

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

SISTEMAS NANOPARTICULADOS E A VETORIZAÇÃO DE  
FÁRMACOS NO TRATAMENTO DO CANCRO

Luís Miguel Martins Rico

Dissertação  
Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:  
Mestre Luís Braz

2013



UNIVERSIDADE DO ALGARVE  
Faculdade de Ciências e Tecnologia

SISTEMAS NANOPARTICULADOS E A VETORIZAÇÃO DE  
FÁRMACOS NO TRATAMENTO DO CANCRO

Luís Miguel Martins Rico

Dissertação  
Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:  
Mestre Luís Braz

Faro 2013

**Título:** Sistemas nanoparticulados e a vetorização de fármacos no tratamento do cancro

**Declaração de autoria de trabalho**

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

Copyright©

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

Em primeiro lugar, ao Professor Mestre Luís Braz agradeço o apoio e a confiança depositada, ao ter aceite o desafio de orientar esta dissertação. Também pelo rigor manifestado no decurso do trabalho, bem como a disponibilidade e o esclarecimento de dúvidas. Por tudo, manifesto o meu profundo reconhecimento.

Agradeço a todos os que, de uma forma ou de outra, colaboraram para que este trabalho se tornasse possível.

# Resumo

---

O cancro é hoje em dia um dos principais fatores de morbidade e mortalidade. No ano de 2010, o National Institute of Health estimou os custos associados ao cancro em cerca de 263,8 biliões de dólares. Desta forma, a investigação nesta área continua a procurar formas de otimizar os tratamentos, aliviando o sofrimento dos doentes e reduzindo os custos associados à doença.

O tratamento do cancro tem evoluído no sentido de atingir uma maior seletividade para as células tumorais. As limitações associadas à quimioterapia com apenas um fármaco conduziram ao aparecimento de novas estratégias, nas quais se combinam diferentes terapêuticas, com diferentes mecanismos de ação, levando a um efeito sinérgico. Esta estratégia permite a administração de uma menor dose de cada fármaco, diminuindo assim os efeitos adversos.

No entanto, existem limitações clínicas para estas terapêuticas convencionais relacionadas com as propriedades dos transportadores das membranas celulares, a baixa biodisponibilidade e a distribuição dos fármacos junto das células tumorais.

A pesquisa de novas estratégias tornou-se uma necessidade para a obtenção de uma distribuição mais efetiva e específica dos fármacos nas células tumorais. Assim, os nanossistemas foram extensamente estudados para aumentar a eficácia dos tratamentos. A nanotecnologia, através da encapsulação dos fármacos, permitiu melhorar os parâmetros farmacocinéticos dos fármacos, tendo ainda a vantagem de se poder fazer uma vetorização para as células tumorais, tendo por base o reconhecimento de recetores.

**Palavras-chave:** cancro, nanossistemas, vetorização, marcadores tumorais.

# Abstract

---

Cancer is nowadays one of the main factors of morbidity and mortality. In 2010, for example, the National Institute of Health (NIH) estimated that in America, the costs associated with cancer are around 263.8 billion dollars. Therefore, research in

this area continues to look for ways to optimize treatments, relieving the suffering of patients, and reducing the costs associated to the disease.

The treatment of cancer has evolved towards achieving greater selectivity for tumor cells. The limitations associated with a single drug chemotherapy led to the development of new strategies, which combine the different therapies with different mechanisms of action leading to a synergistic effect. This strategy allows the administration of a lower dose of each drug, thus minimizing adverse effects.

However, there are clinical limitations to these conventional therapies related with cell membrane transporters properties, low bioavailability and distribution of the drugs in the tumor cells.

The research for new strategies has become a requirement for obtaining a more effective and specific distribution of the drugs in the tumor cells. Thus, the nanosystems have been widely studied to enhance the effectiveness of the treatments. Nanotechnology, through encapsulation of drugs, has improved the pharmacokinetic parameters of the drugs, having the advantage of allowing the vectorization to the tumor cells based on the recognition receptors.

**Keywords:** Palavras-chave: cancer, nanosystems, targeting, tumoral markers

# 1. Índice

---

1.	Índice .....	vii
	Índice de Figuras .....	ix
	Índice de Tabelas.....	ix
	Lista de Abreviaturas.....	x
2.	Introdução .....	12
2.1.	Teorias da Carcinogénese .....	15
<b>3.</b>	<b>O Cancro e o Hospedeiro.....</b>	<b>21</b>
3.1.	Ciclo Celular: alterações na presença da doença.....	22
3.2.	Controlo do crescimento estrutural.....	25
3.3.	Sistema Imunitário .....	26
3.4.	Apoptose .....	28
3.5.	Angiogénese.....	30
<b>4.</b>	<b>Sistemas Nanoparticulados e a sua aplicação em Medicina.....</b>	<b>34</b>
4.1.1.	Polímeros.....	36
a.	Nanopartículas poliméricas .....	37
b.	Micelas .....	38
c.	Dendrímeros .....	38
d.	Conjugados polímero – fármaco .....	39
4.1.2.	Lipossomas .....	40
4.1.3.	Nanotubos de Carbono .....	40
4.1.4.	Nanopartículas magnéticas .....	41
4.1.5.	Nanopartículas lipídicas sólidas .....	42
4.1.6.	Nanopartículas virais .....	43
4.2.	Princípios para a vetorização .....	43
4.2.1.	Vetorização passiva mediada pelo efeito EPR .....	44
4.2.2.	Vetorização ativa.....	45
4.3.	Estratégias de vetorização .....	48
4.3.1.	Vetorização para as células tumorais.....	49
1.	Recetores Tirosina Cinase .....	49
a.	HER2.....	49
b.	EGFR.....	51
2.	Recetores Transferrina.....	52
3.	Recetor do folato.....	53

4.	PSMA – Antigénio de membrana específico da próstata.....	55
5.	Outros marcadores.....	56
a.	Ferritina.....	56
b.	Molécula de adesão celular epitelial (EpCAM) .....	57
4.4.	Vetorização para o sistema vascular tumoral .....	58
4.5.	Outros marcadores associados a tumores .....	60
5.	Conclusão .....	60
6.	Referências Bibliográficas .....	61

## Índice de Figuras

---

Figura 2.1- Comparação entre a divisão celular em células normais vs. células tumorais. ....	13
Figura 3.1 -Representação esquemática do ciclo celular.....	22
Figura 3.2 - Representação esquemática das junções gap.....	26
Figura 3.3 - Representação dos mecanismos induzidos pelo HIF-1. ....	31
Figura 3.4 - Representação da transcrição do fator VEGF.....	32
Figura 4.1 - Representação dos vários tipos de nanopartículas.....	36
Figura 4.2 - Comparação entre a vascularização num tecido normal com um tecido tumoral. ..	45
Figura 4.3 - Representação do uptake celular de FA .....	54

## Índice de Tabelas

---

Tabela 3.1- Os diferentes tipos de ciclinas, e respectivas cinases.....	23
---	----

# Lista de Abreviaturas

---

**ADN** – Ácido desoxirribonucleico  
**ARN** – Ácido Ribonucleico  
**asODNs** - oligodeoxinucleótidos *antisense*  
**ATP** – Adenosina trifosfato  
**cADN** – ADN complementar  
**CDK** – Cinases dependentes da ciclina  
**CMC** – Concentração mínima micelar  
**CNT** – Nanotubos de carbono  
**DOX** – Doxorrubicina  
**EBV** - Vírus Epstein-Barr  
**EGF** – Fator de crescimento epidérmico  
**EGFR** – Recetor do fator de crescimento epidérmico  
**EpCAM** - Molécula de adesão celular epitelial  
**EPR** – Enhanced Permeability and Retention  
**FA** - ácido fólico  
**Fab** - Fragmentos de anticorpos  
**FR** - Recetor do folato  
**GENS** - Sistema nanoparticulado à base de gelatina  
**GPI** – Glicosilfosfatidilinositol  
**HeLa** - Henrietta Lacks  
**HER2** - Human Epidermal growth factor Receptor 2  
**HIF** – Hipoxia inducible factor  
**HLA** - Human Leukocyte Antigen  
**HPMA** - N-(2-hidroxiopropil)-metacrilamida  
**HRE** - hypoxia reponse elements  
**ICG** – Indocianina verde  
**LFA** - Antígeno associado à função leucocitária  
**LHRH** - Hormona libertadora da hormona luteinizante  
**MAb** – Anticorpo Monoclonal  
**MDR** – Multidrug resistance  
**MWCNT** - multi-walled carbon nanotubes  
**NIR** - Infravermelho próximo  
**PEG** – Polietilenoglicol  
**PGA** - Ácido poli-glicólico  
**P-gp** – Glicoproteína P  
**PLA** - Ácido poli-láctico  
**PLGA** - Ácido glicólico poli-láctico  
**PSMA** - Antígeno de membrana específico da próstata  
**RB** – Retinoblastoma  
**RES** - Sistema Reticular Endotelial  
**RGD** - Péptido Arg-Gly-Asp  
**RRM2** - Subunidade M2 da redutase de ribonucleótidos  
**RSV** - Vírus sarcoma Rous  
**ScFv** - fragmentos de cadeia simples variável  
**siARN** - ARN de pequena interferência  
**SLN** - Nanopartículas lipídicas sólidas  
**ssADN** – single strand ADN  
**ssARN** – single strand ARN  
**SWCNT** - single-walled carbon nanotubes  
**TAM** - Tumores associados a macrófagos  
**Tf** - Transferrina

**TfR** – Recetor da transferrina

**VEGF** – Fator de crescimento do endotélio vascular

## 2. Introdução

---

Segundo a American Cancer Society, o termo cancro representa um conjunto de doenças caracterizadas por um crescimento descontrolado das células. Existem mais de 100 tipos diferentes de cancro, sendo que a sua denominação está normalmente associada ao local ou ao tipo de tecido onde a doença tem origem. Trata-se da terceira principal causa de morte nos países desenvolvidos.<sup>1-3</sup>

Um estudo recente da Agência Internacional do Cancro indica que só em 2008, foram diagnosticados 12,4 milhões de casos de cancro em todo o mundo que resultaram em 7,6 milhões de mortes. Estima-se que em 2030 haverá 27 milhões de casos incidentes de cancro, e as mortes por cancro continuarão a aumentar para valores superiores a 11 milhões, em todo o mundo.<sup>4</sup>

Por vezes surgem alterações no material genético de uma célula que produzem mutações, as quais são responsáveis por uma alteração nos processos de regulação da proliferação e diferenciação celular. Essas alterações em genes normais (proto-oncogenes) originam os oncogenes, sendo estes responsáveis pelo desenvolvimento das neoplasias, pois promovem o crescimento de células com a lesão genética. Este processo é designado de carcinogénese ou oncogénese. A massa de células que resulta da divisão descontrolada a partir de uma célula mãe denomina-se tumor ou neoplasia (Figura 1).<sup>3</sup>

Os tumores benignos, na grande maioria dos casos, podem ser removidos, e por vezes também podem regredir, não se disseminando para os tecidos circundantes ou para outras partes do organismo. Por outro lado, os tumores malignos são caracterizados pela agressividade e pela capacidade de metastização, invadindo os tecidos envolventes e disseminando-se a partir do local primário, através da corrente sanguínea ou do sistema linfático e formando novos tumores noutros tecidos e órgãos.<sup>5</sup>

As principais formas de tratamento do cancro incluem a ressecção cirúrgica, quimioterapia, radioterapia, ou uma combinação das três.<sup>6</sup>

Apesar das melhorias verificadas ao longo das últimas décadas na eficácia dos tratamentos, a maioria das formulações quimioterapêuticas convencionais (comprimido, cápsula, injeção) apresentam vários problemas, tais como a toxicidade sistémica e um efeito destrutivo para as células vizinhas. Além disso, existe o risco de nefrotoxicidade,

neurotoxicidade, toxicidade vascular, infertilidade e complicações tromboembólicas, bem como os efeitos secundários mais comuns previstos, tais como alopecia, náuseas, e enfarte do miocárdio.<sup>7</sup>

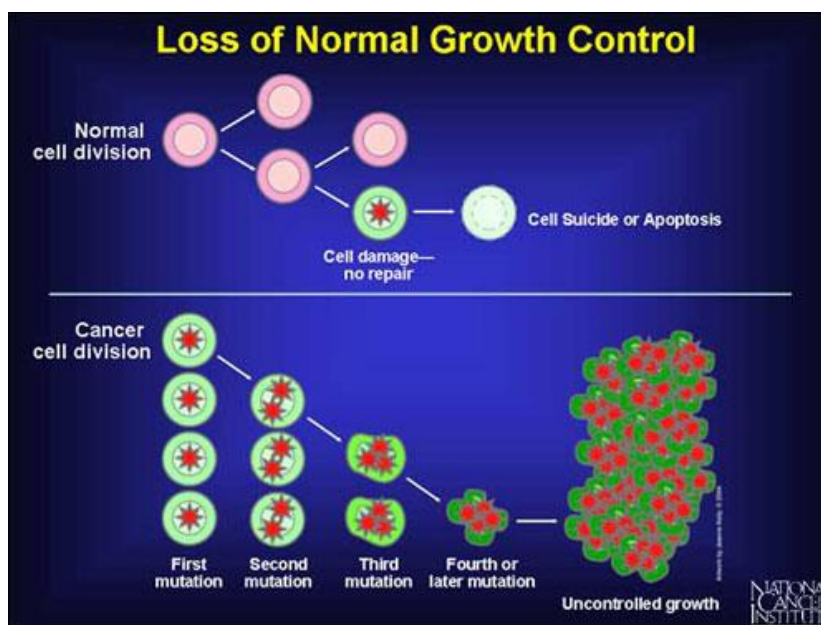


Figura 2.1- Comparação entre a divisão celular em células normais vs. células tumorais.<sup>3</sup>

Outros problemas que surgem com a quimioterapia convencional incluem a incapacidade dos fármacos para atuar de uma forma seletiva nos locais do tumor, e dificuldade na administração clínica dos mesmos, devido à metabolização e degradação a que são sujeitos, bem como aos mecanismos de resistência das células.<sup>8</sup>

O fenómeno da resistência a múltiplos fármacos é um dos principais fatores que contribui para a efetividade da quimioterapia. O gene MDR, nomeadamente, MDR1, responsável pela produção da glicoproteína P (P-gp), uma proteína membranar de alto peso molecular é responsável pelo efluxo dos fármacos, conferindo à célula proteção contra os agentes anticancerígenos. Estruturalmente, a P-gp é formada por duas partes homólogas, com sensivelmente o mesmo tamanho, em que cada parte tem um domínio hidrofóbico e um domínio hidrofílico. Este último apresenta uma homologia com os sistemas de transporte ativo presente nas membranas bacterianas, bem como locais de ligação a nucleótidos. Esta estrutura é consistente com a função da P-gp, que funciona como uma bomba de efluxo dependo de energia sob a forma de ATP.<sup>9</sup>

Por estes motivos, diversas pesquisas têm sido efetuadas no sentido de atingir as células cancerígenas com o mínimo efeito nos tecidos normais, e ao mesmo tempo de aumentar a biodisponibilidade do fármaco, no local do tumor, para uma maior eficácia do tratamento.<sup>8,10</sup>

A nanotecnologia é uma ciência emergente, na qual se depositam grandes expectativas e se espera que tenha um grande impacto na medicina.<sup>11</sup>

Os nanossistemas começam a surgir como um meio de vetorização de moléculas na área da imagiologia e terapia, sobretudo devido às suas possíveis aplicações no cancro. O objetivo da introdução de nanossistemas no combate ao cancro está relacionado com uma deteção precoce, aumentar a eficácia do tratamento e diminuir os efeitos secundários.<sup>12-14</sup> Existem atualmente uma variedade de nanossistemas, como por exemplo nanopartículas poliméricas e metálicas, lipossomas, partículas lipídicas sólidas, micelas, dendrímeros, microcápsulas, entre outros.<sup>15</sup>

Atualmente, vários nanossistemas e metodologias de vetorização de meios terapêuticos estão já desenvolvidos ou sob desenvolvimento. A utilização destes nanossistemas tem o objetivo de minimizar a degradação do fármaco e a sua inativação após a administração, diminuir os efeitos secundários, e aumentar a biodisponibilidade do fármaco e fração disponível na área patológica.<sup>16-18</sup>

Tal como outros transportadores, estes nanossistemas podem ser funcionalizados, modificando a sua superfície com uma variedade de ligandos, conferindo-lhes novas propriedades e funcionalidades. Com a funcionalização dos nanossistemas procura-se que estes adquiram capacidades tais como: um aumento do tempo em circulação e uma maior acumulação nos tecidos patológicos; reconhecimento específico de marcadores ou recetores presentes na superfície das células; capacidade de resposta a estímulos característicos dos tecidos patológicos, como por exemplo o pH ou a temperatura; capacidade de penetração nas células, evitando o contato com os lisossomas para uma vetorização intracelular mais eficaz.<sup>11</sup>

As células tumorais sofrem alterações, não só fisiológicas, mas também estruturais, e essas alterações podem ser utilizadas para a obtenção de seletividade na administração do tratamento. Nas células tumorais, a nível da superfície celular, é muito comum um aumento da expressão de determinados epítomos, o que permite que através de um ligando específico se possa vetorizar os fármacos para estas células. Alguns dos epítomos sobreexpressos nestas células mais estudados são os recetores tirosina cinase, o

recetor da transferrina, o recetor do ácido fólico, o antígeno específico da próstata e marcadores da angiogénese.

## 2.1. Teorias da Carcinogénese

---

A descrição mais antiga de cancro em humanos data de 3000-1500 a.C., e foi encontrada em papiros egípcios. Com o passar do tempo e a evolução das sociedades procurou-se saber mais sobre esta doença, começando a surgir teorias para a explicar o seu aparecimento.<sup>19</sup>

- **Teorias celulares**

Em 1841, Robert Remark descreveu o fenómeno da divisão celular em embriões de galinha e no desenvolvimento muscular. Mais tarde entre 1850 e 1855, aprofundou a sua pesquisa e propôs que as células tumorais surgiam da formação celular a partir de tecidos específicos.<sup>19</sup>

Após o ceticismo inicial, em 1858 Virchow corroborou as teorias propostas por Remark a propósito da origem dos tumores. De acordo com Virchow, as células de tecidos afetados derivam de tecidos normais, tendo por base uma malformação que inicia o aparecimento da doença. Consequentemente propôs a ideia de os tumores eram derivados de células que se dividiam mais rapidamente do que era suposto.<sup>20</sup>

Na tentativa de aumentar o conhecimento acerca do cancro Leland H. Hatwell, R. Timothy e Paul M. Nurse identificaram a presença de moléculas reguladoras como sendo a chave para a compreensão do mecanismo da divisão celular.<sup>19</sup>

Em 1951, no Hospital Johns Hopkins, George Grey desenvolveu a primeira linhagem celular a partir da paciente Henrietta Lacks, que sofria de adenocarcinoma cervical. Esta linhagem celular ficou conhecida como HeLa.<sup>21,22</sup> A linha celular HeLa constitui um dos principais marcos na pesquisa do cancro, no entanto a sua taxa de proliferação é elevada, causando o risco de contaminação cruzada de outras culturas celulares. Esta situação criou a necessidade de se estabelecerem técnicas para a determinação do tipo de células, a nível bioquímico e genético.<sup>23,24</sup>

Kerr e a sua equipa de investigação propuseram uns anos mais tarde, que muitos organismos recorriam a um mecanismo de morte celular programada de forma a restringir o crescimento celular.<sup>25</sup>

Em 1990, foi demonstrado pela primeira vez que a oncogénese não dependia apenas de um crescimento celular descontrolado, mas também da capacidade de inibir a morte celular.<sup>26</sup>

- **Teorias bioquímicas**

As teorias bioquímicas defendem que o aparecimento do cancro é devido a um erro em processos envolvidos na proliferação celular, causando transformação. Anteriormente à descoberta dos oncogenes, as teorias debatidas baseavam-se em disfunções de vários processos bioquímicos como causa da oncogénese.<sup>19</sup>

Em 1930, o bioquímico Otto von Warburg sugeriu que nas células tumorais a respiração aeróbia era substituída pela glicólise, e que a sua rápida proliferação demonstrava que a metabolização era independente da presença de oxigénio. Posteriormente provou-se que os substratos limitantes para as células tumorais eram a glucose e o oxigénio. A glicólise anaeróbia era portanto uma consequência do crescimento acelerado, que não permitia uma vascularização apropriada.<sup>27,28</sup>

Outros defendiam que nas células tumorais existia uma regressão a estados embrionários de desenvolvimento. Esta ideia, que as células se tornavam indiferenciadas, foi fundamentada devido à presença de oncoproteínas fetais durante a doença. Em células diferenciadas estes genes são normalmente inibidos, no entanto nas células tumorais esta inibição é reversível. Assim surgiu um modelo alternativo em que a “oncogenia bloqueia parcialmente a ontogenia”, em que a doença é o resultado de alterações nos genes e na sua expressão, e que impede a diferenciação celular.<sup>29</sup>

Miller e Miller sugeriram também que a carcinogénese poderia provir devido a alterações ou deleções permanentes de proteínas essenciais ao controlo do crescimento celular. Defenderam que no processo de carcinogénese enzimas específicas eram eliminadas através da ligação covalente a proteínas solúveis em água. Assim o primeiro passo da carcinogénese é a inativação da inibição endógena, uma vez que as proteínas solúveis em água tinham funções de inibição do controlo da proliferação.<sup>30</sup>

- **Teorias baseadas em agentes externos**

Estas teorias têm como base agentes externos como causa da carcinogénese. Estes agentes externos são agentes químicos, radiação e vírus.

### ▪ **Carcinogénese química**

Em 1775, o cirurgião inglês Sir Percival Pott relacionou a ocorrência de cancro com a exposição ocupacional, neste caso com os limpa-chaminés. Mais tarde, em 1915 a relação foi confirmada por Katsusaburo Yamagiwa, através da primeira experiência controlada com indução de cancro em animais.<sup>19</sup>

A meio do século XIX, foi documentada outra situação em que a exposição ocupacional pode estar na origem do aparecimento de cancro no pulmão. Neste caso, o composto era a prata, extraída das minas St. Joachimsthal, e utilizada posteriormente para o fabrico das moedas.<sup>19</sup>

Em 1761, John Hill publicou um trabalho advertindo para os perigos do tabaco e o aparecimento de tumores. Mais tarde em 1949, Ernst Wynder realizou um estudo e concluiu que existia um maior risco de cancro de pulmão em fumadores relativamente a não fumadores.<sup>19</sup>

Nos últimos anos a suscetibilidade a vários tipos cancros tem sido associada aos hábitos nutricionais. Através da consciencialização da população e com o conhecimento das propriedades carcinogénicas das espécies reativas de oxigénio, muitos estudos foram realizados, demonstrando-se a capacidade protetora dos antioxidantes como suplementos alimentares.<sup>31</sup>

### ▪ **Carcinogénese radioativa**

Em 1895, Wilhelm Conrad Rontgen realizou experiências com descargas elétricas, identificando uma radiação penetrante, fluorescente, que nomeou de raios X. Anos mais tarde faleceu com leucemia.<sup>19</sup>

No final do século XIX Marie Curie e o seu marido descobriram o elemento radio. Após anos de pesquisa sobre a radioatividade, Marie também teve leucemia. Posteriormente foi reconhecido o perigo da radiação ionizante.<sup>19</sup>

Nos primeiros anos do século XX, muitas pesquisas com os recém-inventados geradores de raios X, foram afetadas pelo aparecimento de cancros de pele e leucemias. Mais tarde foram documentados casos em que crianças tratadas com radioterapia desenvolveram cancro na tiroide. No entanto, o uso da radioterapia no cancro continua a ser utilizado, de uma forma consciente e estudada.<sup>32</sup>

## ▪ **Carcinogênese viral**

Os tumores com origens virais foram detetados no início do século XX. Em 1932, Shope e Hurst demonstraram a atividade oncogênica do papiloma vírus em coelhos. No entanto estas experiências em animais eram vistas com ceticismo, uma vez que não se aplicavam aos humanos. Em 1950, através da demonstração da indução de tumor pelo vírus sarcoma Rous (RSV), as dúvidas foram dissipadas.<sup>33,34</sup>

Mais tarde, em 1964 foi observada, através do microscópio eletrônico, a presença do vírus Epstein-Barr (EBV) em culturas celulares de linfoma de Burkitt.<sup>35</sup>

A infecção de células com vírus de ADN oncogênicos pode por um lado resultar na lise celular, com morte celular e libertação das novas partículas virais formadas, ou por outro lado transformar a célula, originando um estado neoplásico, onde há pouca ou nenhuma formação de novas partículas virais, mas em que há integração do ADN viral no ADN da célula.<sup>19</sup>

O tempo entre a infecção viral e o aparecimento do tumor sugere que os vírus podem atuar na fase de iniciação do tumor, e que os danos provocados posteriormente são um requisito para a promoção do mesmo. Estima-se que 15% de todos os tumores são causados por vírus.<sup>19</sup>

## • **Teorias somáticas**

Pierr Paul Broca, em 1866 propôs que uma deficiência hereditária num tecido afetado causava o desenvolvimento de tumor.<sup>36</sup>

Em 1877, Walter Flemming descobriu os cromossomas, e descreveu a divisão celular, nomeando-a de “mitose”. Anos mais tarde, Theodor Boveri mostrou que deficiências a nível dos cromossomas podiam tornar as células malignas. Ele sugeriu que tumores malignos poderiam resultar da condição dos cromossomas. Baseou as suas teorias em quatro conceitos principais: O problema dos tumores é um problema celular; Todos os tumores surgem de uma célula única; As células tumorais contêm material genético combinado erradamente, como resultado de processos anormais; Deficiências nos cromossomas são a causa para o aumento da proliferação celular, que é transmitida à descendência a partir da célula inicial.<sup>19,37</sup>

O termo “mutação somática” foi pela primeira vez associado ao cancro por Ernest Tyzzer, representando uma categoria de doenças genéticas das células somáticas.<sup>38</sup>

No ano de 1949, Berenblum e Shubik concluíram que a carcinogénese era constituída por pelo menos duas fases. Cinco anos depois, Armitage e Doll afirmaram, de acordo com os resultados da sua pesquisa, que o processo tinha entre seis a sete fases. Newbold e Overell colocaram a hipótese que a ativação do gene ras era apenas um dos passos para a via da oncogénese.<sup>19</sup>

O conceito de múltiplas mutações somáticas como condições necessárias para a oncogénese foi aprofundado por Foulds e aperfeiçoado por Fearon e Vogelstein.<sup>19</sup>

- **Teorias regulatórias**

As teorias regulatórias consideram que o cancro é resultado de um processo regulatório anormal entre as células, o microambiente e o hospedeiro.<sup>39</sup>

A proliferação e o metabolismo celular são regulados por mecanismos de feedback. Esta regulação é feita através de sinais intracelulares, passos limitantes e pontos de verificação e controlo. Alterações na expressão genética têm implicações nas reações bioquímicas, podendo contribuir para a variabilidade fenotípica. Estas alterações genéticas alteram o crescimento celular, a senescência, a capacidade de invasão, afetando os mecanismos interrelacionados entre si e contribuindo para o processo de carcinogénese.<sup>40</sup>

Após um número limitado de divisões, é atingindo um estado crítico, onde ocorre a morte de algumas células. Algumas células podem sofrer alterações, que lhes permitem crescer e ser dominantes relativamente a outras, devido a novas características adquiridas em consequência dessas mesmas alterações, funcionando como uma vantagem seletiva. Estas células formam uma nova população que partilham as mesmas características, muitas vezes consideradas pré-cancerígenas.<sup>41</sup>

Como parte do processo de senescência, as terminações dos cromossomas, os telómeros, vão diminuindo o seu tamanho. Após o processo de replicação, a enzima telomerase, repõe as terminações dos cromossomas prevenindo assim a perda de material genético. A sua atividade está também relacionada com o aparecimento de cancro.<sup>42</sup>

Com a evolução da pesquisa, num sentido de ter um melhor conhecimento sobre o cancro, a interação entre as células tumorais e o hospedeiro começou a ter uma maior relevância. Nas primeiras experiências acerca da carcinogénese verificou-se o aparecimento de vascularização e de um aumento do fluxo sanguíneo nas áreas em

redor dos tumores transplantados e foram identificadas semelhanças com as reações ocorridas nas lesões de tecidos.<sup>43</sup>

Com o tempo, começou a perceber-se que o sistema imunitário poderia ter um papel negativo no risco de carcinogénese, devido aos processos inflamatórios.<sup>19</sup> Outro processo que ganhou atenção foi o da regulação hormonal. Em junho de 2002, a Women's Health Initiative interrompeu um estudo, após o aparecimento de cancro da mama e problemas cardíacos em mulheres que utilizavam contraceção hormonal. Em 2006, vários estudos realizados nos Estados Unidos da América mostraram que no ano 2003 ocorreu uma diminuição da incidência de cancro do peito como consequência da redução da utilização da terapia hormonal.<sup>19</sup>

### **3. O Cancro e o Hospedeiro**

---

### 3.1. Ciclo Celular: alterações na presença da doença

O ciclo celular representa o período de tempo entre duas divisões celulares, e consiste em quatro etapas (Figura 1). Na primeira fase,  $G_1$ , ocorre a síntese de ADN e a formação de organelos, segue-se a fase S, caracterizada por uma duplicação do material genético e posteriormente a terceira fase,  $G_2$ , em que há um crescimento e a célula prepara-se para se dividir. Estas três etapas iniciais têm o nome de interfase. Posteriormente, segue-se a fase mitótica, que engloba a mitose, constituída por 4 fases (profase, metáfase, anafase, e telófase), seguida da citocinese, onde ocorre a divisão do citoplasma da célula.<sup>44</sup>

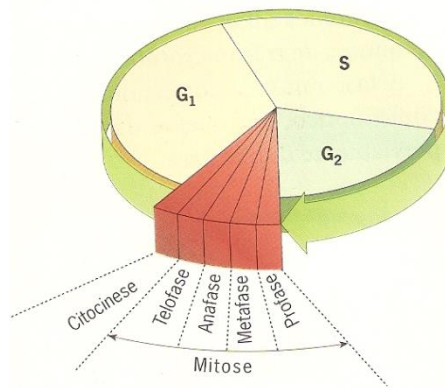


Figura 3.1 -Representação esquemática do ciclo celular. A interfase é um periodo relativamente longo quando comparado com a fase mitótica, podendo demorar horas, semanas, anos ou mesmo perpetuar-se até à morte de célula, sem que uma nova divisão ocorra.<sup>44</sup>

Na ausência de fatores de crescimento, as células não se dividem, entrando na fase  $G_0$ . O tempo de duração desta fase é variável, e é determinado pela presença ou ausência de estímulos de crescimento.<sup>19</sup>

O ciclo celular é regulado por moléculas proteicas, as cinases dependentes da ciclina (CDK), sendo que a sua atividade constitui um passo limitante no ciclo celular.<sup>19</sup> As ciclinas são uma subunidade das CDK, constituídas por uma zona homóloga de cerca de 100 aminoácidos, que forma o local de ligação à CDK. São conhecidos diferentes tipos de ciclinas, agrupadas em sub famílias A1-2, B1-3, C, D1-4, E1-2, F, G1-2 (Tabela1). A concentração das ciclinas difere consoante a fase do ciclo celular, devido a alterações na sua síntese ou degradação.<sup>19</sup>

Nas células tumorais os componentes do ciclo celular encontram-se alterados e desregulados. Pode ocorrer a ativação de mutações ou a sob expressão dos genes, provocando um aumento da concentração destas moléculas reguladoras. Em vários tipos de cancro, como cancro da cabeça e pescoço, carcinoma hepático e colo-retal, a atividade da ciclina D1/CDK4 encontra-se aumentada, devido a produção excessiva da ciclina D1, e/ou como consequência de mutações na CDK4, que tornam a ciclina D<sub>1</sub> resistente a efeitos inibitórios. Por outro lado, a sobre expressão da ciclina D está associada a 50% dos cancros da mama. A sobre expressão das ciclinas D3 e A ocorre em estádios iniciais da neoplasia intraepitelial pancreática e atinge os cerca de 100% de prevalência no cancro do pâncreas.<sup>19</sup>

Tabela 3.1- Os diferentes tipos de ciclinas, e respectivas cinases actuam em diferentes fases do ciclo celular.<sup>19</sup>

Cyclin	CDK	CAK	Stage
D <sub>1,4</sub>	2,4 (PSK-J3), 6		G <sub>1</sub>
C	8 (K35)		G <sub>1</sub>
E <sub>1,2</sub>	2, 4, 5, 6		G <sub>1</sub> /S
G <sub>1,2</sub>	GAK (G-Associated Kinase)		G <sub>1</sub> /S
A <sub>1,2</sub>	1, 2, 3		S
A <sub>1,2</sub>	1, 2, 3	Cyclin H/CDK7/ MAT1	G <sub>2</sub> /M
F			G <sub>2</sub> /M
B <sub>1,3</sub>	1		M

A desregulação do ciclo celular é o ponto crítico para o aparecimento de uma neoplasia, no entanto o organismo humano tem mecanismos que lhe permitem recuperar de erros, através de “checkpoints”. A divisão celular pode ser interrompida quando o processo não está a decorrer dentro da normalidade, e são normalmente moléculas supressoras de tumores responsáveis por esta função.

Na fase G<sub>1</sub>, a célula tem a opção de continuar a divisão progredindo para a fase S, quando há fatores de crescimento, ou na ausência destes fatores, de reverter para a fase G<sub>0</sub>. Este passo determinante é controlado pelas vias RB e P53, e inibidores das CDK.<sup>19</sup>

Os genes da família retinoblastoma (RB) são expressos em células normais e tem um efeito inibitório sobre a proliferação do ciclo celular. A proteína RB é constituída por 928 aminoácidos, arranjados em 4 domínios. Na forma desfosforilada

liga-se às ciclinas D1 e D3, sequestrando-as. Por outro lado, liga-se e sequestra também o fator de transcrição E2F, inibindo a expressão de moléculas que medeiam o ciclo celular. O complexo formado Ciclina D-RB-E2F tem um papel de inibição da síntese proteica, necessária para a proliferação do ciclo celular. Na ausência da proteína RB, as células tornam-se relativamente resistentes a inibidores da síntese proteica, evidenciando o seu papel no crescimento celular, através da inibição da transcrição do ARN polimerase I e III. Por outro lado, a proteína RB pode também formar complexos com o fator E2F e HDA-1 (desacetilase 1 das histonas) funcionando, mais uma vez, como um inibidor da transcrição.<sup>19</sup>

A fosforilação da proteína RB torna-a inativa, bloqueando assim a sua função no ciclo celular. A inatividade desta proteína é um pré-requisito para a progressão do ciclo, permitindo a passagem da fase G1 para a S. Numa fase mais avançada da fase G1, começa progressivamente a ser desfosforilada.<sup>19</sup>

A via da proteína P53 é outro ponto de controlo no ciclo celular, impedindo as células com deficiências a nível do material genético de progredir da fase G<sub>1</sub>.<sup>19</sup> Este gene é composto por 11 exões, que codificam para a proteína p53 (53,000 kDa). Esta proteína tem uma sequência específica que lhe permite ativar a expressão de genes com domínios de ligação para a p53, quer nos intrões quer nas regiões promotoras/reguladoras dos mesmos. Por outro lado, pode também inibir a transcrição de genes onde este domínio de ligação está ausente. Mutações ao nível do domínio de ligação desta proteína, podem alterar a atividade supressora de tumor desta proteína, contribuindo para o aparecimento de cancro.<sup>45</sup>

A proteína P53 tem a capacidade, tal como a RB, de se ligar ao fator de transcrição E2F, impedindo-o de se ligar a genes promotores, essenciais para a transcrição de outros genes. Outras formas desta proteína controlar o crescimento celular, é através da indução do *p21*, que inibe as CDK, ou ainda através da ligação à TBP, ativando genes reguladores do crescimento celular.<sup>19</sup>

A proteína p53 tem um tempo de semivida de aproximadamente 20 minutos, o que faz que a sua concentração plasmática seja reduzida, podendo estar numa forma latente até ser ativada. Situações em que ocorram lesões no ADN, ou hipoxia, o seu nível plasmático aumenta, bem como a sua transcrição, de forma a reparar o ADN. Por vezes as lesões não conseguem ser reparadas e são desencadeados processos que promovem a apoptose celular.<sup>45</sup>

Apesar de serem, aparentemente, duas vias distintas, interagem entre elas no controlo da fase G<sub>1</sub>. A proteína P53 contribui para a regulação da proteína RB e induz a transcrição de fatores que regulam a fosforilação da proteína RB. Por outro lado, a proteína P53 também é importante quando ocorre uma desregulação na via RB, resultando um aumento do fator E2F.<sup>19</sup>

## 3.2. Controlo do crescimento estrutural

---

A complexidade dos organismos multicelulares requer um elevado nível de coordenação, organização e controlo. A comunicação entre as células e a matriz extracelular é feita na maioria através de recetores de adesão. No entanto existem também vias dependentes de fatores de crescimento e hormonas. A falha nestas vias de sinalização tem como consequência uma alteração na arquitetura dos tecidos, alterando as interações célula-célula e células-matriz.<sup>46</sup>

As células através do contato com as células contíguas inibem a progressão do ciclo celular. Este processo tem o nome de inibição por contato, o qual não ocorre nas células tumorais. A oncogénese inicia-se quando as células crescem acima da velocidade normal, em locais onde a proliferação normalmente é suprimida. Neste momento, as células tumorais tornam-se autónomas relativamente aos sistemas de controlo do espaço. A perda das interações com a matriz extracelular também provoca uma facilidade na mobilidade celular, favorecendo a desorganização do tecido normal e a metastização.<sup>47</sup>

Um parâmetro muito importante para a manutenção da organização dos tecidos é a comunicação entre as células. As células comunicam entre si através de umas unidades hexaméricas, pertencentes à família das conexinas, que se acoplam com as conexinas correspondentes da célula contígua, formando as junções gap (figura 3). Estes canais formados entre as membranas plasmáticas das células permitem sincronizar as funções metabólicas e o potencial de membrana entre células do mesmo tecido.<sup>19</sup> Nas células estaminais pluripotentes não há expressão de genes das conexinas nem junções gap funcionais.<sup>48</sup>

A comunicação célula-célula é feita através da libertação de mediadores solúveis. Normalmente esta forma de comunicação apesar de ter um emissor e um recetor é unidirecional.

Nas células tumorais a quantidade de junções gap é reduzida e há uma diminuição na expressão de Conexinas. Consequentemente o nível de comunicação através destas superfícies torna-se inferior relativamente às células normais. As moléculas originadas pelos proto oncogenes bloqueiam a comunicação intercelular através das junções gap. Esta deficiência na comunicação intercelular tem um papel importante na fase de promoção do tumor, no processo de carcinogénese.<sup>49,50</sup>

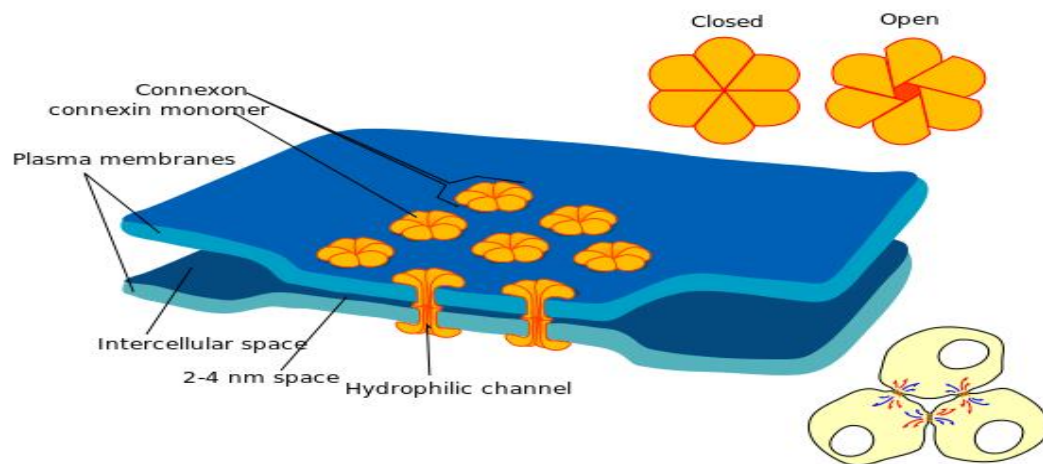


Figura 3.2 - Representação esquemática das junções gap, formadas entre células contíguas.<sup>51</sup>

Nem todas as células que abandonam o local do tumor primário têm a capacidade de metastizar. Grande parte destas células acaba por sofrer apoptose. A presença de fatores moleculares noutros órgãos pode influenciar a capacidade de metastização da célula, alterando a sua expressão genética, e a sua proliferação. Outra característica é o microambiente do novo órgão ou local, que pode não ter as mesmas características, e não ser favorável à proliferação do tumor. Assim, dois tipos de células tumorais, desenvolvendo-se em dois locais distintos, podem apresentar diferentes níveis de enzimas proteolíticas.<sup>52</sup>

### 3.3. Sistema Imunitário

A principal defesa do organismo é o sistema imunitário, e como tal, para a doença proliferar, o sistema imunitário tem que ser ultrapassado. Nas células tumorais a expressão de genes está alterada, bem como os produtos desses genes. Para que as células do sistema imunitário reconheçam essas moléculas como sendo estranhas ao organismo, estas têm que se localizar na superfície celular. Quando expressas à

superfície da célula, esta é atacada por linfócitos T citotóxicos ou células NK, resultando na morte da célula. O sistema imunitário também pode ser ativado na presença de certos tipos de respostas de *stress*, provocados por danos em tecidos, ou estados de hipoxia, normalmente encontrados em estados mais avançados de tumores.<sup>19</sup>

As células tumorais, de forma a ultrapassar o sistema imunitário, diminuem a expressão de genes importantes, como o HLA-I (Human Leukocyte Antigen). Em mais de metade dos cânceros de peito em estados avançados, o HLA encontra-se ausente da superfície das células tumorais, dificultando o diagnóstico. Outras neoplasias provocam uma incapacidade das moléculas de HLA chegarem à superfície celular, muitas vezes devido à ausência da síntese de B2-microglobulina, uma das subunidades da molécula.<sup>19</sup>

Um das desvantagens da doença é o fato de os produtos derivados das células tumorais, serem produtos intrínsecos do organismo, isto é, são reconhecidos como pertencendo ao organismo, mais do que como sendo específico dos tumores. Assim, a baixa proteção pelo sistema imunitário resulta da incapacidade do tumor desencadear uma resposta imunitária efetiva. Outro aspeto a favor da doença é a baixa concentração de moléculas tumorais nos nódulos linfáticos e nos tecidos linfáticos, e consequentemente não são apresentados aos linfócitos T citotóxicos.<sup>53</sup>

A diversidade dos antígenos expressos pelas células tumorais pode provocar diferentes respostas pelo sistema imunitário. Uma célula tumoral pode expressar vários antígenos à sua superfície, no entanto o sistema imunitário apenas responde a uma minoria. Este fenómeno chama-se imunodominância, isto porque esses antígenos que desencadeiam uma resposta imunitária são dominantes relativamente aos outros que não provocam qualquer reação.<sup>54</sup>

Por outro lado, os linfócitos T podem levar a alterações na especificidade da resposta aos antígenos estranhos ao organismo, ao longo da doença. Estas alterações estão relacionadas com o facto de os linfócitos T perderem a especificidade apenas para os antígenos estranhos e começarem também a reagir com os antígenos do próprio organismo. Isto ocorre na sequência de um primeiro ataque das células T, em que são libertados antígenos próprios, e as células T são novamente ativadas, mas contra os novos antígenos apresentados. Este fenómeno tem o nome de *epitope spreading*.<sup>55,56</sup>

### 3.4. Apoptose

---

Em células normais os mecanismos de controlo antitumorais endógenos são fisiologicamente dominantes em relação às funções promotoras de tumores<sup>19</sup>. A morte celular programada é um mecanismo de prevenção para um crescimento descontrolado<sup>25</sup>.

Apoptose foi um termo proposto em 1972<sup>25</sup>, em que *apo* significa “a partir de” e *ptose* significa “queda”. Em grego, a palavra apoptose simboliza a queda das folhas ou das pétalas. Este termo simboliza a perda das funções vitais e consequentemente a morte sem ocorrência de estímulos por fatores externos. Este processo biológico é desencadeado através da ativação de sinais autodestrutivos, presentes em todas as células.<sup>19</sup>

A apoptose é caracterizada por processos bioquímicos e morfológicos, como a condensação da cromatina, a fragmentação do ADN e formação de corpos apoptóticos. No caso de apoptose, a cromatina não fica floculada, não há turgescência das mitocôndrias e a membrana celular continua impermeável a agentes externos. A não libertação de enzimas lisossomas contribui para que o processo inflamatório não seja desencadeado<sup>57</sup>.

A regulação do processo tem uma componente genética e outra relacionada com sinais fisiológicos e não fisiológicos. Cada célula recebe múltiplos sinais, significando que existem recetores específicos que induzem a célula a entrar em apoptose ou a prosseguir o ciclo.<sup>19</sup> A alteração de recetores específicos pode conduzir ao aparecimento de células malignas, resultando de uma conjugação anormal entre sinais de indução ou inibição da apoptose e sinais para a proliferação<sup>58</sup>.

O processo de apoptose pode ser iniciado tanto por estímulos físicos, fisiológicos ou patológicos, desencadeando uma cascata de sinais em que a ativação das caspases tem um papel fundamental. Para o desenvolvimento dos tecidos, estes têm que resistir à apoptose, isto é, as células num determinado tempo e local são submetidas ao processo apoptótico, para que o tecido mantenha a sua forma normal bem como a sua função. Deste modo, o desenvolvimento de uma neoplasia está inteiramente relacionado com processos de apoptose com origem patogénica e com os mecanismos do ciclo celular.<sup>19</sup>

A apoptose ocorre quando uma variedade de sinais desencadeia uma cascata de reações que culminam na ativação das caspases. As caspases são protéases com resíduos

de cisteína específicas para resíduos de asparagina. Dividem-se em dois grupos, caspases iniciadoras e caspases efetoras.<sup>19</sup>

Podem atuar por diferentes vias, consoante o estímulo a que são sujeitas, que pode ser através da ligação a recetores (via extrínseca), citotoxicidade (via intrínseca) ou *stress* no retículo endoplasmático (via endoplasmática).<sup>19</sup>

Tal como muitas outras enzimas, as caspases encontram-se inicialmente numa forma inativa, proenzima, que necessita de ser ativada através da clivagem de um resíduo interno de asparagina. Esta clivagem é catalisada pelas caspases iniciadoras.<sup>19</sup>

A par das caspases, também as endonucleases têm uma função muito importante no mecanismo da apoptose. As endonucleases são responsáveis pela condensação da cromatina, segregação e dispersão nuclear, e conseqüentemente pela redução do volume do núcleo. A clivagem da cromatina e a sua condensação originam umas pequenas massas, os corpos apoptóticos, que são posteriormente fagocitados por células vizinhas ou por macrófagos.<sup>19,59</sup>

O crescimento de um tumor reflete a ocorrência de um desequilíbrio entre a proliferação e a apoptose, iniciando-se o processo de carcinogénese. Um estudo demonstrou que uma pré-neoplasia hepática apresenta um número de células em apoptose muito superior ao dos tecidos adjacentes não afetados. Através deste estudo, verifica-se que os estádios iniciais do processo de desenvolvimento tumoral podem ser reversíveis, pois cerca de 80-90% das células são eliminadas por apoptose.<sup>60,61</sup>

As células tumorais são mais permeáveis aos linfócitos T citotóxicos e às células NK, que provocam alterações morfológicas e conseqüentemente apoptose.<sup>60</sup>

Apoptose surge como um mecanismo fisiológico de proteção, em que o organismo tem a capacidade de eliminar células com mutações patológicas<sup>62</sup>. Novas pesquisas sugerem a oncogénese como uma causa possível para a desregulação da apoptose celular. Oncogenes, como o bcl-2, estão associados à inibição da apoptose, e não diretamente à proliferação celular<sup>63</sup>. O gene c-myc, na presença de estímulos de crescimento, está envolvido na proliferação celular. No entanto, na ausência desses estímulos pode induzir a apoptose. Outro gene, neste caso supressor de tumor, é o supracitado p53, e a sua ausência ou inativação é frequentemente observada em neoplasias. Dependendo do estado fisiológico da célula, bem como de sinais internos e externos, a proteína p53 pode induzir a célula a continuar o ciclo celular ou a iniciar o processo apoptótico.<sup>64</sup>

Um estudo em linhas celulares de fibroblastos de roedores, onde foram inseridos os oncogenes humanos c-myc e H-ras demonstraram uma capacidade de invasão e metastização variáveis. Os tumores c-myc apresentaram altas taxas mitóticas e apoptóticas, e uma lenta e baixa taxa de expansão. Por outro lado os tumores ras apresentaram baixas taxas apoptóticas. A necrose foi significativa, em consequência da ausência de endotélio vascular, provocando hipoxia. Um outro estudo, mostrou que o aumento da proteína Bcl-2 provoca a inibição da apoptose.<sup>60</sup>

O mecanismo de apoptose tornou-se interessante pelo facto de poder ser programado intrinsecamente, ou seja, conhecendo o processo seria possível induzir a célula a entrar em apoptose, o que seria um grande avanço na terapia, em especial na área do cancro. Entretanto foi já demonstrado que alguns fármacos citotóxicos atuam sobre as células tumorais induzindo o processo apoptótico.<sup>60</sup>

A morte celular por apoptose, como efeito de tratamentos anticancerígenos, sugere que a indução deste processo não depende do ciclo celular. São ativadas as fases finais do processo, provavelmente mediadas por endonucleases. Esta capacidade de as células tumorais entrarem em apoptose tornou-se um dos pontos mais importantes para o combate à doença.<sup>65</sup>

No ano de 1994, Solary e o seu grupo de investigação sugeriram que através da modulação do processo de apoptose celular se poderia conseguir uma forma de combater a doença, através de fármacos que controlassem essa atividade modulatória. Adicionalmente, a modulação da apoptose iria permitir uma redução dos efeitos secundários, pois seria possível evitar a apoptose em células normais. Estes estudos. Estes dados forneceram novas orientações para pesquisas posteriores, na procura de novos fármacos com uma maior seletividade para as células tumorais.<sup>65</sup>

### **3.5. Angiogénese**

---

A rede vascular é essencial para a sobrevivência das células. Os vasos sanguíneos são importantes para o aporte de oxigénio e nutrientes, e remoção de produtos do metabolismo, cruciais para a manutenção e proliferação normais dos tecidos.

Num organismo adulto saudável, a angiogénese é um processo pouco frequente, ocorrendo em situações de lesões e na altura posterior à menstruação nas mulheres. Estados patológicos, aumentam o *stress* celular, podendo desencadear angiogénese. Os

tumores, normalmente, ativam o processo de angiogénese, pois com o aumento da proliferação celular, aumentam as necessidades metabólicas, e há um aumento de estados de hipoxia. É precisamente este estado de hipoxia, que desencadeia a angiogénese.<sup>19</sup>

Os tumores crescem rodeando os vasos sanguíneos, e o seu crescimento está dependente da difusão de oxigénio, nutrientes e produtos do catabolismo. A distância entre a célula e o vaso sanguíneo não pode ser superior a 180 µm, pois este é o limite da difusão do oxigénio pelos tecidos, antes de ser completamente metabolizado. Células situadas a uma distância superior entram no processo de necrose.<sup>66-68</sup>

O crescimento acelerado, associado à pouca vascularização nos tumores sólidos, tem como consequência a hipoxia, a carência em nutrientes e alterações no pH. Estas condições ativam as respostas celulares de *stress*, que incluem a proteína UPR (unfolded protein response), induzida por alterações no microambiente do reticulo endoplasmático, que provocam uma conformação e maturação alterada das proteínas. Outra via ativada é a do fator HIF (hipoxia inducible factor) (Figura 4), um dos principais reguladores do mecanismo da angiogénese, essencial à propagação do tumor.<sup>19</sup>

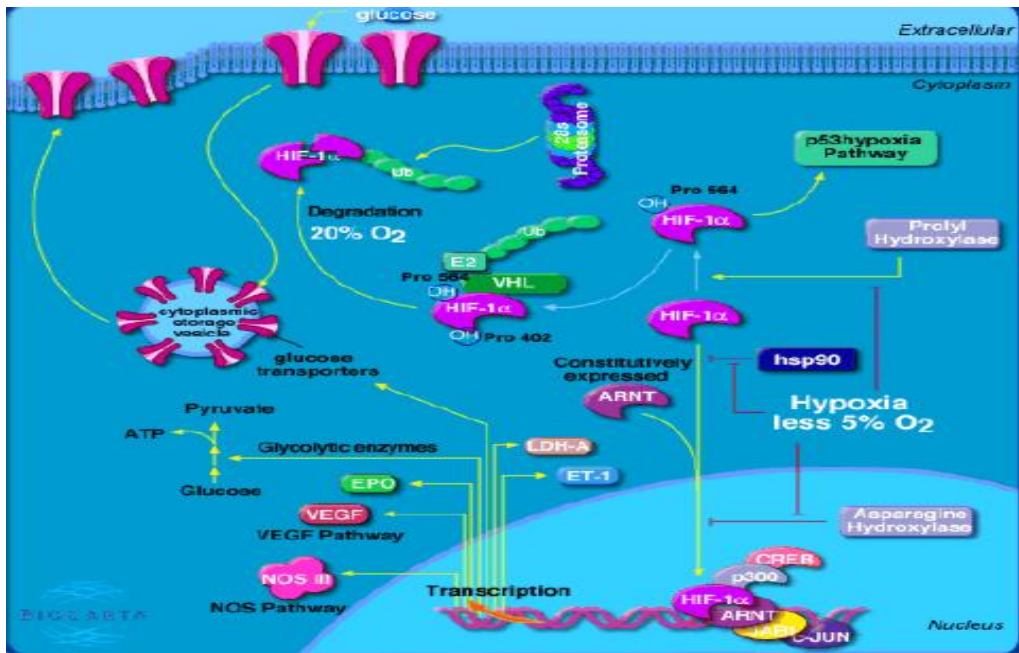


Figura 3.3 - Representação dos mecanismos induzidos pelo HIF-1.<sup>69</sup>

O HIF-I é estabilizado e posteriormente induz a expressão do VEGF (Figura 5). Após a ligação ao ARNT o complexo é translocado para o núcleo, onde o HIF-I se liga a genes que contem HRE (hypoxia reponse elements). Aumenta a expressão do VEGF e

a produção de eritropoietina, são ativadas as vias do óxido nítrico, promovendo a vasodilatação e ainda aumenta expressão de enzimas da glicólise.<sup>70</sup>

O VEGF é fundamental para a formação de novos vasos sanguíneos. Na presença de HIF-I há um aumento da transcrição do VEGF, como consequência da

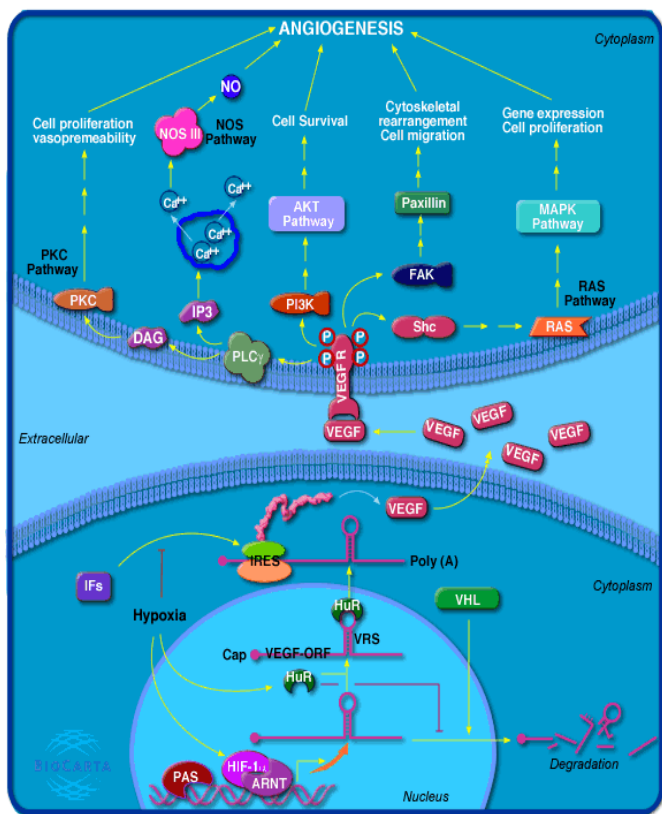


Figura 3.4 - Representação da transcrição do fator VEGF, e das suas funções no processo de angiogênese.<sup>73</sup>

ligação do HIF-I ao gene do VEGF, funcionando como um promotor. Por outro lado, o aumento da produção do VEGF é devido ao aumento da estabilidade do mRNA, pelo HuR.<sup>71</sup> Alguns tipos de cancro expressam elevados níveis de VEGF, sendo as células tumorais as principais responsáveis por isso.<sup>19</sup>

Outro pré-requisito para a formação de novos vasos sanguíneos é a degradação da matriz extracelular e a posterior remodelação. O colagénio é constituinte principal da matriz, sendo necessárias colagenases

para a sua degradação e invasão das células endoteliais.<sup>72</sup>

Nas neoplasias malignas a rede de vascularização ocupa uma maior área de superfície que as neoplasias benignas. Na neoangiogênese tumoral ocorrem malformações na rede vascular. O processo pode ocorrer devido a um aumento da estimulação da angiogênese, a uma diminuição dos inibidores da angiogênese, ou aos dois concomitantemente.<sup>74</sup>

A angiogênese nos tecidos neoplásicos é um processo complexo, em que há a intervenção de vários fatores como a libertação de cinases por células endoteliais ativadas; degradação da membrana basal dos vasos existentes; migração de células endoteliais para o espaço intersticial; proliferação de células endoteliais; formação do novo lúmen e de novas membranas basais; fusão dos novos vasos formados e manutenção do fluxo sanguíneo.<sup>75</sup>

A invasão das células endoteliais na matriz extracelular, para a iniciação da angiogênese só é possível se houver uma degradação prévia da matriz extracelular Os

processos proteolíticos, necessários para esta degradação, são catalisados por metaloproteínas.<sup>76</sup> Após a degradação proteolítica da matriz, as células endoteliais passam através da matriz, e começam a proliferação, induzida pelos fatores de crescimento. Logo após a formação dos vasos, a matriz recém-formada pode ser novamente degradada, permitindo novamente a invasão e formação de novas ramificações que se conectam com outros vasos. Perante estes factos é possível afirmar que a formação de novos vasos depende de uma alteração na ativação ou inibição do ciclo proteolítico extracelular.<sup>60</sup>

Um segundo grupo de fatores, que atuam diretamente sobre o endotélio vascular, constituído por citoquinas, quimiocinas, enzimas angiogénicas e pelo fator de crescimento de fibroblastos, ativam as células em redor das células epiteliais. O terceiro grupo de moléculas é formado por fatores, cujo efeito é mediado por fatores libertados pelos macrófagos, células endoteliais e células tumorais.<sup>77,78</sup> A fase final do processo de angiogénese é caracterizado pela construção dos vasos sanguíneos e pela determinação da polaridade das células endoteliais, para a formação do lúmen, o que envolve a necessidade de interações entre as células e matriz.<sup>79</sup>

Quando o processo de neovascularização se completa ocorre uma diminuição da expressão dos fatores angiogénicos, bem como uma diminuição da concentração dos mesmos no local. Por outro lado, há um aumento dos inibidores, e o processo estabiliza.<sup>60</sup>

Existem outras explicações para a formação de vascularização nos tumores. A teoria do mimetismo vascular defende que as células tumorais podem formar canais vasculares sem a presença de endotélio vascular.<sup>80</sup>

Estudos a nível ultra estrutural mostraram que em alguns casos as células tumorais formam as paredes vasculares. Estes dados tem particular importância, a nível fisiopatológico, quer no tecido tumoral, quer no tratamento.<sup>77,81</sup>

Este fenómeno de mimetismo vascular encontra-se principalmente em tumores mais agressivos e metastáticos, em que os canais vasculares se formam a partir de células tumorais, e da matriz extracelular, assemelhando-se a vasos já formados e assegurando o aporte de oxigénio e nutrientes.<sup>81</sup>

A angiogénese é um processo fundamental para a sobrevivência das células tumorais, e da sua proliferação. Através da compreensão dos mecanismos pelos quais há o desenvolvimento de vascularização nos tumores, é possível definir estratégias de atuação, no sentido de travar ou diminuir a propagação da neoplasia.<sup>60</sup>

## **4. Sistemas Nanoparticulados e a sua aplicação em Medicina**

---

O conceito da terapêutica direcionada apareceu no ano de 1970, com o desenvolvimento dos anticorpos.<sup>82</sup> De acordo com muitos cientistas e oncologistas a terapêutica direcionada baseia-se na utilização de fármacos com um mecanismo de ação bem conhecido, que atua especificamente sobre um alvo, ou um processo biológico, provocando a sua inativação, regressão ou destruição.<sup>83</sup>

A nanomedicina, é uma ciência emergente que permite a conjugação entre as potencialidades dos nanossistemas e as áreas da biotecnologia e saúde, contribuindo para grandes avanços neste conceito de direcionamento da terapêutica. Entre as várias aplicações possíveis a nível da saúde, na área do cancro há uma grande expectativa, pois nanopartículas funcionalizadas de forma a interagirem selectivamente com células humanas, podem permitir uma diminuição dos efeitos secundários, bem como um aumento da eficácia.<sup>82,84</sup>

De uma forma geral, os sistemas nanoparticulados têm pelo menos três constituintes, um núcleo, o constituinte terapêutico ou de diagnóstico, e modificadores de superfícies biológica. Idealmente devem ser compostos biodegradáveis, de fácil preparação e baixo custo. Estes sistemas devem possuir uma boa capacidade de transporte, isto é, armazenar/transportar uma grande quantidade de fármaco, um tempo de semivida elevado, ou o necessário para que o fármaco seja libertado conforme a terapêutica delineada, e também um maior nível de especificidade permitindo uma maior acumulação em determinadas zonas do organismo.<sup>82</sup>

Os diferentes tipos de nanossistemas apresentam diferentes características, como por exemplo, o tempo de semivida, um aspeto importante para o delineamento da estratégia terapêutica. Os conjugados são os nanossistemas com menor tamanho (1-20 nm) e o seu tempo de semivida pode variar entre várias horas a dias. Por outro lado, nanossistemas maiores como micelas e lipossomas tem um tempo de semivida menor, cerca de 2-50 horas. No entanto, permitem a encapsulação de maiores quantidades de fármaco.<sup>85,86</sup>

A administração de fármacos utilizando nanossistemas resulta num aumento da concentração do fármaco no local do tumor. As nanopartículas podem ser construídas de forma a transportar múltiplos fármacos, que podem ser libertados em conjunto num determinado local, com uma velocidade de libertação controlada, evitando assim regimes terapêuticos mais complicados e aumentando a adesão à terapêutica por parte do doente.<sup>85,87</sup>

Através da nanotecnologia, é possível encapsular uma variedade de agentes terapêuticos, aumentando a solubilidade e estabilidade dos fármacos. Adicionalmente, as nanopartículas podem ser conjugadas com ligandos, que interagem especificamente com determinados tipos de células tumorais, permitindo o direcionamento da terapêutica, e consequente uma maior distribuição do fármaco nas células tumorais.<sup>84</sup>

Existem vários tipos de nanopartículas que estão, atualmente, a ser utilizadas na terapêutica do cancro, ou em fases de ensaios clínicos (Figura 6).

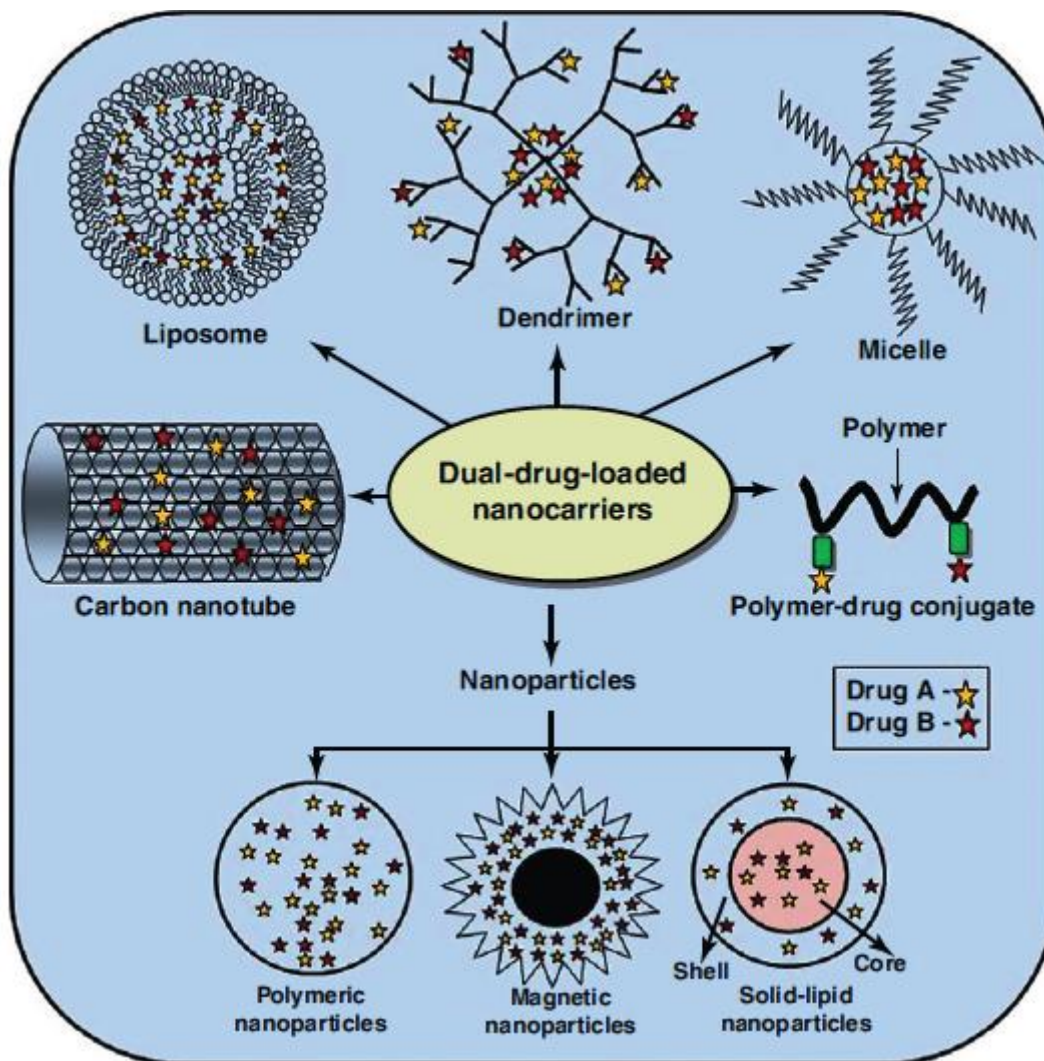


Figura 4.1 - Representação dos vários tipos de nanopartículas utilizadas na vectorização da terapêutica.<sup>88</sup>

#### 4.1.1. Polímeros

Os materiais poliméricos utilizados são biodegradáveis e facilmente eliminados pelo organismo. De acordo com a sua preparação podem originar um encapsulado (fármaco no interior das nanopartículas) ou um conjugado (fármaco ligado à matriz polimérica).<sup>89</sup>

Polímeros semissintéticos como o ácido poli-láctico (PLA), ácido poli-glicólico (PGA), ácido glicólico poli-láctico (PLGA), ácido poliglutamico e ácido polimálico, bem como os seus copolímeros tem sido estudados, no âmbito da sua utilização para a terapêutica direcionada.<sup>90</sup>

Os polímeros podem também ser utilizados à superfície de outros tipos de nanossistemas. Por exemplo, o polietilenoglicol (PEG) é um polímero com propriedades hidrofílicas, que confere à nanopartícula a capacidade de evitar a eliminação a nível do sistema reticuloendotelial. Por outro lado, a diminuição da excreção das nanopartículas, significa um aumento no tempo de semivida.<sup>3</sup>

#### ***a. Nanopartículas poliméricas***

As nanopartículas são partículas sólidas, coloidais, com um tamanho que varia entre 10-1000nm. Existem diferentes tipos de nanopartículas, sendo que a sua forma de preparação determina o tipo de nanopartícula, bem como as suas propriedades para a vetorização dos fármacos. Dependendo da forma da nanopartícula, nanoesferas ou nanocápsulas, os fármacos podem ser adsorvidos, encapsulados ou conjugados na matriz da nanopartícula.<sup>91,92</sup>

As suas pequenas dimensões facilitam sua entrada através das membranas celulares, bem como a sua estabilidade na corrente sanguínea.<sup>4</sup> Existem várias nanopartículas poliméricas já em uso clínico. A albumina, a heparina e o quitosano são polímeros que devido às suas características são ideais para a formulação de sistemas de administração de fármacos. O quitosano é um composto com baixa toxicidade, compatível com o organismo, biodegradável, com propriedades mucoadesivas e com um baixo custo. Por outro lado, a albumina é uma proteína endógena e como tal não é uma molécula imunogénica, e apresenta uma boa capacidade de ligação aos fármacos, uma característica com relevância no âmbito da vetorização de fármacos.<sup>93,94</sup>

No tratamento do cancro da mama metastático, é já utilizado paclitaxel associado a nanopartículas de albumina, (Abraxane®). A cisplatina encapsulada em nanopartículas de ácido poli-láctico e polietilenoglicol foi também já estudada no tratamento de cancro da boca, apresentando resultados promissores.<sup>95</sup>

## **b. Micelas**

As micelas são constituídas por moléculas co-poliméricas anfifílicas que em meio aquoso se organizam espontaneamente, formando uma nanocápsula. Esta organização pelos blocos anfifílicos está relacionada com a concentração crítica micelar (CMC). A zona hidrofóbica forma o interior da nanocápsula e serve de reservatório a fármacos, enquanto a zona hidrofílica forma o exterior na nanocápsula, estabilizando o interior hidrofóbico, e conferindo um estado de energia mínima.<sup>86</sup>

As micelas co-poliméricas apresentam uma grande estabilidade quer *in vitro*, quer *in vivo*. São moléculas biocompatíveis e permitem a dissolução de fármacos com baixa solubilidade. Um grupo muito importante, são as micelas formadas por conjugados de co-polímeros solúveis com lípidos, como por exemplo, o complexo polietilenoglicol-fosfatidil etanolamina.<sup>92</sup>

As alterações a nível das células tumorais, nomeadamente na permeabilidade das membranas e na retenção, permitem uma vectorização das micelas para estas células, através de respostas aos co-polímeros anfifílicos, ou a ligandos presentes na superfície das micelas.<sup>84,88</sup>

O Genexol-PM® é constituído por uma micela polimérica que contém paclitaxel e que está em ensaios clínicos em doentes com cancro refratários em estado avançado.<sup>84</sup>

## **c. Dendrímeros**

Os dendrímeros são macromoléculas poliméricas à nanoescala, constituídas por várias ramificações de monómeros que emergem radialmente a partir de um central. O tamanho, a forma e especificidade dos dendrímeros estão relacionados com as dimensões e com a composição química dos monómeros, que os constituem, bem como pelos grupos funcionais presentes na sua superfície. Durante a sua síntese, estas características podem ser controladas, tornando os dendrímeros uma das nanotecnologias mais versáteis.<sup>84,96</sup>

Tal como noutros nanossistemas, também os dendrímeros podem ter na sua superfície moléculas que interagem com recetores presentes nas membranas celulares.

O dendrímero de poliamidoamina é o mais comum, sendo muito utilizado como a matriz para a conjugação com fármacos. Ultimamente, tem sido utilizado juntamente com a cisplatina, apresentado resultados significativos.<sup>84,88</sup>

Por outro lado, também podem ser incorporadas nanopartículas metálicas, para a utilização dos dendrímeros numa fase de diagnóstico, por exemplo em imagiologia. No entanto, sabe-se que alguns destes complexos apresentam toxicidade elevada para o organismo, diminuindo assim a sua utilização. Um estudo demonstra que cobrindo a superfície do complexo dendrimero-metal com moléculas de ouro, resulta numa diminuição na toxicidade do complexo, sendo que a alteração no seu tamanho não é significativa. As moléculas de ouro servem ainda de suporte a outras moléculas com alta afinidade para as células tumorais, como os folatos.<sup>90,97</sup>

#### ***d. Conjugados polímero – fármaco***

A conjugação de macromoléculas, naturais ou sintéticas, a fármacos teve o seu início nos anos 50.<sup>98</sup> Esta terapêutica baseada em copolímeros de N-(2-hidroxipropil)-metacrilamida HPMA, que são altamente compatíveis com o organismo, acumulam-se preferencialmente nas células tumorais e apresentam uma maior eficácia no tratamento relativamente às moléculas de baixo peso molecular.<sup>99</sup>

O HPMA, um polímero sintético, conjugado com doxorrubicina, constituiu um produto conhecido como PK1, completou a fase II dos ensaios clínicos referentes a diversos tipos de cancro resistentes a quimioterapia e radioterapia.<sup>82,100</sup>

Estes conjugados, para apresentarem a eficácia desejada, têm obrigatoriamente que respeitar duas condições. Em primeiro lugar, o complexo tem que ser reconhecido pela membrana celular das células alvo, para posteriormente poder ser internalizado e em segundo, a nível intracelular, pelas enzimas lisossomais, que induzem a libertação do fármaco.<sup>98</sup>

O peso molecular é um parâmetro muito importante a considerar para este tipo de partículas. Sabe-se *a priori* que quanto maior o peso molecular, maior a semivida do complexo em circulação, permitindo uma maior acumulação nos tecidos tumorais, potenciada pelo efeito da permeabilidade e retenção aumentada (EPR). No entanto, a acumulação do conjugado polímero-fármaco nos tecidos tumorais é determinada por um gradiente de concentração. A concentração depende da dose administrada e o tempo em circulação depende do peso molecular, como já referido anteriormente. Por outro lado, a constituição da matriz do transportador deve ser biodegradável, sob pena de se acumular noutros tecidos e provocar toxicidade.<sup>98</sup>

Adicionalmente, estes complexos têm como principais vantagens a baixa toxicidade, o aumento da solubilidade e biodisponibilidade do fármaco, diminuição da expressão do MDR e a ausência de resposta imunitária.<sup>88</sup>

A terapêutica macromolecular com copolímeros de HPMA entrou em ensaios clínicos no início de 1990. Alguns exemplos de complexos em ensaios clínicos são copolímero de HPMA com doxorubicina (DOX), com galactosamina, com paclitaxel e com derivados da platina. Foi também demonstrado a sua utilidade para uma terapia combinada, através do desenvolvimento de um polímero do tipo HPMA conjugado com um citostático e um anti-inflamatório, a doxorubicina e adexametasona, respetivamente.<sup>88,98</sup>

#### **4.1.2. Lipossomas**

Os lipossomas são estruturas esféricas formadas por uma bicamada de fosfolípidos, com um meio interno aquoso. Já foram aprovadas formulações de lipossomas com doxorubicina (Doxil®), daunorrubicina (DaunoX-ome®), citarabina (DepoCyt®) e vincristina (Onco-TCS) para o tratamento do cancro da mama metastático e do sarcoma de Kaposi.<sup>84,88</sup>

Num estudo com lipossomas conjugados com transferrina, e com doxorubicina e um inibidor da Pgp (Verapamilo) na sua face interior, avaliou-se a efetividade dos mesmos em células resistentes à doxorubicina (K562). Os resultados indicaram um aumento da citotoxicidade sobre as células, justificado pela inibição da Pgp, diminuindo o efluxo do complexo farmacológico por parte das células.<sup>88,101</sup>

#### **4.1.3. Nanotubos de Carbono**

Os nanotubos de carbono (CNT) são nanomateriais diferentes dos anteriormente mencionados, e resultam dos avanços na síntese química. Apresentam uma forma cilíndrica, constituída por átomos de carbono, com hibridização sp<sup>2</sup>, dispostos em unidades hexagonais.<sup>102</sup>

Estas partículas têm características que permitem desempenhar funções a nível da imagiologia, terapêutica direcionada e diagnóstico e tratamento do cancro. Podem ser utilizadas para a obtenção de uma libertação controlada, bem como para o

direcionamento de um determinado fármaco. Adicionalmente, permitem um aumento, indireto, da solubilidade de muitos fármacos ou moléculas.<sup>102</sup>

A principal característica, que torna a utilização dos CNT tão promissora no direcionamento de fármacos, é a sua estrutura “oca”, em que tanto a superfície interior como a exterior podem ser funcionalizadas de acordo com os objetivos que se pretende. Assim é possível criar dentro do CNT um ambiente favorável à colocação de um fármaco dentro do CNT, e modificar a superfície exterior favorecendo parâmetros como a biodisponibilidade e biodegradação.<sup>102</sup>

Os CNT podem interagir com as células por diferentes formas, como difusão passiva através da membrana ou por endocitose, em que os CNT se ligam à membrana e são posteriormente internalizados. Por outro lado, estas partículas podem ser funcionalizadas de forma a tornarem-se mais solúveis em meio aquoso, aumentando a estabilidade no plasma e conseqüentemente diminuindo a toxicidade no organismo.<sup>7,88</sup>

De acordo com a sua estrutura podem ser classificados em “single-walled” (SWCNT) e “multi-walled” (MWCNT). Os SWCNTs são formados por uma camada cilíndrica simples, fechados de ambos os lados, e com um diâmetro que varia entre 0.4 a 2nm. O tamanho do diâmetro depende da temperatura ao qual foi sintetizado, sendo que a temperaturas mais elevadas corresponde um aumento do diâmetro. Os MWCNTs são formados por várias camadas cilíndricas, em que os diâmetros podem variar entre 1-3 nm para camadas interiores, e 2-100 nm para os cilindros exteriores.<sup>7</sup>

No direcionamento da terapêutica, os SWCNTs apresentam uma maior eficiência, devido à sua estrutura mono-dimensional e à sua grande área de superfície. Foi também demonstrado que fármacos antitumorais complexados a SWCNTs apresentam um tempo em circulação superior, em comparação ao fármaco livre. Conseqüentemente, favorecem o uptake do fármaco por parte das células tumorais, tendo em conta que a permeabilidade e a capacidade de retenção destas células se encontram aumentadas.<sup>8</sup>

#### **4.1.4. Nanopartículas magnéticas**

Este tipo de nanopartículas começou a surgir nas últimas duas décadas, e apresenta potencialidades no tratamento de tumores e na área da imagiologia. É sobretudo na área de imagiologia, nomeadamente como agentes de contraste em ressonâncias magnéticas (MRI), que a sua aplicação tem sido mais estudada.<sup>103</sup>

São normalmente cristais de magnetina (mineral magnético formado pelos óxidos de ferro II e III) com um tamanho entre 5-20 nm de diâmetro. Permitem um direcionamento seletivo e eficaz da terapêutica e têm também uma função importante como agentes de diagnóstico, através da utilização de um campo magnético externo. A sua aplicação *in vivo* é feita por via endovenosa, e é criado na zona alvo um campo magnético externo, através de um magneto. Uma vez em circulação, e sob o efeito do campo magnético criado, as nanopartículas são atraídas para a zona pretendida.<sup>104</sup>

Relativamente a outros sistemas de direcionamento, este apresenta algumas vantagens, como a segurança, a versatilidade e a resposta eficaz ao campo magnético aplicado. São utilizadas há mais de uma década como agentes de contraste, estando assim bem estudadas e com a segurança demonstrada. Existem vários estudos acerca da utilização de nanopartículas magnéticas, que através das suas propriedades de contraste podem ser monitorizadas, e pode ser verificada a sua distribuição no organismo.<sup>104</sup>

Por outro lado, são compatíveis com um grande espectro de fármacos e moléculas, o que permite a sua utilização com vários compostos. Os folatos são ligandos que podem ser utilizados para complementar o direcionamento destas nanopartículas, devido ao aumento do *uptake* de folatos pelas células tumorais.<sup>105,106</sup>

No entanto, existem aspetos relacionados com estas nanopartículas que devem ser otimizados de forma a melhorar a terapêutica. Um parâmetro a ser melhorado é o magneto, otimizando a força do campo magnético criado bem como a sua localização.<sup>104</sup>

#### **4.1.5. Nanopartículas lipídicas sólidas**

As nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) são semelhantes a emulsões do tipo O/A, em que o óleo é substituído por um lípido que é sólido à temperatura ambiente e corporal e são estabilizadas por um ou mais tensoativos. As SLN podem transportar fármacos hidrofílicos ou lipofílicos, dependendo do método de preparação.<sup>88</sup>

Os lípidos utilizados são normalmente os de cadeia curta, sendo o ácido butírico o mais utilizado. O ácido butírico é um componente natural, e intervém em vários processos fisiopatológicos, como a alteração da estrutura cromossómica, a inibição do crescimento celular e a indução da diferenciação e apoptose celular. No entanto, os mecanismos de ação do ácido butírico ainda não bem conhecidos.<sup>107</sup>

Um grupo de investigadores formulou SLNs constituídos por colesteril-butilato, e doxorubicina ou paclitaxel e avaliaram a sua atividade anti proliferativa em linhas celulares tumorais, HT-28 (cancro do colon retal). Os resultados demonstraram uma maior citotoxicidade em comparação com o fármaco livre, explicados pela ocorrência de um efeito sinérgico.<sup>107</sup>

#### **4.1.6. Nanopartículas virais**

Existem também vírus, como os parvovirus caninos, que têm uma afinidade natural para recetores que são sobreexpressos nas células tumorais, como por exemplo os recetores da transferrina. Por outro lado, podem ser adicionadas moléculas seletivas à superfície da cápside dos vírus, como anticorpos monoclonais, a transferrina e o ácido fólico, através de processos químicos ou genéticos, que conferem à partícula viral afinidade para um determinado local no organismo.<sup>84</sup>

## **4.2. Princípios para a vetorização**

---

Conhecendo os vários mecanismos implicados no desenvolvimento de tumores e na sua propagação, é possível tentar desenhar estratégias que sejam direcionadas para essas vias. Aliando estes conhecimentos a novas tecnologias, nomeadamente à nanotecnologia, o ser humano tem na sua posse uma “arma” com grande potencial.

Apesar da grande versatilidade dos fármacos disponíveis, o seu uso clínico ainda está longe daquilo que se pretende. A eficácia do tratamento é muitas vezes contrabalançada com distribuição não seletiva e ao mesmo tempo com a falta de especificidade para o tecido tumoral. Esta falta de especificidade e seletividade tem como consequência efeitos adversos, como perda de cabelo, neuropatia sensorial, diarreia, náuseas, vômitos, mielosupressão, neutropenia, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade.

Idealmente, favorecendo a acumulação do fármaco junto local alvo, há uma diminuição da exposição sistémica ao mesmo, diminuindo os efeitos adversos, e sobretudo aumentando a eficácia do tratamento. Neste sentido, começa a surgir o conceito de vetorização da terapêutica, ou terapêutica direcionada.

Os sistemas nanoparticulados surgem como os principais candidatos para a vetorização dos fármacos, uma vez que têm características vantajosas, já mencionadas no capítulo anterior. As nanopartículas têm um tempo de semivida prolongado e uma degradação moderada, permitindo que o fármaco tenha tempo de alcançar o tecido pretendido. Por outro lado, para a obtenção destas características, há parâmetros como o tamanho da partícula, a natureza da superfície, o arranjo espacial, e composição dos monómeros, bem como o peso molecular, que têm de ser manipulados e controlados para obter as características farmacocinéticas desejadas.<sup>108</sup>

Como já foi referido, um dos principais objetivos da vetorização dos fármacos é aumentar a concentração terapêutica no local do tecido tumoral. Esta vetorização, através dos sistemas nanoparticulados, pode ocorrer por um mecanismo de vetorização passiva ou ativa.<sup>109</sup>

#### **4.2.1. Vetorização passiva mediada pelo efeito EPR**

---

O fenómeno EPR (permeabilidade e retenção potenciada) foi inicialmente descrito por Maeda, e é considerado um ponto fundamental para a terapêutica vetorizada antitumoral, pois é uma característica específica dos tumores sólidos. Maeda identificou que a maioria dos tumores sólidos apresentava elevadas concentrações de fatores de permeabilidade vascular, como a bradicinina e o óxido nítrico.<sup>110</sup> Por outro lado, a retenção também se encontra aumentada e as partículas de baixo peso molecular que não ficam na célula, retornam à corrente sanguínea por difusão.<sup>108</sup>

Tendo em conta a velocidade de proliferação das células tumorais e da formação de novos vasos sanguíneos, sabe-se que a nova vascularização apresenta deficiências na permeabilidade (figura 7), permitindo a difusão para as células tumorais de macromoléculas e nanopartículas. No entanto, o efeito EPR não é suficiente para uma acumulação efetiva de moléculas de baixo peso molecular junto do local tumoral.<sup>109,110</sup>

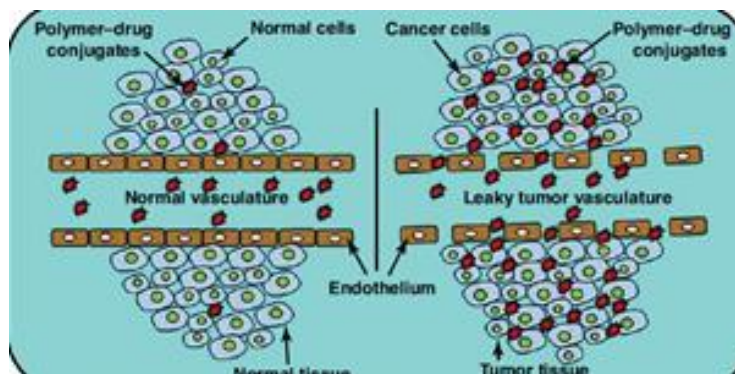


Figura 4.2 - Comparação entre a vascularização num tecido normal com um tecido tumoral. No tecido normal há a existência de junções, impedindo que o conjugado extravase. No tecido tumoral, ocorrem malformações na vascularização, que permitem o extravasamento do conjugado, aumentando a permeabilidade e a retenção.<sup>88</sup>

## 4.2.2. Vetorização ativa

Apesar das características das nanopartículas poderem ser otimizadas, a sua acumulação no local do tumor mediada pelo efeito EPR, é sobretudo no fluido intersticial ou em TAM (tumores associados a macrófagos), não conferindo a concentração necessária no interior das células tumorais. Deste modo, há a necessidade de vetorizar as nanopartículas com o fármaco, utilizando ligandos que ao interagir com os respetivos recetores vão desencadear a internalização.<sup>111</sup>

A vetorização tem como base o facto de que os vários tipos de células que constituem a massa tumoral possuem marcadores moleculares específicos, que permitem a distinção entre as células tumorais e as células normais. Esse tipo de marcadores ou estão ausentes nas células normais, ou são expressos em quantidades muito inferiores.

Os marcadores tumorais são moléculas ou componentes das células que se encontram alterados, e podem ser genes mutados, ARN, proteínas, lípidos ou mesmo metabolitos moleculares.<sup>112</sup> Estes marcadores podem ser utilizados para efeitos de diagnóstico e prognóstico, mas é sobretudo na área da terapêutica que são vistos com grandes potencialidades. Com a presença destes marcadores torna-se possível conceber uma terapêutica direcionada, explorando os padrões de expressão destas moléculas. Nos últimos anos, a investigação têm dado prioridade à pesquisa de novos ligandos, com potencialidade para interagir com estes marcadores tumorais.<sup>113</sup>

De uma forma generalizada, o principal pré-requisito para a vetorização da terapêutica é a presença da molécula alvo ou o epítipo tumoral na superfície da célula tumoral. A nível molecular, um parâmetro a ter em conta é a interação entre o ligando e

a molécula-alvo. A interação é altamente dependente da afinidade e da seletividade do ligando pelo recetor.<sup>114</sup> Os recetores ou moléculas-alvo são expressas nas células em concentrações variáveis, sendo que o número de recetores e a sua disponibilidade limita a quantidade de ligandos que podem interagir com a célula tumoral. Quando se atinge o ponto de saturação, a especificidade diminui e conseqüentemente a eficácia da vetorização também.<sup>115</sup>

Os ligandos escolhidos para a vetorização das nanopartículas têm que ter a capacidade de induzir a internalização do transportador.<sup>111</sup> Esta capacidade de internalização é afetada pela natureza da interação entre o ligando e a molécula-alvo. Se a afinidade entre ambos for baixa, a estratégia de vetorização fica comprometida e dificultada. No entanto, as nanopartículas apresentam um caráter multivalente para a ligação a outras moléculas, que pode ocorrer a partir dos ligandos ou através da densidade de superfície da própria nanopartícula.<sup>114</sup> Esta característica aumenta a variedade de ligandos disponíveis, permitindo a utilização de moléculas com menor afinidade, como alguns péptidos.<sup>116,117</sup> Embora, esta capacidade de ligação seja uma vantagem, um aumento da densidade aumenta a probabilidade das nanopartículas serem reconhecidas e eliminadas através do sistema mononuclear fagocitário, diminuindo portanto a eficácia da vetorização.<sup>114</sup> Ligandos de alta densidade apresentam também como desvantagem, quando incorporados em nanopartículas poliméricas, nomeadamente com cadeias de PEG, o facto de anularem o seu efeito protetor contra o sistema reticular endotelial (RES).<sup>118</sup>

Gu *et al.* estudou a situação acima mencionada, investigando *in vivo* a biodistribuição de aptameros com vários ligandos, no local do tumor e a eliminação pelo sistema imunitário. O autor desenvolveu uma série de ensaios em que alterava a densidade dos ligandos, aumentando-a, e que inversamente diminuía a exposição do polímero PEG. De facto, verificou que ao aumentar a densidade dos ligandos, aumentava a concentração de nanopartículas do fígado e no baço, uma vez que mascarava a camada de PEG, e diminuía a capacidade protetora.<sup>118</sup>

O processo de internalização aumenta o *uptake* celular do transportador, favorecendo a concentração de fármaco no interior da célula tumoral em relação ao fluido intersticial. Bartlett e Kirpotin demonstraram que, embora tanto os transportadores vetorizados como os não vetorizados apresentassem uma biodistribuição semelhante no local do tumor, a atividade antitumoral mais efetiva estava associada aos transportadores vetorizados.<sup>111,119</sup>

Debotton *et al.* trabalhou com nanopartículas associadas anticorpos monoclonais (MAb), e comparou-as a nanopartículas não vetorizadas. Os resultados obtidos, foram concordantes com os de outros autores, verificando-se que o comportamento farmacocinético das nanopartículas não era alterado, para ambos os casos. Ele sugeriu que ao conjugar-se o MAb com a nanopartícula, as propriedades farmacocinéticas intrínsecas dos MAb eram alteradas, e este adquiria o comportamento do nanotransportador.<sup>120</sup>

Deste modo, a otimização da internalização constitui um fator chave para o desenvolvimento das terapêuticas vetorizadas, através de sistemas nanoparticulados.

Os sistemas nanoparticulados para uma vetorização eficaz devem ser constituídos por cinco componentes base:

- Esqueleto polimérico;
- “Escudo” superficial, que diminui a opsonização do transportador e aumento o tempo de circulação. Normalmente um polímero hidrofílico (PEG).
- Ligando, que se vai ligar ao epítipo sobreexpresso na célula tumoral.
- Molécula de ligação ou grupo funcional, para a ligação entre o transportador e o ligando.
- Fármaco ou meio de diagnóstico (imagiologia).<sup>109</sup>

A modificação química dos nanotransportadores com polímeros sintéticos, como o PEG, foi inicialmente sugerida para os lipossomas, mas hoje em dia já se aplica a outros sistemas nanoparticulados, com o objetivo de prolongar a semivida do transportador.<sup>121</sup>

As cadeias de PEG, devido ao arranjo espacial, impedem a interação entre os componentes do sangue e a superfície das nanopartículas, e reduzem a ligação das proteínas plasmáticas às mesmas. Esta característica permite a diminuição da interação entre as opsoninas e consequentemente uma menor eliminação pelo RES. A diminuição da opsonização é justificada pela proteção da superfície da nanopartícula, que provoca um aumento do carácter hidrofílico da superfície, potenciando interações repulsivas entre os componentes sanguíneos e as nanopartículas revestidas com PEG.<sup>122,123</sup>

A conjugação entre os ligandos e o nanossistema pode ocorrer através de ligação covalentes, ou ligações não covalentes. Entre as formas de ligação não covalente mais investigadas encontram-se a adsorção e os complexos biotina-avidina. A adsorção dos

ligandos à superfície do transportador não é o método de conjugação ideal, devido à substituição competitiva por elementos presentes na corrente sanguínea.<sup>124</sup> Os complexos biotina-avidina apresentam uma interação não covalente bastante forte, no entanto a avidina tem uma origem bacteriana, logo o seu potencial imunogénico limita a sua utilização.<sup>125</sup> Considerando estes factos, pode afirmar-se que existe uma preferência para que a conjugação entre o ligando e o nanossistema seja feita através de ligações covalentes. As duas formas mais comuns são as ligações amida e tioéster.<sup>109</sup>

### 4.3. Estratégias de vetorização

---

A escolha do tipo de ligando tem por base, idealmente, características como a facilidade de produção, a variabilidade, a afinidade, o método de conjugação com o transportador, a imunogenicidade e o custo.<sup>109</sup>

Inicialmente, a vetorização era fortemente associada aos MAb. Eram os ligandos mais utilizados para a vetorização dos sistemas nanoparticulados. No entanto, com a evolução dos trabalhos de investigação o repertório de possíveis ligandos foi aumentado, e atualmente qualquer ligando se pode conjugar com o transportador, podendo assim ser utilizado para a vetorização da terapêutica. Alguns exemplos de ligandos são frações de anticorpos, pequenos péptidos, aptameros, oligossacáridos, ou mesmo pequenas moléculas que possam reconhecer um alvo específico na superfície celular.<sup>126-128</sup>

Os MAb são macromoléculas, normalmente com peso molecular cerca de 150 kDa, e com uma elevada especificidade e afinidade para as moléculas alvo. A utilização de fragmentos de anticorpos (Fab) e fragmentos de cadeia simples variável (ScFv), *affibodies* e péptidos têm como desvantagem o carácter imunogénico, levantando algumas complicações. Os ScFv resultam da conjugação entre porções da zona variável da cadeia pesada e da leve do anticorpo, ligadas por intermédio de um péptido constituído por aproximadamente 10-25 aminoácidos. Os *affibodies* são moléculas proteicas constituídas por 58 aminoácidos, arrançados em três domínios, com um peso molecular de 6-15kDa. O seu peso molecular, juntamente com a alta afinidade para os receptores, permitem a penetração no tecido tumoral. No entanto, têm um tempo de semivida curto, tornando-os excelentes agentes de imagiologia, mas limitando a sua capacidade na vetorização do tratamento, onde um tempo de semivida mais elevado é um requisito.<sup>129</sup>

A utilização de péptidos como ligandos apresenta vantagens em relação aos referidos anteriormente, em relação ao peso molecular, cerca de 1 kDa, que confere uma grande capacidade de penetração nas células tumorais, a ausência de imunogenicidade, produção fácil e grande flexibilidade para nos processos de conjugação.<sup>129</sup> Como ponto negativo, surge em muitos casos, como tendo menor afinidade para os recetores alvo, relativamente aos MAb.<sup>109</sup>

Outro tipo de ligandos que surgiram devido às contrariedades impostas pelos anteriores são os aptameros. São cadeias simples e curtas de ácidos nucleicos, oligonucleótidos de ADN ou ARN (ssADN ou ssARN), com um arranjo tridimensional e com a capacidade de se ligar com elevada afinidade e especificidade a marcadores ou moléculas alvo presentes na superfície das células. Apresentam como vantagens o baixo peso molecular e a falta de imunogenicidade.<sup>130</sup>

As alterações provocadas pela oncogénese resultam na expressão anormal de marcadores nas células tumorais, bem como a nível hematológico e relacionados com a angiogénese. A vetorização da terapêutica deve ser adaptada à situação em causa de forma a obter-se os melhores resultados possíveis. Desta forma a terapêutica pode ser vetorizada para um conjunto variado de recetores.

### **4.3.1. Vetorização para as células tumorais**

---

#### **1. Recetores Tirosina Cinase**

Os recetores tirosina cinase são fundamentais na sinalização dos processos celular, como a proliferação, metabolismo, diferenciação, sobrevivência, entre outros. Numa célula normal, estes recetores são altamente regulados, mas a sua desregulação está relacionada com o desenvolvimento e progressão das neoplasias.<sup>131</sup>

A família de recetores ErbB/HER, à qual pertencem os recetores HER2 e o EGFR (recetor do fator de crescimento epitelial), ambos recetores tirosina cinase, são expressos em concentrações superiores, em vários tipos de cancro. Estes recetores são glicoproteínas transmembranares, ou seja, possuem um domínio extracelular, onde interagem com o ligando específico, normalmente fatores de crescimento, e um domínio intracelular enzimático associado à tirosina cinase.<sup>131</sup>

##### **a. HER2**

As neoplasias onde o HER2 é sobreexpresso são caracterizadas por um baixo prognóstico clínico, significando um comportamento agressivo do tumor. O HER2 é

encontrado com níveis elevados de expressão em vários tipos de cancro, sendo por esta razão, um dos recetores mais utilizados para a vetorização.<sup>132</sup>

Uma das estratégias na vetorização deste recetor está relacionada com o seu domínio extracelular, através de MAb, evitando a dimerização do HER2. O transtuzumab, também conhecido como Herceptina, é um MAb desenhado especificamente para o HER2, antagonizando o recetor. Foi aprovado em 1998, para a utilização no cancro da mama metastático, com elevada expressão de antígenos HER2. Outra forma de modular o HER2, pode ser através de pequenas moléculas, como oligonucleótidos, inibindo a fosforilação do domínio intracelular do recetor, onde se encontra a tirosina cinase.<sup>133</sup>

Steinhauser *et al.* obteve nos seus trabalhos resultados positivos ao trabalhar com nanopartículas de albumina humana ligadas covalentemente ao transtuzumab na vetorização para o HER2. O MAb foi conjugado com a nanopartícula através de uma ligação tioéster, após estudos de otimização da ligação. O complexo nanopartícula-Mab mostrou especificidade para as células que sobreexpressavam HER2, e induziam a endocitose, favorecendo o *uptake* celular.<sup>134</sup>

Anhorn *et al.* trabalhou também com nanopartículas baseadas em albumina humana com MAb na sua superfície, carregadas com doxorrubicina. O transporte específico do citostático para as células tumorais que sobreexpressavam HER2, a sua libertação e a sua atividade biológica foram demonstradas. Este foi o primeiro estudo a demonstrar a vetorização para as células tumorais com sobreexpressão de HER2, através de nanopartículas-MAb carregadas com doxorrubicina.<sup>135</sup>

Outras metodologias foram estudadas, como a conjugação de transtuzumab com polímeros sintéticos, demonstrada por Sun, em que, em ensaios *in vitro* demonstrou a vetorização e a internalização em células de cancro da mama.<sup>136</sup> Debotton utilizou uma metodologia semelhante, com nanopartículas funcionalizadas com PEG, PLA e com maleimida. A eficácia das nanopartículas vetorizadas com o transtuzumab foi mais uma vez demonstrada em células de cancro da próstata metastático, quando comparada com nanopartículas não vetorizadas.<sup>120</sup>

Gao *et al.* comparou a vetorização da imunotoxina PE38KDEL através de nanopartículas funcionalizadas com PLA, com a vetorização do PE38KDEL conjugado apenas com Fab anti-HER2. Os resultados mostraram que havia vantagem na encapsulação das moléculas farmacológicas em nanopartículas poliméricas.<sup>137</sup>

## **b. EGFR**

Tal como o recetor HER2, o EGFR também é um recetor transmembranar, pertencente à família HER. Este recetor tirosina cinase e os seus ligandos tornaram-se um alvo da investigação no âmbito da terapêutica através da utilização de MAb's direcionados para o domínio extracelular, e pequenas moléculas para o domínio intracelular.<sup>109</sup>

A expressão desregulada deste recetor em células tumorais é um fenómeno bem conhecido e já demonstrado em vários tipos de cancro, tais como, da mama, da próstata, dos ovários e da bexiga.<sup>138,139</sup> Os ligandos mais estudados para este recetor são o EGF (fator de crescimento epitelial), anticorpos anti-EGF (Cetuximab, Erbitux®), Fab's, e péptidos específicos.<sup>140</sup>

Acharya *et al.* preparou um sistema nanoparticulado utilizando PLGA e um anticorpo anti-EGFR, e carregou-o com rapamicina. O estudo foi realizado em linhas celulares de cancro da mama (MCF7) e, através do ensaio MTT, foi determinado o IC50, verificando-se que o efeito citotóxico do sistema nanoparticulado era superior relativamente ao fármaco apenas encapsulado nas nanopartículas. A atividade antiproliferativa traduziu-se por um aumento do *uptake* das células, impedindo o ciclo celular e induzindo a apoptose.<sup>141</sup>

Uma abordagem um pouco diferente foi apresentada por Yu *et al.*, em que foi explorada a terapia fototermal, a qual não requer metodologias invasivas para o tratamento do cancro. A terapia fototermal consiste na utilização de moléculas com a capacidade de gerar calor quando irradiadas por infravermelhos, causando a destruição das células. Neste estudo foi utilizada uma molécula, a indocianina verde (ICG), encapsulada em nanopartículas revestidas com anticorpo anti-EGFR e foi avaliada a capacidade de vetorização do sistema para células tumorais com diferentes níveis de expressão de EGFR, bem como o efeito fototermal da ICG presente nas células tumorais. Os dados obtidos revelaram uma toxicidade termal significativa para as partículas encapsuladas relativamente às partículas isoladas de ICG.<sup>142</sup>

O cancro do pulmão é muito comum, e é um dos cancros mais agressivos. Tseng *et al.* desenvolveu um sistema baseado em nanopartículas de gelatina de forma a direccionar a terapêutica para as células tumorais no pulmão. O sistema é composto por nanopartículas de gelatina, revestidas por um composto derivado da avidina ao qual é acoplado o EGF (fator de crescimento epitelial) e a administração é realizada sob a

forma de aerossol. Os resultados mostraram a ausência de inflamação aguda do pulmão posterior à inalação, e através da análise por fluorescência verificou-se que o sistema se distribuiu principalmente nos pulmões. Por outro lado, a acumulação do sistema nanoparticulado foi mais baixa nos pulmões normais, mostrando que este sistema foi eficaz na vetorização de células tumorais que sobreexpressam o EGFR.<sup>143</sup> Normalmente a terapêutica direcionada através de nanopartículas é discutida num contexto de administração sistémica, no entanto, estes dados sugerem que a administração local também tem um grande potencial para a vetorização dos fármacos.<sup>109</sup>

A capacidade de vetorização de genes foi avaliada, através de um estudo num cancro pancreático, onde o EGFR também é sobreexpresso. Neste trabalho foi conjugado um péptido específico para o EGFR com um sistema nanoparticulado à base de gelatina (GENS) e foi incorporado um plasmídeo, que codifica uma proteína fluorescente (EGFPN1). As células tumorais expressaram a proteína de uma forma significativa, comprovando a potencialidade desta metodologia para a vetorização de genes, abrindo novos horizontes para a terapia génica.<sup>144</sup>

## **2. Recetores Transferrina**

O recetor da transferrina (TfR) é uma glicoproteína transmembranar com um peso molecular de 180kDa, e é altamente sobreexpresso em vários tipos de cancro. Tem como ligando específico a transferrina (Tf), formada por uma molécula circulante, a apotransferrina, que se liga posteriormente ao ião ferro. Quando ocorre a interação entre a transferrina e o recetor, ocorre a internalização, e posteriormente a libertação do ião ferro no espaço intracelular.<sup>145</sup>

Um estudo realizado por Krishna *et al.* demonstrou a especificidade e a eficácia de nanopartículas de apotransferrina na vetorização do fármaco doxorubicina para células tumorais hepáticas. Foram preparados dois sistemas nanoparticulados, um em que a apotransferrina foi conjugada com a doxorubicina e outro em que a doxorubicina foi encapsulada no interior da nanopartícula. Ensaios de competição com anticorpos específicos do TfR, mostraram que ambos os sistemas entraram nas células através do TfR, por endocitose. No entanto o sistema no qual o fármaco foi encapsulado, demonstrou melhores resultados no *uptake* celular e nos parâmetros farmacocinéticos, nomeadamente na libertação do fármaco e na localização do local do tumor. Após a

administração, este sistema também foi encontrado em menores concentrações em órgãos como o coração, rins e baço. Desta forma, este trabalho mostrou que o sistema nanoparticulado de apotransferrina com o fármaco encapsulado, induziu significativamente a regressão do tumor num modelo de ratinhos com cancro hepático, apresentando baixa toxicidade.<sup>129</sup>

Zheng *et al.* estudou a vetorização de um inibidor da aromatase através de um sistema nanoparticulado de PLGA, em células do cancro da mama. A atividade do inibidor da aromatase foi avaliada e constatou-se que a IC50 para o sistema nanoparticulado associado à Tf era cerca de metade, relativamente ao sistema sem Tf. Desta forma, esta diferença foi explicada pela presença da Tf, como tendo um papel fundamental no *uptake* celular.<sup>146</sup>

Num outro tipo de abordagem, Sundaram *et al.* mostrou a capacidade de sistemas nanoparticulados de PLGA funcionalizados com Tf no aumento da permeabilidade da membrana nasal e na vetorização de plasmídeos contendo genes supressores do VEGF. As nanopartículas funcionalizadas demonstraram uma eficiência na transfeção e uma inibição significativa do VEGF, relativamente às nanopartículas não funcionalizadas. O estudo mostrou a potencialidade dos sistemas nanoparticulados na vetorização de plasmídeos, no aumento do transporte através do epitélio nasal e na terapia génica, em células alvo.<sup>147</sup>

Recentemente (2010) foi publicado o primeiro estudo em humanos de ensaios clínicos em primeira fase, baseados em sistemas de administração de moléculas de ARN de pequena interferência (siARN), utilizando nanossistemas para a vetorização das mesmas para células tumorais. Os nanossistemas utilizados foram nanopartículas baseadas em ciclodextrina com PEG, funcionalizadas com a proteína Tf. Este estudo demonstrou, através de biópsia ao tecido tumoral, a presença intracelular de nanopartículas em quantidades que se correlacionam com os níveis de nanopartículas administrados e foi demonstrada, uma diminuição de ambos, ARN e a proteína, do alvo que é o RRM2 (subunidade M2 da redutase de ribonucleótidos), em relação aos níveis iniciais antes do tratamento.<sup>148</sup>

### **3. Recetor do folato**

O recetor do folato (FR) é outro marcador muito estudado nesta área da vetorização da terapêutica. É um recetor que se encontra em pequenas quantidades nas

células normais, mas que é expresso em elevada quantidade em situações malignas, como cancro dos ovários, uterino, do pulmão, e da mama.<sup>149</sup> Estruturalmente, este recetor é uma glicoproteína ligada à membrana por intermédio do glicosilfosfatidilinositol (GPI), com um peso molecular de cerca de 38-40kDa. O ligando correspondente é o ácido fólico (FA), também designado de folato, o qual possui características ideais para a utilização na terapêutica vetorizada, como um tamanho pequeno, alta afinidade para o FR, ausência de imunogenicidade, estabilidade e baixo custo.<sup>150,151</sup>

Estudos com este recetor reportaram a existência de um mecanismo diferente para o transporte de moléculas de pequenas dimensões, que embora se assemelhe à endocitose, apresenta diferenças. O processo é designado por potocitose e está representado na figura 8. Este mecanismo, ao contrário da endocitose não forma endossomas, utiliza umas estruturas denominadas de *caveolae*, semelhantes a umas cavidades na membrana, que juntamente com o GPI concentram as moléculas no local.<sup>152</sup>

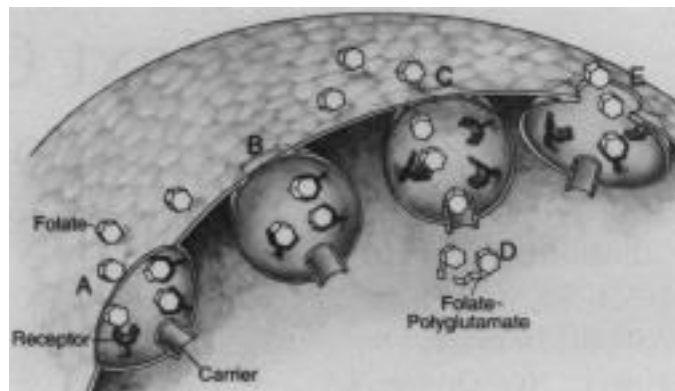


Figura 4.3 - Representação do uptake celular de FA, mediado por potocitose. As caveolae tem no seu interior recetores aos quais o FA se vai ligar quando o compartimento está aberto. Posteriormente, as caveolae encerram, gerando-se um gradiente que resulta na libertação do FA do FR. A elevada concentração de FA presente nas caveolae cria novamente um gradiente que favorece o movimento do FA para o espaço intracelular, através do transportador aniónico. Finalmente a caveolae abre novamente, seguindo-se um novo ciclo.<sup>19</sup>

Recentemente, um estudo desenvolveu um nanossistema, baseado em nanopartículas de hidroxipropil-quitosano conjugado com FA, no qual foram encapsulados oligodeoxinucleótidos *antisense* (asODNs). O sistema foi desenvolvido com o objetivo de diminuir a produção da proteína P-gp, de forma a ultrapassar um dos principais problemas da resistência a fármacos, e ao mesmo tempo relacionar a diminuição da glicoproteína, com o efeito da doxorrubicina. Para tal, foi posteriormente administrada a doxorrubicina. Os resultados do estudo demonstraram uma inibição do crescimento do tumor de 35% na utilização do nanossistema comparativamente à

administração apenas dos asODNs. Os níveis de P-gp, bem como a expressão dos genes MDR1 diminuíram, aumentando a eficácia antitumoral da doxorubicina.<sup>153</sup>

A vetorização da terapêutica e seu seguimento continua a ser um grande desafio. Santra desenvolveu um nanossistema, de forma a administrar uma proteína indutora da apoptose (citocromo c) e ao mesmo tempo uma sonda de infravermelho próximo (NIR). Esta sonda vai permitir a monitorização do tratamento *in vivo*, contribuindo para a teragnóstica, entrando assim numa nova área da terapêutica. As nanopartículas poliméricas foram obtidas a partir de um polímero solúvel polihidroxil com várias ramificações, que permite uma dupla encapsulação, de uma proteína hidrofílica e uma sonda fluorescente anfifílica. A vetorização das nanopartículas foi conseguida através da conjugação com moléculas de FA. O potencial terapêutico deste nanossistema foi demonstrado através da indução da apoptose em células tumorais com expressão elevada do FR, relativamente a células onde o FR se encontrava ausente. Este estudo representa um avanço significativo para esta área, pois esta metodologia contribui para a monitorização da regressão tumoral.<sup>154</sup>

Uma metodologia completamente diferente das anteriormente apresentadas foi sugerida por Narayanan. Utilizou a vetorização de nanopartículas, específicas para o FR, para o transporte de extrato de semente de uva. Este nutracêutico, um produto natural com funções farmacológicas, mostrou um efeito antiproliferativo e um aumento do índice de apoptose em células que expressavam o FR.<sup>155</sup>

#### **4. PSMA – Antígeno de membrana específico da próstata**

O PSMA é uma proteína membrana, que normalmente é expressa em quantidades superiores na presença de cancro da próstata, bem como na angiogénese associada a tumores.<sup>156</sup>

O gene do PSMA é sujeito a um splicing alternativo, originando uma variante de PSMA'. Esta variante difere da *wild type*, no tamanho do cADN, que tem menos 266 nucleótidos, sendo que nesta região ausente estão localizados os codões de iniciação da transdução e codões do domínio transmembranar do antígeno. Deste modo a proteína traduzida não apresenta qualquer tipo de sinalização. Foi detetado nas células normais um maior nível de PSMA' relativamente ao PSMA, e em contraste em células malignas da próstata, a situação inverte-se, sendo número de PSMA mais elevado. Estes dados são importantes na identificação e monitorização da progressão do tumor.<sup>157</sup>

A maioria das estratégias utilizadas para a vetorização da terapêutica para o PSMA é através de nanossistemas conjugados com aptameros. No entanto existem também estudos realizados, nos quais foram utilizados anticorpos anti-PSMA associados a nanopartículas e dendrímeros.<sup>158,159</sup>

A utilização da cisplatina no tratamento de tumores é limitada pela elevada toxicidade e pelo aparecimento de resistência. Dhar elaborou nanopartículas funcionalizadas com PGLA e PEG, associadas a aptameros específicos do PSMA, nas quais encapsulou o composto de platina IV. A sua libertação, após redução, resulta na formação da cisplatina, que se liga ao ADN das células formando aductos, impedindo a replicação do mesmo. A formação destes aductos foi confirmada através da utilização de MAb's específicos. O efeito citotóxico foi avaliado e comparado com a administração do fármaco na forma livre, obtendo uma eficácia muito superior no tratamento com o nanossistema.<sup>160</sup>

Um outro tipo de nanossistema, são os nano-conjugados. Tong produziu nano-conjugados de paclitaxel e PLA, para a vetorização do citotóxico para células tumorais da próstata. A vetorização foi conseguida através da utilização de aptameros e mostrou ser eficaz segundo os dados apresentados pelo autor. No entanto, o principal desafio de Tong foi a preparação do nano-conjugado, para que a formulação sólida do nanossistema não formasse agregados, após os processos de liofilização. Analisou uma variedade de lioprotetores, tendo encontrado a albumina como um excelente lioprotetor, permitindo uma dispersão instantânea do nano-conjugado em solução.<sup>161</sup>

Os marcadores e epítomos acima abordados são geralmente os mais estudados e explorados na vetorização de fármacos no tratamento do cancro. No entanto existem outros antigénios associados a oncogénese que podem ser utilizados para a vetorização através de nanossistemas.

## **5. Outros marcadores**

### ***a. Ferritina***

Debotton *et al.* explorou a vetorização de um derivado lipofílico do paclitaxel, no tratamento de cancro no pulmão, através de nanopartículas de PLA e PEG conjugadas a um MAb para a ferritina H, o AMB8LK. A ferritina H é uma das subunidades da ferritina, tem um peso molecular de cerca de 21kDa, e por vezes encontra-se sobreexpressada em alguns tipos de cancro. A sua sequência apresenta cerca de 50% de

homologia relativamente à da subunidade L. O fármaco foi encapsulado e o seu efeito citotóxico foi avaliado verificando-se um maior efeito para as nanopartículas com o MAb em relação às nanopartículas sem MAb e a uma solução de palmitato de paclitaxel. Outro dado importante retirado deste trabalho foi ausência de alterações a nível da afinidade entre o AMB8LK conjugado à nanopartícula e a ferritina H, relativamente ao AMB8LK livre.<sup>162</sup>

### ***b. Molécula de adesão celular epitelial (EpCAM)***

A molécula de adesão celular epitelial (EpCAM) é uma glicoproteína transmembranar com um peso molecular de cerca de 30-40kDa, que é expresso no tecido epitelial e tem funções no mecanismo de adesão celular. Desempenha funções de sinalização nas vias de crescimento e proliferação celular, sendo por isso um alvo para a terapêutica, através da vetorização com anticorpos e outros conjugados. Na membrana celular pode formar complexos com outras moléculas, o que limita o número de epítomos disponíveis para a vetorização, com anticorpos.<sup>163,164</sup>

Esta molécula é expressa de uma forma elevada em tumores e metástases da maioria de malignizações do tecido epitelial. Encontra-se frequentemente em tumores epiteliais, em células estaminais cancerígenas e em células tumorais que circulam no organismo. As células estaminais cancerígenas têm a capacidade de alterar os processos normais da divisão celular e originar o aparecimento de células diferentes da célula progenitora, contribuindo para a heterogeneidade do tumor.<sup>165</sup>

A utilização de anticorpos anti-EpCAM é frequente em metodologias de vetorização para células que expressam esta molécula. A conjugação de scFv anti-EpCAM, o 4D5MOCB, a lipossomas revestidos com PEG, onde se encapsulou o citotóxico doxorubicina, foi utilizada num modelo *in vivo* de ratinhos com cancro do colon. Os parâmetros farmacocinéticos foram estudados, verificando-se um tempo de semi-vida de 11h e uma distribuição elevada junto do local do tecido tumoral. Também foi notada uma regressão na progressão do tumor. No entanto, os lipossomas não conjugados ao 4D5MOCB também mostraram uma distribuição e eficácia elevada, que foi explicada pelo efeito EPR.<sup>129</sup>

Outras metodologias foram já desenvolvidas de vetorização para esta molécula, tendo por base nanopartículas de PLGA e carregadas com paclitaxel, no tratamento de retinoblastoma. A vetorização foi conseguida através da conjugação com anticorpos anti-EpCAM. Os resultados a nível da proliferação celular mostraram uma maior

especificidade para as nanopartículas conjugadas com o anticorpo. No entanto, não houve diferenças significativas entre o *uptake* celular em moléculas com ou sem EpCAM. Este fenómeno foi justificado pelo impedimento estérico provocado pelo tamanho das partículas ou pela redução da afinidade do anticorpo pelo EpCAM após o processo de conjugação.<sup>166</sup>

Muitas outras metodologias de vetorização para a molecula EpCAM encontram-se ainda em desenvolvimentos pré-clínicos. Apesar dos resultados promissores, apenas uma metodologia, em que se utiliza o anticorpo catumaxomab, foi aprovada e encontra-se em ensaios clínicos.<sup>167</sup>

Uma grande diversidade de outros epítomos há ainda por explorar, na procura de novas e cada vez melhores metodologias de vetorização das células tumorais.

## 4.4. Vetorização para o sistema vascular tumoral

---

Como já foi referido anteriormente, a angiogénese é um processo fundamental para o crescimento e proliferação e um tumor. A metastização a partir de um tumor primário é dependente da criação de novos vasos sanguíneos que suprimam as necessidades do mesmo.<sup>168,169</sup> Este processo resulta uma variação no equilíbrio entre a expressão de indutores da angiogénese, como o VEGF, que aumenta, em contraste com a expressão de inibidores da angiogénese, que diminui.<sup>170,171</sup>

Entre os vários marcadores tumorais angiogénicos estudados, está a integrina  $\alpha\beta3$ . É um recetor para ligandos da matriz extracelular, como a vitronectina, fibronectina, fibrinogénio, e laminina. A grande maioria dos tecidos apresenta baixos níveis de expressão da integrina  $\alpha\beta3$ , no entanto a sua expressão é elevada nas células alteradas epiteliais e do músculo liso principalmente nos vasos sanguíneos tumorais.<sup>172</sup>

O péptido Arg-Gly-Asp (RGD) apresenta alta seletividade para a ligação às integrinas  $\alpha\beta3$  e  $\alpha\beta5$ , sendo por isso utilizado em conjugação com nanossistemas na vetorização de fármacos, genes e até agentes de radioterapia, tanto para as células tumorais, como para os vasos sanguíneos, onde há elevados níveis de expressão de integrinas.<sup>173,174</sup>

Um estudo com nanopartículas de albumina humana, funcionalizadas com anticorpo anti-integrinas, (DI17E6), nas quais se encapsulou Doxorubicina, foi realizado

em células com melanoma. A eficácia da vetorização, bem como do fármaco foi significativamente superior na presença do anticorpo, verificando-se um aumento do *uptake* celular e uma maior citotoxicidade sobre as células com melanoma.<sup>175</sup>

Estudos realizados *in vivo* demonstraram que a vetorização originava um aumento da acumulação de nanopartículas junto ao local do tumor. No entanto, os estudos realizados por Kirpotin mostravam que a vetorização das nanopartículas alterava a capacidade de internalização do fármaco, mais do que a acumulação no local do tecido tumoral.<sup>111</sup> Os dados apresentados foram explicadas através da diferença entre as superfícies dos nanossistemas utilizados. A superfície do nanossistema é também um parâmetro a ter em conta para a otimização da vetorização, como foi já referido anteriormente.<sup>176</sup>

Sundaram *et al.* apresentou uma metodologia muito interessante e que em muito se assemelha às metodologias aplicadas com as terapêuticas convencionais, a terapia combinada. O seu grupo estudou a combinação da vetorização das células tumorais e do sistema vascular, através da utilização de um fármaco, o docetaxel, e um gene anti-VEGF, Flt23k, respetivamente. Formulou dois tipos de nanossistemas, um conjugado deslorelina-docetaxel, vetorizado para os recetores de LHRH (Hormona libertadora da hormona luteinizante), no qual a deslorelina é um agonista. O outro nanossistema formado por nanopartículas com o péptido RGD, no qual se encapsulou o plasmídeo com o gene anti-VEGF, Flt23k. O estudo foi realizado, em ratinhos com cancro do pulmão, e demonstrou-se uma diferença significativa entre os grupos, com a terapia combinada e com a monoterapia. A terapia combinada revelou um maior índice apoptótico, bem como uma maior inibição do crescimento tumoral. Este estudo mostrou mais uma vez, que o tratamento do cancro deve ser baseado em pelo menos fármacos, com efeitos sinérgicos.<sup>177</sup>

Existem outros marcadores da angiogénese como o KDR, também conhecido como VEGFR-2. É um dos principais recetores de ligação do VEGF e um mediador primário no processo da angiogénese. Yu desenvolveu um estudo para a vetorização do paclitaxel através de nanopartículas de aldeído de PEG e PLA, onde encapsulou o fármaco. O péptido K237 é um ligando com alta afinidade e especificidade para o recetor KDR expresso na superfície das células endoteliais nos novos vasos sanguíneos. A ligação do K237 conjugado com as nanopartículas acima mencionadas ao recetor KDR tem um efeito inibitório sobre a via da angiogénese, pois impede a ligação do VEGF. O nanossistema formado é facilmente internalizado através dos recetores KDR,

umentando o *uptake* celular, verificando-se uma diminuição da proliferação, migração e formação de novos vasos, e posteriormente necrose. Este estudo mostra uma nova estratégia de utilização do paclitaxel, na quimioterapia, nomeadamente a nível da inibição da angiogénese.<sup>178</sup>

## 4.5. Outros marcadores associados a tumores

---

O sistema linfático é uma via muito utilizada para a metastização dos tumores. Na zona periférica dos tumores existem uma grande quantidade de vasos linfáticos, embora a drenagem linfática dos tumores seja muito baixa. A vetorização de nanossistemas para o sistema linfático ainda carece de informação devido à falta de marcadores específicos nestes locais. No entanto, é de extrema importância a tentativa de evolução de conhecimentos nesta via, pelo seu papel tão importante na disseminação de metástases.<sup>179</sup>

A vetorização para células hematológicas malignas também é uma área com grande interesse, nomeadamente para o tratamento de leucemias. Para tal, é necessário a utilização de marcadores específicos presentes nas células do sistema imunitário, como por exemplo o CD8, um co-recetor do recetor das células T, ou o LFA-1 (antigénio associado à função leucocitária).<sup>180,181</sup>

## 5. Conclusão

---

A vetorização da terapêutica anticancerígena é um grande passo na procura de um tratamento cada vez mais eficaz e ao mesmo tempo mais seguro para o doente. A tentativa de se atingir uma maior seletividade para as células tumorais, diminuindo desta forma os efeitos dos fármacos citotóxicos noutras células, garante ao doente melhores perspectivas de tratamento, bem como um melhor estado fisiológico e também anímico na luta contra esta doença.

A compreensão dos processos desencadeados pelo cancro, a complexidade dos tecidos tumorais bem como o microambiente estabelecido, são aspetos fundamentais para a formulação e otimização dos nanossistemas.

Os nanossistemas mostraram ser uma mais-valia na otimização na terapia antitumoral, não obstante, ainda não se tem um conhecimento completo acerca da sua

segurança e toxicidade, isto é, os efeitos destes nanossistemas a longo prazo na saúde humana ainda não estão completamente estabelecidos.

Outras dúvidas surgem ainda a propósito dos ligandos. Idealmente, as metodologias apresentadas utilizam ligandos específicos que só deviam interagir com recetores específicos, expressos, preferencialmente, apenas nas células tumorais. No entanto, nas células normais existe sempre um nível basal de expressão desses marcadores tumorais. Por vezes essa expressão pode ser influenciada ou até induzida por outras condições, como por exemplo a inflamação.

Outro aspeto a ter em conta, é o facto de a maioria das metodologias aqui apresentadas terem sido realizadas em modelos animais. Embora, esses animais sejam o mais próximo possível, em termos fisiológicos, dos humanos, não representam com precisão a fisiologia humana, sendo que as conclusões retiradas dos estudos, não podem ser extrapoladas cegamente para os humanos. Desta forma apesar dos resultados pré clínicos apresentarem uma grande potencialidade, os testes clínicos são ainda escassos, e os resultados por vezes imprevisíveis.

## 6. Referências Bibliográficas

---

1. Centers for Disease Control and Prevention. (2012). Cancer Prevention and Control[em linha]. Centers for Disease Control and Prevention. Acedido Setembro, 2013 em <http://www.cdc.gov/>
2. Li, J., Chen, F., Cona, M. M., Feng, Y., Himmelreich, U., Oyen, R., Verbruggen, A., et al. (2012). A review on various targeted anticancer therapies. *Targeted oncology*, 7(1), 69–85.
3. National Cancer Institute. Defining Cancer [em linha]. National Cancer Institute. Acedido Setembro, 2013 em <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>
4. Boyle, P., & Levin, B. (2008). *World cancer report 2008*. France: IARC.
5. American Cancer Society. (2013). Learn about cancer. American Cancer Society[em linha]. Acedido em Agosto, 2013 em <http://www.cancer.org/cancer/index>
6. Utreja P, Jain S, T. A. (2010). Novel Drug Delivery Systems for Sustained and Targeted Delivery of Anti-Cancer Drugs: Current Status and Future Prospects. *Curr Drug Deliv.*, 7(2), 152–161.
7. Madani, S. Y., Naderi, N., Dissanayake, O., Tan, A., & Seifalian, A. M. (2011). A new era of cancer treatment: carbon nanotubes as drug delivery tools. *International journal of nanomedicine*, 6, 2963–79.
8. Liu, Z., Chen, K., Davis, C., Sherlock, S., Cao, Q., Chen, X., & Dai, H. (2008). Drug delivery with carbon nanotubes for in vivo cancer treatment. *Cancer research*, 68(16), 6652–60.
9. Chang-jie Chen, Janice E. Chin, Kazumitsu Ueda, Douglas P. Clark, Ira Pastan, Michael M. Gottesman, I. B. R. (1986). Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*, 87(3), 381–389.
10. Dhar, S., Liu, Z., Thomale, J., Dai, H., & Lippard, S. J. (2008). Targeted Single-Wall Carbon Nanotube-Mediated Pt(IV) Prodrug Delivery Using Folate as a Homing Device. *Journal of the American Chemical Society*, 130(34), 11467–11476.
11. Torchilin, V. P. (2007). Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *The AAPS journal*, 9(2), E128–47.
12. Weissleder, R. (2006). Molecular imaging in cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5777), 1168–71.

13. Rosi, N. L., Giljohann, D. a, Thaxton, C. S., Lytton-Jean, A. K. R., Han, M. S., & Mirkin, C. a. (2006). Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5776), 1027–30.
14. Allen, T. M., & Cullis, P. R. (2004). Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5665), 1818–22.
15. Torchilin VP, ed. (2006). *Nanoparticulates as Pharmaceutical Carriers*. London: Imperial College Press.
16. Cohen, S., & Bernstein, H. (1996). *Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines*. CRC Press LLC.
17. Müller, R. H. (1991). *Colloidal Carriers for Controlled Drug Delivery and Targeting: Modification, Characterization and in Vivo Distribution*. Wiss. Verlag-Ges.
18. Myles, D. G., Biol, D., Jaffe, L. A., Brawley, S. H., Bernard, U. C., The, F., ... Langerll, R. (1994). Biodegradable Long-Circulating Polymeric Nanospheres ILLauana, (January).
19. Weber, G. (2007). *Molecular mechanisms of cancer*. USA: Springer.
20. Virchow, R. (1871). *Die Cellularpathologie: in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre*. (August Hirschwald, Ed.). Berlin.
21. Moorhead, J. (2010). Henrietta Lacks: the mother of modern medicine. *The Guardian*.
22. Lucey, B. P., Nelson-Rees, W. a, & Hutchins, G. M. (2009). Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 133(9), 1463–7.
23. Nelson-Rees WA, Flandermeyer RR, H. P. (1974). Banded marker chromosomes as indicators of intraspecies cellular contamination. *Science*, 184, 1093.
24. Gartler SM. (1967). Genetic markers as tracers in cell culture. *National Cancer Institute Monographs*, 26, 167–195.
25. Kerr, J., Wyllie, A., & Currie, A. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*.
26. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, K., & SJ. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 348, 334–336.
27. Von Warburg O. (1930). *The metabolism of tumours*. London: Constable.
28. Vaupel V, Thews G, W. p. (1976). Kritische Sauerstoff-und Glucoseversorgung maligner Tumoren. *Dtsch med Wochenschr*, 101(49), 1810–1816.
29. Potter, V. (1964). Biochemical prespectives in cancer research. *Cancer research*, 1085–1098.
30. Miller, E. C., & Miller, J. A. (1947). The Presence and Significance of Bound Aminoazo Dyes in the Livers of Rats Fed p -Dimethylaminoazobenzene The Presence and Significance of Bound The presence and significance of bound aminoazo dyes in the livers of rats fed p-dimethylaminoazobenzene. *Cancer research*, (7), 468–480.
31. Doll R, P. R. (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst*, 66(6), 1191–308.
32. Muller HJ. (1927). Artificial transmutation of the gene. *Science*, 66, 84–87.
33. Bivins, J. (1953). The Growth in the Developing Chicken Embryo of a Filtrable Agent from Verruca Vulgaris1. *Journal of Investigative Dermatology*, (5), 471–482.
34. H., R. (1955). Quantitative relations between causative virus and cell in the Rous No. 1 chicken sarcoma. *Virology*, 1(5), 445–473.
35. Epstein MA, Achong BG, B. Y. (1964). Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet*, 1, 702–703.
36. Broca, P. (1866). *Traité des tumeurs*. Paris: P. Asselin.
37. Boveri, T. (1914). *Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren*. G. Fischer.
38. Tyzzer, E. E. (1916). Tumor Immunity. *J Cancer Res*, 1, 125–156.
39. Raser JM, O. E. (2005). Noise in gene expression: origins, consequences, and control. *Science*, 309, 2010–13.
40. Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 37(3), 614–636.
41. Szostak, J. W., & Blackburn, E. H. (1982). Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell*, 29(1), 245–255.
42. McKay, S., & Cooke, H. (1992). A protein which specifically binds to single stranded TTAGGGn repeats. *Nucleic acids research*, 20(6), 1387–1391.
43. Mintz B, I. K. (1975). Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Nucleic acids research*, 20(6), 1387–91.
44. Matias, O., Martins, P. (2011). *Biologia11* (1ª ed., pp. 10–54). Areal editores.

45. Smith, N. D., Rubenstein, J. N., Eggener, S. E., & Kozlowski, J. M. (2003). The p53 tumor suppressor gene and nuclear protein: basic science review and relevance in the management of bladder cancer. *The Journal of urology*, 169(4), 1219–28.
46. Huang, Sui, Ingber, D. E. (1999). The structural and mechanical complexity of cell-growth control. *Nat Cell Biol*, 1(5), 131–138.
47. Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D. R., & Yamada, K. M. (2001). Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Science*, 294 (5547), 1708–1712.
48. Politoff, a L., Socolar, S. J., & Loewenstein, W. R. (1969). Permeability of a cell membrane junction. Dependence on energy metabolism. *The Journal of general physiology*, 53(4), 498–515.
49. Cesen-Cummings, K., Fernstrom, M. J., Malkinson, a M., & Ruch, R. J. (1998). Frequent reduction of gap junctional intercellular communication and connexin43 expression in human and mouse lung carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 19(1), 61–7.
50. Trosko JE, Chang CC, Madhukar BV, K. J. (1990). Chemical, oncogene and growth factor inhibition of gap junctional intercellular communication: an integrative hypothesis of carcinogenesis. *Pathobiology*, 58(5), 265–78.
51. Ruiz, M. (2006). Gap cell junction.[Digital]:[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Gap\\_cell\\_junction-en.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Gap_cell_junction-en.svg)
52. Wong, C., Lee, A., Shientag, L., Yu, J., & Dong, Y. (2001). Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency. *Cancer research*, 61, 333–338.
53. Speiser, D. E., & Ohashi, P. S. (1998). Activation of cytotoxic T cells by solid tumours? *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 54(3), 263–271.
54. Wortzel, R. D., Urban, J. L., Philipps, C., Fitch, F. W., & Schreiber, H. (1983). Independent immunodominant and immunorecessive tumor-specific antigens on a malignant tumor: antigenic dissection with cytolytic T cell clones. *The Journal of Immunology*, 130 (5), 2461–2466.
55. Lehmann PV, Sercarz EE, Forsthuber T, Dayan CM, G. G. (1993). Determinant spreading and the dynamics of the autoimmune T-cell repertoire. *Immunology Today*, 14(5), 203–208.
56. Oldstone, M. B. A. (1987). Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell*, 50(6), 819–820.
57. Collins, M. K. L., & Rivas, A. L. (1993). The control of apoptosis in mammalian cells. *Trends in biochemical sciences*, 18(8), 307–309.
58. Bissonnette RP, Echeverri F, Mahboubli A, G. D. (1992). Apoptotic Cell death induced by c-myc is inhibited by Bcl-2. *Nature*, 359, 552–554.
59. Allen, R. T., Hunter, W. J., & Agrawal, D. K. (1997). Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 37(4), 215–28.
60. Baba, A., & Cătoi, C. (2007). *Comparative oncology*. House of the Romanian Academy.
61. W. Bursch, S. Paffe, B. Putz, G. Barthel, and R. S.-H. (1990). Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. *Carcinogenesis*, 11(5), 847–853.
62. May P, May E, Schwartz L, Y.-R. E. (1995). Apoptosis and cancer. *Revue Pract*, 45, 1903–1908.
63. Fernandez-Sarabia MI, Bischoff IR. Bcl-2 associates with the ras-related protein R-ras p23. *Nature*. 1993;366:274–275.
64. Fukuda, K., Kojiro, M., & Chiu, J. F. (1993). Demonstration of extensive chromatin cleavage in transplanted Morris hepatoma 7777 tissue: apoptosis or necrosis? *The American journal of pathology*, 142(3), 935–46.
65. Solary, E., Bertrand, R., & Pommier, Y. (1993). Le rôle de l'apoptose dans la genèse et le traitement du cancer. *Médecine/Sciences*, 9(6-7), 667.
66. Goldmann, E. (1907). The growth of malignant disease in man and the lower animals: with special reference to the vascular system. *The Lancet*, 2, 1236–1240.
67. Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., & Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in cancer. *Vascular health and risk management*, 2(3), 213–9.
68. Thomlinson, R., & Gray, L. (1955). The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *British Journal of Cancer*, 9(4), 539–49.
69. Biocarta.Via HIF. [Digital]. Biocarta:[http://www.biocarta.com/pathfiles/h\\_hifPathway.as](http://www.biocarta.com/pathfiles/h_hifPathway.as)
70. Harris, a L. (2000). von Hippel-Lindau syndrome: target for anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor therapy. *The oncologist*, 5 Suppl 1(suppl 1), 32–6.
71. Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y., & Fujii-Kuriyama, Y. (1997). A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(9), 4273–8.
72. Seandel, M. (2001). Growth factor-induced angiogenesis in vivo requires specific cleavage of fibrillar type I collagen. *Blood*, 97(8), 2323–2332.
  73. Gramatikoff, Kosi. Via VEGF, Hipoxia e Angiogenese.[Digital]. Biocarta: [http://www.biocarta.com/pathfiles/h\\_vegfPathway.as](http://www.biocarta.com/pathfiles/h_vegfPathway.as)
  74. Guillou, P. J. (1996). *The molecular basis of cancer. J. Mendelsohn.*, *British Journal of Surgery* (Vol. 83, pp. 206–232). Philadelphia: John Wiley & Sons, Ltd.
  75. Sund, M., Xie, L., & Kalluri, R. (2004). The contribution of vascular basement membranes and extracellular matrix to the mechanics of tumor angiogenesis. *APMIS*, 112(7-8), 450–462.
  76. Nowell, P. (1986). Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res*, 2203–2207.
  77. Chaklin AV, Ponomarkov VI, O. L. (1968). Some trends in comparative oncology. *Neoplasma*, (15), 543–8.
  78. Chiarugi VL, Magnelli L, G. O. (1988). Cox-2, inos and p-53 as play-markers of tumor angiogenesis. *Internatiol Journal of Molecular Medicine*, 2(6), 715–9.
  79. Bishop JM. (1983). Cellular Oncogenes and Retroviruses. *Annual Review of Biochemistry*, 52, 301–54.
  80. Duvall, E., & Wyllie, A. H. (1986). Death and the cell. *Immunology Today*, 7(4), 115–119.
  81. Folberg, R., Hendrix, M., & Maniotis, A. (2000). Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *The American journal of pathology*, 156(2), 361–81.
  82. Tiwari, M. (2013). Nano cancer therapy strategies. *Journal of cancer research and therapeutics*, 8(1), 19–22.
  83. Ross, J. S., Schenkein, D. P., Pietrusko, R., Rolfe, M., Linette, G. P., Stec, J., ... Hortobagyi, G. N. (2004). Targeted Therapies for Cancer 2004. *American Journal of Clinical Pathology*, 122(4), 598–609.
  84. Parreira, D. B. (2011). Nanopartículas para aplicação oncológica
  85. Alexis, F., Pridgen, E., Langer, R., & Farokhzad, O. (2010). Nanoparticle Technologies for Cancer Therapy. In M. Schäfer-Korting (Ed.), *Drug Delivery SE - 2* (Vol. 197, pp. 55–86). Springer Berlin Heidelberg.
  86. Sinha, R., Kim, G. J., Nie, S., & Shin, D. M. (2006). Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Molecular cancer therapeutics*, 5(8), 1909–17.
  87. Farokhzad, Omid C. (2008). Nanotechnology for drug delivery: the perfect partnership. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 5(9), 927–929.
  88. Parhi, P., Mohanty, C., & Sahoo, S. K. (2012). Nanotechnology-based combinational drug delivery: an emerging approach for cancer therapy. *Drug discovery today*, 17(17-18), 1044–52.
  89. Institute, N. C. (2010). Cancer Nanotechnology Plan.
  90. Kateb, B., Chiu, K., Black, K., & Yamamoto, V. (2011). Nanoplatforms for constructing new approaches to cancer treatment, imaging, and drug delivery: what should be the policy? *Neuroimage*, 54(Suppl 1), 1–45.
  91. Brigger, I., Dubernet, C., & Couvreur, P. (2002). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced drug delivery reviews*, 54(5), 631–51.
  92. Sahoo, S. K., & Labhasetwar, V. (2003). Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug discovery today*, 8(24), 1112–20.
  93. Elzoghby, A. O., Samy, W. M., & Elgindy, N. a. (2012). Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 157(2), 168–82.
  94. Patel, M. P., Patel, R. R., & Patel, J. K. (2010). Chitosan mediated targeted drug delivery system: a review. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques*, 13(4), 536–57.
  95. Ali I, Rahis-Uddin, Salim K, Rather MA, Wani WA, H. A. (2011). Advances in Nano Drugs for Cancer Chemotherapy. *Curr Cancer Drug Targets*, 11(2), 135–146.
  96. Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z. G., & Shin, D. M. (2008). Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(5), 1310–6.
  97. Shi, X., Wang, S., Meshinchi, S., Van Antwerp, M. E., Bi, X., Lee, I., & Baker, J. R. (2007). Dendrimer-Entrapped Gold Nanoparticles as a Platform for Cancer-Cell Targeting and Imaging. *Small*, 3(7), 1245–1252.
  98. Kopeček, J. (2013). Polymer-drug conjugates: origins, progress to date and future directions. *Advanced drug delivery reviews*, 65(1), 49–59.

99. Kopecek, J., Kopecková, P., Minko, T., & Lu, Z. (2000). HEMA copolymer-anticancer drug conjugates: design, activity, and mechanism of action. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 50(1), 61–81.
100. Seymour, L., & Ferry, D. (2009). Phase II studies of polymer-doxorubicin (PK1, FCE28068) in the treatment of breast, lung and colorectal cancer. *International ...*, 1629–1636.
101. Wu, J., Lu, Y., Lee, A., Pan, X., Yang, X., Zhao, X., & Lee, R. J. (2007). Reversal of Multidrug Resistance by Liposomes Co-encapsulating Doxorubicin and Verapamil. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 10(3), 350–357.
102. Beg, S., Rizwan, M., Sheikh, A. M., Hasnain, M. S., Anwer, K., & Kohli, K. (2011). Advancement in carbon nanotubes: basics, biomedical applications and toxicity. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 63(2), 141–63.
103. Wankhede, M., & Bouras, A. (2012). Magnetic nanoparticles: an emerging technology for malignant brain tumor imaging and therapy. *Expert review of ...*, 5(2), 173–186.
104. Li, C., Li, L., & Keates, A. (2012). Targeting cancer gene therapy with magnetic nanoparticles. *Oncotarget*, 3(4), 365–370.
105. Dave, S. R., & Gao, X. (2009). Monodisperse magnetic nanoparticles for biodetection, imaging, and drug delivery: a versatile and evolving technology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1(6), 583–609.
106. Wang, F., Chen, Y., Zhang, D., Zhang, Q., Zheng, D., Hao, L., ... Liu, G. (2012). Folate-mediated targeted and intracellular delivery of paclitaxel using a novel deoxycholic acid-O-carboxymethylated chitosan-folic acid micelles. *International journal of nanomedicine*, 7, 325–37.
107. Serpe, L. et al. (2004) Cytotoxicity of anticancer drugs incorporated in solid lipid nanoparticles on HT-29 colorectal cancer cell line. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58, 673–680.
108. Alexis, F., & Pridgen, E. (2008). Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 5(4), 505–515.
109. Karra, N., & Benita, S. (2012). The ligand nanoparticle conjugation approach for targeted cancer therapy. *Current drug metabolism*, 13(1), 22–41.
110. Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., & Hori, K. (2000). Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 65(1-2), 271–84.
111. Kirpotin, D. B., Drummond, D. C., Shao, Y., Shalaby, M. R., Hong, K., Nielsen, U. B., ... Park, J. W. (2006). Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. *Cancer research*, 66(13), 6732–40.
112. Wang, M., & Thanou, M. (2010). Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 62(2), 90–9
113. Brown KC. (2010). Peptidic Tumor Targeting Agents: The Road from Phage Display Peptide Selections to Clinical Applications. *Current Pharmaceutical Design*, 16(9), 1040–54.
114. Ruoslahti, E.; Bhatia, S. N.; Sailor, M. J. (2010). Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. *J. Cell Biol.*, 188(6), 759–68.
115. Kranenborg, M. H., Boerman, O. C., Oosterwijk-Wakka, J. C., de Weijert, M. C., Corstens, F. H., & Oosterwijk, E. (1998). Two-step radio-immunotargeting of renal-cell carcinoma xenografts in nude mice with anti-renal-cell-carcinoma X anti-DTPA bispecific monoclonal antibodies. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 75(1), 74–80.
116. Hong, S., Leroueil, P. R., Majoros, I. J., Orr, B. G., Baker, J. R., & Banaszak Holl, M. M. (2007). The binding avidity of a nanoparticle-based multivalent targeted drug delivery platform. *Chemistry & biology*, 14(1), 107–15.
117. Davis, Mark E., Shin, D. M. (2008). Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 7(9), 771–82.
118. Gu, F., Zhang, L., Teply, B. a, Mann, N., Wang, A., Radovic-Moreno, A. F., ... Farokhzad, O. C. (2008). Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7), 2586–91.
119. Bartlett, D. W., Su, H., Hildebrandt, I. J., Weber, W. a, & Davis, M. E. (2007). Impact of tumor-specific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality in vivo imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(39), 15549–54.

120. Debotton, N., Parnes, M., Kadouche, J., & Benita, S. (2008). Overcoming the formulation obstacles towards targeted chemotherapy: in vitro and in vivo evaluation of cytotoxic drug loaded immunonanoparticles. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 127(3), 219–30.
121. Senior, J., Delgado, C., Fisher, D., Tilcock, C., & Gregoriadis, G. (1991). Influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma protein and clearance from the circulation: Studies with poly(ethylene glycol)-coated vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1062(1), 77–82.
122. Gabizon, A., & Papahadjopoulos, D. (1992). The role of surface charge and hydrophilic groups on liposome clearance in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1103(1), 94–100.
123. Needham, D., McIntosh, T. J., & Lasic, D. D. (1992). Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1108(1), 40–48.
124. Illum, L.; Jones, P. D.; Baldwin, R. W.; Davis, S. S. (1984). Tissue distribution of poly(hexyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles coated with monoclonal antibodies in mice bearing human tumor xenografts. *J Pharmacol Exp Ther*, 230, 733–36.
125. Phillips, N. C., & Dahman, J. (1995). Immunogenicity of immunoliposomes: reactivity against species-specific IgG and liposomal phospholipids. *Immunology letters*, 45(3), 149–52.
126. Kato, K., Itoh, C., Yasukouchi, T., & Nagamune, T. (2004). Rapid Protein Anchoring into the Membranes of Mammalian Cells Using Oleyl Chain and Poly(ethylene glycol) Derivatives. *Biotechnology Progress*, 20(3), 897–904.
127. Gijssens, A., Derycke, A., Missiaen, L., De Vos, D., Huwyler, J., Eberle, A., & de Witte, P. (2002). Targeting of the photocytotoxic compound ALPcS4 to hela cells by transferrin conjugated peg-liposomes. *International Journal of Cancer*, 101(1), 78–85.
128. Nirmal Joshee, Dhundy R. Bastola, and P.-W. C. (2012). Transferrin-Facilitated Lipofection Gene Delivery Strategy: Characterization of the Transfection Complexes and Intracellular Trafficking. *Human Gene Therapy*, 13(16), 1991–2004.
129. Sundaram, S.; Trivedi, R.; Durairaj, C.; Ramesh, R.; Ambati, B. K. ., & Kompella, U. B. (2000). Uptake of Long-Circulating Immunoliposomes, Directed Against Colon Adenocarcinoma Cells, by Liver Metastases of Colon Cancer. *Journal of Drug Targeting*, 8(4), 235–245.
130. Xu, L., Huang, C., Huang, W., Tang, W., Rait, A., Yin, Y. Z., ... Chang, E. H. (2002). Systemic tumor-targeted gene delivery by anti-transferrin receptor scFv-immunoliposomes, 1, 337–46.
131. Gschwind, Andreas, Fischer, Oliver M., Ullrich, A. (2004). The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 4(5), 361–70.
132. Montemurro, F., Di Cosimo, S., & Arpino, G. (2013). Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive and hormone receptor-positive breast cancer: new insights into molecular interactions and clinical implications. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 1–10.
133. Tai, W., Mahato, R., & Cheng, K. (2010). The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 146(3), 264–275.
134. Steinhauser, I., Spänkuch, B., Strebhardt, K., & Langer, K. (2006). Trastuzumab-modified nanoparticles: optimisation of preparation and uptake in cancer cells. *Biomaterials*, 27(28), 4975–83.
135. Anhorn, M. G., Wagner, S., Kreuter, J., Langer, K., & von Briesen, H. (2008). Specific Targeting of HER2 Overexpressing Breast Cancer Cells with Doxorubicin-Loaded Trastuzumab-Modified Human Serum Albumin Nanoparticles. *Bioconjugate Chemistry*, 19(12), 2321–2331.
136. Sun, B., Ranganathan, B., & Feng, S.-S. (2008). Multifunctional poly(D,L-lactide-co-glycolide)/montmorillonite (PLGA/MMT) nanoparticles decorated by Trastuzumab for targeted chemotherapy of breast cancer. *Biomaterials*, 29(4), 475–486.
137. Gao, J., Kou, G., Wang, H., Chen, H., Li, B., Lu, Y., ... Guo, Y. (2009). PE38KDEL-loaded anti-HER2 nanoparticles inhibit breast tumor progression with reduced toxicity and immunogenicity. *Breast Cancer Research and Treatment*, 115(1), 29–41.
138. Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., & Normanno, N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 19(3), 183–232.
139. Yarden, Yosef, Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(2), 127–37.

140. Patra, C. R., Bhattacharya, R., Wang, E., Katarya, A., Lau, J. S., Dutta, S., ... Mukhopadhyay, D. (2008). Targeted delivery of gemcitabine to pancreatic adenocarcinoma using cetuximab as a targeting agent. *Cancer research*, 68(6), 1970–8.
141. Acharya, S., Dilnawaz, F., & Sahoo, S. K. (2009). Targeted epidermal growth factor receptor nanoparticle bioconjugates for breast cancer therapy. *Biomaterials*, 30(29), 5737–50.
142. Yu, J., Javier, D., Yaseen, M. A., Nitin, N., Richards-Kortum, R., Anvari, B., & Wong, M. S. (2010). Self-Assembly Synthesis, Tumor Cell Targeting, and Photothermal Capabilities of Antibody-Coated Indocyanine Green Nanocapsules. *Journal of the American Chemical Society*, 132(6), 1929–1938.
143. Tseng, C.-L., Wu, S. Y.-H., Wang, W.-H., Peng, C.-L., Lin, F.-H., Lin, C.-C., ... Shieh, M.-J. (2008). Targeting efficiency and biodistribution of biotinylated-EGF-conjugated gelatin nanoparticles administered via aerosol delivery in nude mice with lung cancer. *Biomaterials*, 29(20), 3014–22.
144. Magadala, P., & Amiji, M. (2008). Epidermal growth factor receptor-targeted gelatin-based engineered nanocarriers for DNA delivery and transfection in human pancreatic cancer cells. *The AAPS journal*, 10(4), 565–76.
145. Faulk WP, Hsi BL, S. P. (1980). Transferrin and transferrin receptors in carcinoma of the breast. *Lancet*, 2(8191), 390–2.
146. Zheng, Y., Yu, B., Weecharangsan, W., Piao, L., Darby, M., Mao, Y., ... Lee, R. J. (2010). Transferrin-conjugated lipid-coated PLGA nanoparticles for targeted delivery of aromatase inhibitor 7 $\alpha$ -APTADD to breast cancer cells. *International journal of pharmaceutics*, 390(2), 234–41.
147. Sundaram S, Roy SK, Ambati BK, K. U. (2009). Surface-functionalized nanoparticles for targeted gene delivery across nasal respiratory epithelium. *FASEB*, 23(11), 3752–65.
148. Davis, M. E., Zuckerman, J. E., Choi, C. H. J., Seligson, D., Tolcher, A., Alabi, C. a., ... Ribas, A. (2010). Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature*, 464(7291), 1067–70.
149. Antony, A. C. (1996). Folate Receptors. *Annual Review of Nutrition*, 16(1), 501–521.
150. Leamon, C. P., & Reddy, J. A. (2004). Folate-targeted chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(8), 1127–1141.
151. Gabizon, A., Shmeeda, H., Horowitz, A. T., & Zalipsky, S. (2004). Tumor cell targeting of liposome-entrapped drugs with phospholipid-anchored folic acid-PEG conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(8), 1177–1192.
152. Anderson, R. G.; Kamen, B. A.; Rothberg, K. G.; Lacey, S. W. (1992). Potocytosis : Sequestraton and Transport of Small Molecules by Caveolae Superantigens and Endogenous. *Science*, 255(5043), 410–411.
153. Wang, J., Tao, X., Zhang, Y., Wei, D., & Ren, Y. (2010). Reversion of multidrug resistance by tumor targeted delivery of antisense oligodeoxynucleotides in hydroxypropyl-chitosan nanoparticles. *Biomaterials*, 31(15), 4426–33.
154. Santra, S., Kaittanis, C., & Perez, J. M. (2010). Cytochrome c Encapsulating Theranostic Nanoparticles: A Novel Bifunctional System for Targeted Delivery of Therapeutic Membrane-Impermeable Proteins to Tumors and Imaging of Cancer Therapy. *Molecular Pharmaceutics*, 7(4), 1209–1222.
155. Narayanan, S., Binulal, N. S., Mony, U., Manzoor, K., Nair, S., & Menon, D. (2010). Folate targeted polymeric “green” nanotherapy for cancer. *Nanotechnology*, 21(28), 285107.
156. Chang, S., Reuter, V., & Heston, W. (1999). Five different anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature. *Cancer research*, 59(13), 3192–3198.
157. Su, S., Huang, I., Fair, W., Powell, C., & Heston, W. (1995). Alternatively spliced variants of prostate-specific membrane antigen RNA: ratio of expression as a potential measurement of progression. *Cancer research*, 1441–1443.
158. Serda RE, Adolphi NL, Bisoffi M, S. LO. (2007). Targeting and cellular trafficking of magnetic nanoparticles for prostate cancer imaging. *Mol Imaging*, 6(4), 277–88.
159. Thomas, T. P., Patri, A. K., Myc, A., Myaing, M. T., Ye, J. Y., Norris, T. B., & Baker, J. R. (2004). In Vitro Targeting of Synthesized Antibody-Conjugated Dendrimer Nanoparticles†. *Biomacromolecules*, 5(6), 2269–2274.
160. Dhar, S., Gu, F. X., Langer, R., Farokhzad, O. C., & Lippard, S. J. (2008). Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(45), 17356–61.

161. Tong, R., Yala, L., Fan, T. M., & Cheng, J. (2010). The formulation of aptamer-coated paclitaxel-poly(lactide) nanoconjugates and their targeting to cancer cells. *Biomaterials*, *31*(11), 3043–3053.
162. Debotton, N., Zer, H., Parnes, M., Harush-Frenkel, O., Kadouche, J., & Benita, S. (2010). A quantitative evaluation of the molecular binding affinity between a monoclonal antibody conjugated to a nanoparticle and an antigen by surface plasmon resonance. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *74*(2), 148–156.
163. Litvinov, S. V., Velders, M. P., Bakker, H. a, Fleuren, G. J., & Warnaar, S. O. (1994). Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *The Journal of cell biology*, *125*(2), 437–46.
164. Baeuerle, P. a, & Gires, O. (2007). EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *British journal of cancer*, *96*(3), 417–23.
165. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, W. IL. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, *414*(6859), 105–11.
166. Mitra M, Misra R, Harilal A, et al. (2011). Enhanced in vitro antiproliferative effects of EpCAM antibody-functionalized paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles in retinoblastoma cells. *Molecular Vision*, *17*, 2724–37.
167. Simon, M., Stefan, N., Plückthun, A., & Zangemeister-Wittke, U. (2013). Epithelial cell adhesion molecule-targeted drug delivery for cancer therapy. *Expert opinion on drug delivery*, *10*(4), 451–68.
168. Folkman, J. (1971). Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *New England Journal of Medicine*, *285*(21), 1182–1186.
169. Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell*, *86*(3), 353–364.
170. Lee, C. G., Heijn, M., di Tomaso, E., Griffon-Etienne, G., Ancukiewicz, M., Koike, C., ... Boucher, Y. (2000). Anti-Vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. *Cancer research*, *60*(19), 5565–70.
171. Bottaro, D. P.; Liotta, L. A. (2003). Cancer: Out of air is not out of action. *Nature*, *423*, 593–595.
172. Eliceiri, B. P., & Cheresch, D. A. (1999). The role of  $\alpha_v$  integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *The Journal of Clinical Investigation*, *103*(9), 1227–1230.
173. Li, L., Wartchow, C. A., Danthi, S. N., Shen, Z., Dechene, N., Pease, J., ... Knox, S. J. (2004). A novel antiangiogenesis therapy using an integrin antagonist or anti-Flk-1 antibody coated 90Y-labeled nanoparticles. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, *58*(4), 1215–1227.
174. Schiffelers, R. M., Ansari, A., Xu, J., Zhou, Q., Tang, Q., Storm, G., ... Woodle, M. C. (2004). Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucleic acids research*, *32*(19), e149.
175. Wagner, S., Rothweiler, F., Anhorn, M. G., Sauer, D., Riemann, I., Weiss, E. C., ... Langer, K. (2010). Enhanced drug targeting by attachment of an anti  $\alpha_v$  integrin antibody to doxorubicin loaded human serum albumin nanoparticles. *Biomaterials*, *31*(8), 2388–2398.
176. Elbayoumi, T., & Torchilin, V. (2006). Enhanced accumulation of long-circulating liposomes modified with the nucleosome-specific monoclonal antibody 2C5 in various tumours in mice: gamma-imaging studies. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, *33*(10), 1196–1205.
177. Sundaram, S., Trivedi, R., Durairaj, C., Ramesh, R., Ambati, B. K., & Kompella, U. B. (2009). Targeted drug and gene delivery systems for lung cancer therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *15*(23), 7299–308.
178. Yu, D.-H., Lu, Q., Xie, J., Fang, C., & Chen, H.-Z. (2010). Peptide-conjugated biodegradable nanoparticles as a carrier to target paclitaxel to tumor neovasculature. *Biomaterials*, *31*(8), 2278–2292.
179. Stacker, S. A.; Achen, M. G.; Jussila, L.; Baldwin, M. E. . A., & K. (2002). Metastasis: Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer*, *2*(8), 573–83.
180. Phongpradist, R.; Chittasupho, C.; Okonogi, S.; Siahaan, T. ., & Anuchapreeda, S.; Ampasavate, C.; Berkland, C. (2010). LFA-1 on Leukemic Cells as a Target for Therapy or Drug Delivery. *Current Pharmaceutical Design*, *16*(21), 2321–30.
181. Bicho, A., Peça, I. N., Roque, A. C. A., & Cardoso, M. M. (2010). Anti-CD8 conjugated nanoparticles to target mammalian cells expressing CD8. *International Journal of Pharmaceutics*, *399*(1–2), 80–86.