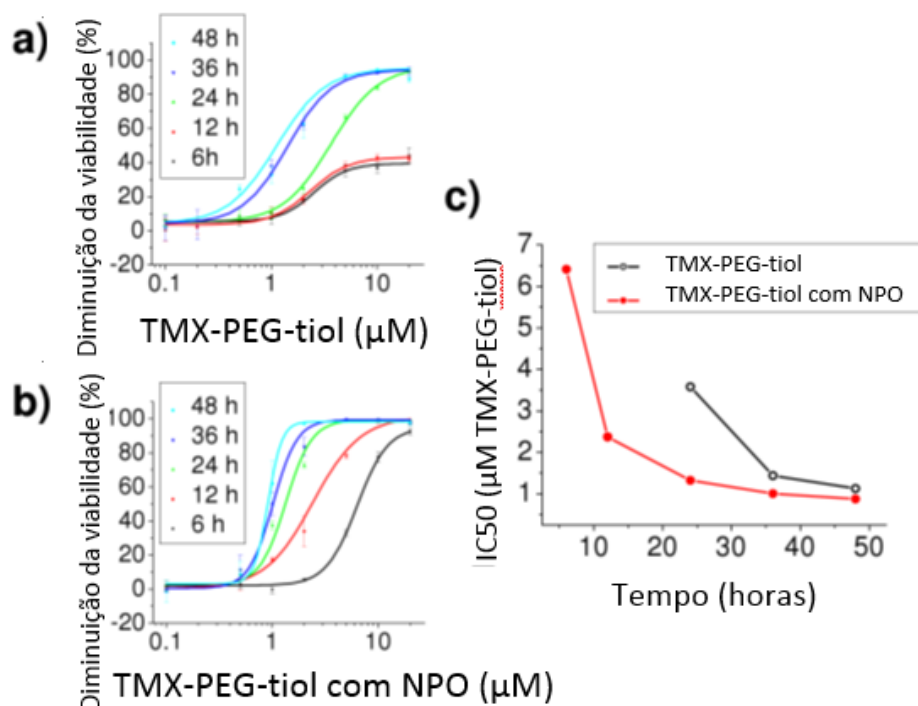


Figura 6.4. Curvas dose-resposta dependentes do tempo para a viabilidade celular de células de cancro da mama incubadas com concentrações equivalentes de TMX-PEG-tiol como fármaco livre (a) e como conjugado de NPO (b); e comparação dos valores de IC₅₀ das duas estratégias (c) [Adaptado de (68)].

A conjugação de NPO com MTX e albumina demonstrou maior eficiência na inibição da proliferação de células de cancro da mama quando comparada com o fármaco livre MTX tendo sido também confirmada a indução da apoptose. A conjugação foi encontrada em maior concentração nas células cancerígenas em comparação com uma dose equivalente de MTX livre. O aumento de atividade foi atribuído à absorção preferencial do complexo pelas células cancerígenas devido à presença da albumina que atua como fonte de nutrientes e energia para as células cancerígenas, que proliferam rapidamente. Além disso, a seletividade do fármaco MTX para os recetores de folato, sobre expressos em células de cancro da mama, também contribuiu para a absorção e atividade aumentadas. Em conjunto, esses resultados revelam que a conjugação de NPO com MTX e albumina poderia ser mais eficaz do que o fármaco livre no tratamento do cancro (76).

A conjugação entre um fotossensibilizador (derivado de zinco-ftalocianina), um PEG heterobifuncional e um anticorpo monoclonal contra HER2 numa superfície de NPO

foi descrita como um potencial terapêutico do cancro da mama. Os conjugados de nanopartículas eram estáveis em relação à agregação e, sob irradiação com luz vermelha visível, produziram eficientemente oxigénio tóxico para as células. Em experiências celulares foi demonstrado que os conjugados de nanopartículas visam seletivamente as células de cancro da mama que sobre expressam o HER2 e que são agentes eficazes de terapia fotodinâmica (77).

Noutro estudo foram produzidas NPO direcionadas para o recetor ativador de plasminogénio do tipo uroquinase (uPAR) para vetorização de células de cancro da mama. As nanopartículas foram funcionalizadas com um péptido curto de 11 aminoácidos (U11) derivado do domínio do fator de crescimento de uPA, que é responsável pela ligação ao uPAR. A funcionalização levou a nanoconjugados muito estáveis e não tóxicos, o que promoveu a seletividade do recetor para melhorar a ligação celular e a absorção em células cancerígenas positivas para uPAR *in vitro* (78).

As NPO revestidas com Fe₃O₄ e conjugadas com um complexo de trastuzumab e platina apresentaram seletividade na distribuição de platina em células positivas para HER2. O facto de a CP ser libertada a níveis de pH mais baixos levou a investigações sobre a libertação intracelular de CP (e, portanto, a sua citotoxicidade) ser estimulada pelo pH mais baixo dos endossomas após a absorção dos conjugados. Os níveis de pH mais baixos em endossomas celulares também podem facilitar a libertação de fármacos de NPO conjugadas com cloroquina, que também possuem atividade antitumoral no cancro da mama e levam a uma citotoxicidade aumentada em células cancerígenas (79).

6.3. Toxicidade das nanopartículas de ouro

A absorção celular e localização das NPO nas células cancerígenas varia em função do tipo de partícula, tamanho e/ou molécula de funcionalização. Num estudo em células de cancro da mama, *nanorods* de ouro foram absorvidos por recetores mediados por endocitose e foram formadas vesículas endocíticas que evoluíram para lisossomas e autofagossomas. Foi observada a recaptção das partículas eliminadas após exocitose (80).

As NPO usadas para abordagens de diagnóstico (imagem) e tratamento tendem a ter diâmetros de pelo menos 5 nm e, tal como o ouro de maiores dimensões, essas partículas de ouro maiores são geralmente consideradas quimicamente inertes. Foi

descoberto que moléculas de 4 ou 10 nm de diâmetro, que foram mais facilmente absorvidas do que moléculas com 28 ou 58 nm de diâmetro, ficaram acumuladas no fígado, nos rins, no baço e em outros órgãos, incluindo o cérebro. Vários fatores, como a carga superficial e o tamanho, estão associados à eliminação dessas moléculas do organismo. Uma carga superficial positiva na nanopartícula estimula a ligação das moléculas às proteínas plasmáticas, resultando no impedimento da excreção renal devido ao diâmetro hidrodinâmico maior. As partículas com diâmetros hidrodinâmicos inferiores a 5-6 nm mostram uma eliminação renal aumentada. Revestir as partículas com materiais menores do que PEG, para neutralizar a carga superficial, pode ser uma solução para aumentar a eliminação renal de nanopartículas. Embora numerosos estudos tenham investigado a toxicidade das NPO em animais, a toxicidade das NPO em seres humanos ainda não foi avaliada de forma adequada (58). Um estudo de fase I para a investigação da dose investigou o uso de nanopartículas de ouro conjugadas com um fator de necrose tumoral recombinante do vírus humano (rhTNF). Para este estudo foram utilizados doentes com tumores sólidos que não respondem ao tratamento convencional e foram coletadas amostras de tecido. Vinte e quatro horas após a administração, as NPO foram encontradas em tecido tumoral. As NPO não foram encontradas em parênquima normal em pacientes com cancro da mama, mas foram encontradas em tecido normal do fígado em doentes com tumores hepáticos (81).

As NPO não conseguem ser efetivamente absorvidas pela via oral. Em contraste, 90% das nanopartículas administradas por via intravenosa permanecem na circulação durante pelo menos 1 semana, e mais de 70% das partículas eventualmente acumulam-se no fígado. Do ponto de vista da toxicidade, a permanência destas partículas no organismo é particularmente pertinente porque a sua grande relação área-massa superficial pode torná-los mais ativos biologicamente (58). No entanto, num estudo de tratamentos repetidos com NPO, as proporções das quantidades acumuladas diminuíram à medida que a dose aumentava, sugerindo a ativação de um mecanismo de eliminação (82).

6.4. Perspetivas Futuras

O tratamento fototérmico pode ser um método de tratamento de cancro minimamente invasivo e altamente eficiente que usa fotossensibilizadores adequados que podem absorver eficientemente fotões incidentes para gerar calor local suficiente para eliminar por hipertermia as células cancerígenas. As NPO representam uma nova classe de fotossensibilizadores que são capazes de uma conversão eficiente de calor. A facilidade da funcionalização da superfície permite o desenvolvimento de nanoestruturas de ouro únicas com elevada eficácia fototérmica e elevada seletividade. Estas características garantem maior eficiência na penetração em tecidos profundos diminuindo as preocupações quanto aos efeitos adversos tipicamente causados pelas distribuições não específicas em tecidos normais. Assim, as NPO podem ter multifunções, além do tratamento fototérmico tais como a entrega de fármacos anticancerígenos para terapia combinada e agentes de contraste para diagnóstico em simultâneo com o tratamento. Este sistema multifuncional, que integra múltiplas terapêuticas/diagnósticos numa única formulação, tem imenso potencial para possíveis aplicações numa ampla gama de doenças (83).

Foi iniciado em 2005 o primeiro tratamento de cancro mediado por NPO. O CYT-6091 foi a primeira NPO a realizar ensaios clínicos em fase inicial e consiste numa NPO de 27 nm conjugadas com PEG e TNF- α tiolados (81). O controlo complexo sobre a biodistribuição e eliminação das nanopartículas e a resolução de problemas de toxicidade a longo prazo são pré-requisitos para a aplicação prática destes sistemas. A utilidade *in vivo* de nanopartículas depende de diversas propriedades físico-químicas, tais como tamanho, carga superficial, estabilidade *in vivo* e interações químicas específicas com biomoléculas. Devido à complexidade inerente a esta aplicação, o controlo total sobre a biodistribuição das nanopartículas é uma tarefa difícil. Além disso, as nanopartículas podem distribuir-se amplamente em muitos tecidos normais através da penetração de barreiras de órgãos dependentes do tamanho e podem ser facilmente retidas nos órgãos do sistema endotelial após administração sistémica. Este facto levanta preocupações significativas quanto à toxicidade das NPO para estes tecidos fora do alvo. Embora o ouro seja geralmente considerado biocompatível e não tóxico, as propriedades únicas das NPO (por exemplo, a sua alta relação superfície-volume e grande quantidade de ligações possíveis à superfície) podem aumentar

significativamente sua atividade química / biológica, podendo causar efeitos tóxicos, como a produção de espécies reativas de oxigénio. As moléculas de superfície das nanopartículas introduzidas para a estabilidade coloidal ou a funcionalização química também representam possíveis problemas de toxicidade. A toxicidade a longo prazo das NPO devido à acumulação inespecífica em órgãos não direcionados é relativamente pouco compreendida e são necessárias avaliações abrangentes adicionais devido às propriedades físico-químicas das NPO (58, 83).

Algumas nanoestruturas de ouro podem efetivamente absorver a luz NIR, mas podem sofrer remodelação fototérmica, o que pode impedir o seu efeito fototérmico contínuo. Tal pode acontecer quando são maiores do que aproximadamente 50 nm, que está acima do limite de tamanho (~ 5 nm) para a eliminação renal eficiente. As nanopartículas funcionalizadas podem ter um tamanho relativamente pequeno (menor de 6 nm), o que é favorável à excreção renal eficiente e pode efetivamente utilizar a luz NIR após agregação em resposta ao pH. Um fotossensibilizador de NPO ideal para aplicações clínicas deve ter alta eficácia fototérmica na região NIR, a fim de obter a eliminação completa dos tecidos tumorais. Para aliviar possíveis preocupações de toxicidade, as NPO devem ter acumulação seletiva nos tecidos alvo com distribuição mínima em tecidos não específicos. Devem também ser rapidamente eliminados do corpo após o seu objetivo, de modo a evitar a redistribuição em tecidos não específicos. De modo a atingir estes requisitos está a ser realizado o desenvolvimento sofisticado das NPO (58, 83).

7. CONCLUSÃO

O cancro da mama é uma neoplasia bastante complicada que afeta maioritariamente mulheres. Nos tratamentos convencionais, como a quimioterapia e a radioterapia, os efeitos adversos causam consequências indesejadas no tratamento do cancro. Deste modo, é essencial que sejam desenvolvidas novas estratégias para o tratamento desta doença.

As nanopartículas de ouro têm muitas propriedades que demonstram bastante potencial no tratamento do cancro da mama. Estas podem ser facilmente sintetizadas por métodos químicos e biológicos sem necessidade de grande sofisticação. As nanopartículas de ouro podem penetrar e acumular no tecido tumoral passivamente através do efeito EPR ou ativamente através da conjugação com moléculas seletivas. As nanopartículas de ouro têm um elevado número atómico, o que permite uma maior absorção de energia ressonante, proporcionando maior contraste do que os agentes padrão, melhorando o efeito da radioterapia. Além disso, as nanopartículas de ouro podem ser funcionalizadas com polímeros, anticorpos e fármacos seletivos para recetores da superfície de células cancerígenas. Podem, ainda, ser efetivamente utilizadas no tratamento fototérmico devido à absorção de luz quando expostos a um laser NIR produzindo calor, permitindo uma libertação controlada do fármaco.

Devido a estas propriedades, existe muita expectativa e interesse entre os investigadores de todo o mundo em relação às nanopartículas de ouro. No entanto, existem questões relacionadas com a avaliação da toxicidade e com a produção em grande escala para uso clínico que requerem muita atenção e otimização.

8. REFERÊNCIAS

1. **Internacional Agency for Research on Cancer.** Globocan 2012: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. [Online] World Health Organization, 2017. [Cited: Janeiro 24, 2017.] http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
2. **World Health Organization.** Cancer. [Online] Fevereiro 2017. [Cited: Fevereiro 24, 2017.] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
3. **American Cancer Society.** Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition. [Online] 2015. [Cited: Fevereiro 24, 2017.] <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/global-cancer-facts-and-figures/global-cancer-facts-and-figures-3rd-edition.pdf>.
4. **National Cancer Institute.** What Is Cancer? [Online] Fevereiro 9, 2015. [Cited: Janeiro 24, 2017.] <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.
5. **Mello, R., Tavares, A. and Mountzios, G.** *International Manual of Oncology Practice*. Suíça : Springer, 2015.
6. **American Cancer Society.** Breast Cancer Facts & Figures 2015-2016. [Online] 2015. [Cited: Fevereiro 25, 2017.] <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/breast-cancer-facts-and-figures/breast-cancer-facts-and-figures-2015-2016.pdf>.
7. **Macedo, A., et al.** Custo-Efectividade de Trastuzumab no tratamento de doente com cancro da mama em estádios iniciais em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*. 23, 2010, pp. 475-482.
8. **Polyak, K.** Breast cancer: origins and evolution. *The Journal of Clinical Investigation*. 11, 2007, Vol. 117, pp. 3155–3163.
9. **United States National Nanotechnology Initiative.** What it is and how it works. *Nano.gov*. [Online] 2017. [Cited: Fevereiro 25, 2017.] <http://www.nano.gov/nanotech-101/what>.
10. **Jain, K.** *The Handbook of Nanomedicine* . Suíça : Humana Press, 2008.
11. **Yezhelyev, M., et al.** Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *The Lancet Oncology*. Agosto 2006, Vol. 7, pp. 657–67.
12. **Jain, S., Hirst, D. and O'Sullivan, J.** Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *The British Journal of Radiology*. 85, 2012, pp. 101–113.
13. **Seeley, R, T, Stephens and P, Tate.** *Anatomia & Fisiologia*. s.l. : Lusociência, 2007.
14. **American Cancer Society.** What is breast cancer? *American Cancer Society*. [Online] Agosto 2016. [Cited: Março 3, 2017.] <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html>.
15. **National Cancer Institute.** Metastatic Cancer. *National Cancer Institute*. [Online] Fevereiro 2017. [Cited: Março 3, 2017.] <https://www.cancer.gov/types/metastatic-cancer>.
16. **National Comprehensive Cancer Network.** Linhas de orientação NCCN para doentes. *Cancro da mama*. 2011.
17. **Hon, J, et al.** Breast cancer molecular subtypes: from TNBC to QNBC. *American Journal of Cancer Research*. 6(9):1864-1872, 2016.

18. **Kamińska, M, et al.** Breast cancer risk factors. *Prz Menopauzalny*. 14(3): 196-202, 2015.
19. **Barnard, M, Boeke, C and Tamimi, R.** Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2015.
20. **Yang, X, et al.** Associations of Breast Cancer Risk Factors With Tumor subtypes: a pooled analysis from the breast cancer association consortium studies. *Journal of the Nacional Cancer Institute*. 3, 2011, Vol. 103.
21. **American Cancer Society** . Cancer Statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 1, Janeiro/ Fevereiro de 2016, Vol. 66.
22. **Direção-Geral de Saúde.** Doenças Oncológicas em números - 2015. *Prorama Nacional para as Doenças Oncológicas*.
23. **Gervásio, H, et al.** Recomendações Nacionais para Diagnóstico e Tratamento do Cancro da Mama 09. 2009.
24. **Senkus, E, et al.** Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. Clinical practice guidelines, 2013, Vol. 24.
25. **Direção-Geral de Saúde.** Abordagem Imagiológica da Mama Feminina. *Norma da Direção-Geral da Saúde*. 2011.
26. **CDC: Centers for Disease Control and Prevention.** How Is Breast Cancer Diagnosed? *CDC: Centers for Disease Control and Prevention*. [Online] 2016. [Cited: Março 15, 2017.] https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/diagnosis.htm.
27. **American Cancer Society.** Stages of Breast Cancer. *American Cancer Society*. [Online] Agosto 2016. [Cited: Abril 3, 2017.] <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/stages-of-breast-cancer.html>.
28. **Cancer Research UK.** Symptoms. *Cancer Research UK*. [Online] Julho 2014. [Cited: Março 15, 2017.] <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/breast-cancer/symptoms>.
29. **CDC: Centers for Disease Control and Prevention.** What Are the Symptoms of Breast Cancer? *CDC: Centers for Disease Control and Prevention*. [Online] Abril 2016. [Cited: Março 15, 2017.] https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/symptoms.htm.
30. **Peart, O.** Breast Intervention and Breast Cancer Treatment Options. *Radiologic Technology*. 4, May/June 2015, Vol. 86.
31. **Rapoport, B, et al.** When and how do I use neoadjuvant chemotherapy for breast cancer? *Current Treatment Options in Oncology*. 2013.
32. **Laço.** Quimioterapia. *Fundo IMM- Laço*. [Online] 2017. [Cited: Abril 10, 2017.] <http://laco.pt/cancro-mama/tratamento/quimioterapia>.
33. **Ahmed, S, Sami, A and Xiang, J.** HER2-directed therapy: current treatment options for HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer* . 2015.
34. **Arteaga, C, et al.** Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Clinical Oncology*. Janeiro 2012, Vol. 9.
35. **United States National Nanotechnology Initiative.** What is Nanotechnology? *Nano.gov*. [Online] 2017. [Cited: Maio 15, 2017.] <https://www.nano.gov/nanotech-101/what/definition>.

36. **United States National Nanotechnology Initiative.** Working at the Nanoscale. *Nano.gov*. [Online] 2017. [Cited: Maio 15, 2017.] <https://www.nano.gov/nanotech-101/what/working-nanoscale>.
37. **Yohan, D. and Chithrani, B.** Applications of Nanoparticles in Nanomedicine. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2014, Vols. 10, 2371–2392.
38. **Issa, B., et al.** Magnetic nanoparticles: surface effects and properties related to biomedicine applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013, Vols. 14, 21266-21305.
39. **Wicki, A., et al.** Nanomedicine in Cancer Therapy: Challenges, Opportunities and Clinical Applications. *Journal of Controlled Release*. 2014.
40. **Amendola, V., et al.** Physico-Chemical Characteristics of Gold Nanoparticles. *Gold Nanoparticles in Analytical Chemistry*. 2014, Vol 66.
41. **Lee, J., et al.** Magnetic nanoparticles for multi-imaging and drug delivery . *Molecules and Cells*. 2013, Vols. 35, 274-284.
42. **Reddy, L., et al.** Magnetic nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Chemical Reviews*. 2012, Vols. 112, 5818–5878.
43. **Akbarzadeh, A., Samiei, M. and Davaran, S.** Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine . *Nanoscale Research Letters*. 2012, Vol. 7:144.
44. **Colombo, M., et al.** Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chemical Society Reviews*. 2012, Vols. 41, 4306–4334.
45. **Faraday, M.** Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Royal Society*. 1857, Vols. 147, 145-181.
46. **Turkevich, J., Stevenson, P. and Hillier, J.** A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold . *Discussions of the Faraday Society*. 1951, Vol. 11.
47. **Grabar, K., et al.** Preparation and Characterization of Au Colloid Monolayers . *Analytical Chemistry*. 1995, Vols. 67, 735-743.
48. **Jain, S., Hirst, D. and O’Sullivan, M.** Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy . *The British Journal of Radiology*. 2012, Vols. 85, 101–113.
49. **Ajnai, G., et al.** Trends of Gold Nanoparticle-based Drug Delivery System in Cancer Therapy. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 2014, Vols. 6(6): 172-178.
50. **Zhang, X.** Gold Nanoparticles: Recent Advances in the Biomedical Applications. *Cell Biochemistry and Biophysics* . 2015, Vols. 72(3): 771-5.
51. **Khan, A., et al.** Gold Nanoparticles: Synthesis and Applications in Drug Delivery. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2014, Vols. 13 (7): 1169-1177.
52. **Mieszawska, A., et al.** Multifunctional Gold Nanoparticles for Diagnosis and Therapy of Disease. *Molecular Pharmaceutics*. 2013, Vols. 10(3):831-47.
53. **Llevot, A. and Astruc, D.** Applications of vectorized gold nanoparticles to the diagnosis and therapy of cancer. *Chemical Society Reviews*. 2012, Vols. 41, 242–257.

54. **Faheem, S. and Banu, H.** Gold Nanoparticles in Cancer Diagnosis and Treatment: A Review. *Austin Journal of Biotechnology & Bioengineering*. 2014, Vol. 1(6): 5.
55. **Meir, R., Motiei, M. and Popovtzer, R.** Gold nanoparticles for in vivo cell tracking. *Nanomedicine*. 2014, Vols. 9(13), 2059–2069.
56. **Akhter, S., et al.** Gold nanoparticles in theranostic oncology: current state-of-the-art. *Expert Opin Drug Delivery*. 2012, Vols. 9(10):1225-1243.
57. **Nicol, J., Dixon, D. and Coulter, J.** Gold nanoparticle surface functionalization: a necessary requirement in the development of novel nanotherapeutics. *Nanomedicine*. 2015, Vols. 10(8), 1315–1326.
58. **Lee, J., et al.** Gold nanoparticles in breast cancer treatment promise and potential pitfalls. *Cancer Letters*. 2014, Vols. 28; 347(1): 46–53.
59. **Gobbo, O., et al.** Magnetic Nanoparticles in Cancer Theranostics. *Theranostics*. 2015, Vols. 5(11): 1249-1263.
60. **Choi, C., et al.** Mechanism of active targeting in solid tumors with transferrin-containing gold nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010, Vols. 107(3): 1235–1240.
61. **Rana, S., et al.** Monolayer coated gold nanoparticles for delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012, Vols. 64(2):200-16.
62. **Dixit, V., et al.** Synthesis and grafting of thioctic acid-PEG-folate conjugates onto Au nanoparticles for selective targeting of folate receptor-positive tumour cells. *Bioconjugate Chemistry*. 2006, Vols. 17, 603–609.
63. **Prabaharan, M., et al.** Gold nanoparticles with a monolayer of doxorubicin-conjugated amphiphilic block copolymer for tumour-targeted drug delivery. *Biomaterials*. 2009, Vols. 30, 6065–6075.
64. **Patra, C., Bhattacharya, R. and Mukherjee, P.** Fabrication and functional characterization of gold nanoconjugates for potential application in ovarian cancer. *Journal of Materials Chemistry*. 2010, Vols. 20(3): 547–554.
65. **Gibson, J., Khanal, B. and Zubarev, E.** Paclitaxel-Functionalized Gold Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*. 2007, Vols. 129, 11653-11661.
66. **Kim, B., et al.** Tuning payload delivery in tumour cylindroids using gold nanoparticles. *Nature Nanotechnology*. 2010, Vols. 5(6): 465–472.
67. **D., Peralta, et al.** Hybrid paclitaxel and gold nanorod-loaded human serum albumin nanoparticles for simultaneous chemotherapeutic and photothermal therapy on 4T1 breast cancer cells. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2015, Vols. 7(13): 7101-11.
68. **E., Dreaden, et al.** Tamoxifen-poly(ethylene glycol)-thiol gold nanoparticle conjugates: enhanced potency and selective delivery for breast cancer treatment. *Bioconjugate Chemistry*. 2009, Vols. 20(12):2247-53.
69. **Chattopadhyay, N., et al.** Design and characterization of HER-2-targeted gold nanoparticles for enhanced X-radiation treatment of locally advanced breast cancer. *Molecular Pharmaceutics*. 2010, Vols. 7(6): 2194-206.

70. **Eghtedari, M., et al.** Engineering of hetero-functional gold nanorods for the in-vivo molecular targeting of breast cancer cells. *Nano Letters* . 2009, Vols. 9(1):287-91.
71. **Banu, H., et al.** Doxorubicin loaded polymeric gold nanoparticles targeted to human folate receptor upon laser photothermal therapy potentiates chemotherapy in breast cancer cell lines . *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. 2015, Vols. 149:116-28.
72. **Wang, F., et al.** Doxorubicin-Tethered Responsive Gold Nanoparticles Facilitate Intracellular Drug Delivery for Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Cells. *ACS Nano*. 2011, Vols. 5(5): 3679-92.
73. **You, J., et al.** Photothermal-chemotherapy with doxorubicin-loaded hollow gold nanospheres: A platform for near-infrared light-triggered drug release. *Journal of Controlled Release*. 2012, Vols. 158(2): 319-28.
74. **Rizk, N., Christoforou, N. and Lee, S.** Optimization of anti-cancer drugs and a targeting molecule on multifunctional gold nanoparticles. *Nanotechnology*. 2016, Vol. 27(18):185704.
75. **Banu, H., et al.** Thermal Chemosensitization of Breast Cancer Cells to Cyclophosphamide Treatment Using Folate Receptor Targeted Gold Nanoparticles. *Plasmonics*. 2014, Vols. 9(6): 1341–1349.
76. **Murawala, P., et al.** In situ synthesized BSA capped gold nanoparticles: Effective carrier of anticancer drug Methotrexate to MCF-7 breast cancer cells. *Materials Science and Engineering*. 2014, Vols. 34, 158-167.
77. **Stuchinskaya, T., et al.** Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using antibody–phthalocyanine–gold nanoparticle conjugates. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2011, Vols. 10(5): 822-31.
78. **Avvakumova, S., et al.** Development of U11-Functionalized Gold Nanoparticles for Selective Targeting of Urokinase Plasminogen Activator Receptor-Positive Breast Cancer Cells. *Bioconjugate Chemistry*. 2014, Vols. 25(8):1381-6.
79. **Joshi, P., et al.** The anticancer activity of chloroquine-gold nanoparticles against MCF-7 breast cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012, Vols. 95: 195-200.
80. **Zhang, W., et al.** Trafficking of Gold Nanorods in Breast Cancer Cells: Uptake, Lysosome Maturation, and Elimination. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2013, Vols. 5(19):9856-65.
81. **Libutti, S., et al.** Phase I and pharmacokinetic studies of CYT-6091, a novel PEGylated colloidal gold-rhTNF nanomedicine. *Clinical Cancer Research*. 2010, Vols. 16(24):6139-49.
82. **Lasagna-Reeves, C., et al.** Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010, Vols. 393(4): 649-55.
83. **Hwang, S., et al.** Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy : current status and future perspective. *Nanomedicine*. 2014, Vols. 9(13):2003-22.