

# Nanomedicina no tratamento de tumores sólidos: A aplicação dos lipossomas

**Ângela Cristina Santos Parente da Silva**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

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

*2014*



*FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA*

# Nanomedicina no tratamento de tumores sólidos: A aplicação dos lipossomas

**Ângela Cristina Santos Parente da Silva**

**Nº 39084**

Dissertação para obtenção do grau de mestre em Ciências  
Farmacêuticas

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

***SETEMBRO DE 2014***

# Nanomedicina no tratamento de tumores sólidos: A aplicação dos lipossomas

## **Declaração de autoria de trabalho**

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

Copyright Ângela Silva.

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 quero agradecer à minha orientadora, a professora Doutora Ana Grenha, por todo o empenho e dedicação com que acompanhou este trabalho, por toda a sua ajuda e disponibilidade.

A todos os docentes que, de certa forma, contribuíram para a minha formação, quero aqui deixar uma palavra de gratidão por me terem transmitido alguns dos vossos imensos conhecimentos.

Gostava de agradecer a toda a equipa da Farmácia Arade e dos Serviços Farmacêuticos do Centro Hospitalar S. João por tudo o que me ensinaram ao longo do meu estágio.

Quero agradecer às minhas amigas Mara, Rafaela e Marta por terem estado ao meu lado quando mais necessitei. Tantas vezes, no meio dos meus desabafos desanimadores, me deram força e me ajudaram a lutar.

Não podia deixar de agradecer aos meus tios, Célia e Miguel, que tanto me ajudaram quando decidi rumar na minha aventura de realizar o estágio no CHSJ. Obrigado por me terem recebido tão bem, por me terem ajudado em tudo, durante aqueles dois meses. Sem vocês esta experiência não teria sido tão enriquecedora.

Ao meu namorado que sempre esteve ao meu lado desde o início desta aventura, primeiro como amigo depois como namorado, um muito obrigado. Obrigado por toda força que me deste durante estes anos, por todas as palavras carinhosas, por todo o apoio e, sobretudo, por toda a paciência.

Um grande obrigado ao meu irmão que tantas vezes me ajudou. Agradeço por todas as nossas partilhas, todas as longas conversas, por todo o apoio e amizade.

Para os meus pais, o meu agradecimento é o maior deste mundo. Sem a vossa ajuda, hoje eu não estaria aqui. Agradeço não só por estes cinco anos mas também por toda a minha vida, por sempre terem acreditado em mim, por tantas vezes me terem abraçado e dito que eu era capaz. Esta vitória não é só minha, também é vossa!

## Resumo

O cancro é, atualmente, uma das maiores causas de morte a nível mundial, tendo sido responsável por 8.2 milhões de óbitos em 2012. Muito embora os fundos de investigação se dirijam, cada vez mais, para a área da oncologia, este número parece ter tendência para continuar a aumentar nos próximos anos. As novas abordagens sob investigação visam sobretudo melhorar a mortalidade associada à doença e muitas técnicas têm vindo a ser desenvolvidas com o intuito de tratar e melhorar a qualidade de vida dos doentes oncológicos. A identificação de fatores de risco, a compreensão dos mecanismos envolvidos na formação e desenvolvimento da doença, a analogia com os diversos estilos de vida adotados, a tentativa cada vez mais promissora de destruir as células cancerígenas induzindo o menor dano possível nas células saudáveis são, também, alguns dos fundamentos que desencadeiam trabalhos de investigação.

A nanomedicina consiste na convergência da nanotecnologia com a medicina e tem impulsionado grandes avanços no diagnóstico, tratamento e monitorização de muitas patologias, entre as quais o cancro. No que se refere à área da terapêutica oncológica, a aplicação de ferramentas à escala nano tem revelado inúmeras vantagens, nomeadamente na diminuição dos efeitos secundários associados, bem como uma maior eficácia terapêutica, ambos contribuindo para melhorar a qualidade de vida dos doentes. Os lipossomas são um dos nanossistemas com maior aplicação reportada, permitindo a vetorização de fármacos anticancerígenos para as células tumorais. Nesta monografia serão abordados aspetos relacionados com a utilização de lipossomas na terapêutica oncológica visando realçar as vantagens da sua utilização.

**Palavras-chave:** cancro, lipossomas, nanomedicina, nanotecnologia, vetorização de fármacos

## **Abstract**

Cancer is currently one of the biggest causes of death worldwide, accounting for 8.2 million deaths in 2012. Although research funds are being increasingly directed to the field of oncology, this number seems to have a tendency to continue increasing in coming years. The new approaches under investigation aim at improving mortality associated with the disease and many techniques have been developed in order to treat and improve the quality of life of cancer patients. The identification of risk factors, understanding the mechanisms involved in the formation and development of the disease, the analogy with the diverse lifestyles adopted, the increasingly successful attempt to destroy cancer cells by inducing the least possible damage to healthy cells are also some of the reasons that trigger research.

Nanomedicine is the convergence of nanotechnology with medicine and has driven major advances in the diagnosis, treatment and monitoring of many diseases, including cancer. With regard to the field of cancer therapy, the application of nano-scale tools has proven to have numerous advantages including reduction of side effects associated with, and a higher therapeutic efficacy, both contributing to improve the quality of life of patients. Liposomes are one of the most frequently used nanocarriers reported to allow the vectorization of anticancer drugs to tumor cells. This monograph will address aspects related to the use of liposomes in cancer therapy aiming to highlight the benefits of their use.

**Key words:** cancer, drug delivery, liposomes, nanomedicine, nanotechnology

## Índice

Resumo .....	V
Abstract.....	VI
Índice de figuras .....	IX
Índice de quadros.....	X
Lista de abreviaturas .....	XI
1. Introdução.....	1
2. O cancro.....	2
2.1. Incidência e prevalência .....	2
2.2. Os pontos-chave para a formação de neoplasias.....	3
2.2.1. Imortalização celular – o papel da telomerase .....	4
2.2.2. Capacidade de proliferação celular .....	6
2.2.3. Genes supressores de tumores.....	7
2.2.4. Invasão e metastização: A influência da matriz extracelular .....	8
2.2.5. Inibição da morte celular programada.....	9
2.2.6. Angiogénese .....	10
2.3. Fatores de risco para o desenvolvimento de neoplasias.....	11
2.4. Contornando os mecanismos de defesa .....	12
2.5. Modalidades para tratamento de neoplasias .....	12
2.6. Efeitos adversos subjacentes ao tratamento de neoplasias .....	14
3. Nanomedicina.....	15
3.1. Aplicação da nanomedicina no tratamento de doenças oncológicas .....	16
3.2. Mecanismos e interações biológicas das nanomedicinas.....	17
3.3. Toxicologia associada às nanomedicinas .....	18
3.4. As bases da nanovetorização .....	19
3.4.1. Vetorização passiva.....	19
3.4.2. Vetorização ativa.....	21
3.5. Internalização celular das nanomedicinas.....	21
3.6. Vantagens e desvantagens da nanovetorização .....	22
3.7. Tipos de nanovetores .....	24
3.7.1. Micelas .....	24
3.7.2. Dendrímeros.....	25
3.7.3. Nanopartículas poliméricas .....	27

3.7.4. Nanopartículas inorgânicas .....	28
3.7.5. Nanotubos de carbono.....	28
3.7.6. Polímeros conjugados .....	29
3.7.7. Lipossomas.....	29
4. Lipossomas .....	30
4.1. Vantagens e desvantagens da vetorização de fármacos anticancerígenos por lipossomas.....	33
4.2. Interação dos lipossomas com a célula .....	36
4.3. Polímeros para revestimento da superfície dos lipossomas .....	38
4.4. Métodos de preparação de lipossomas.....	40
4.4.1. Técnicas de obtenção de lipossomas (injeção de um solvente orgânico e hidratação de um filme lipídico seco) .....	41
4.4.2. Técnicas de otimização de lipossomas (sonicação e extrusão).....	42
5. Exemplos de fármacos lipossômicos para terapêutica de tumores sólidos .....	43
5.1. Doxorrubicina .....	43
5.2. Daunorrubicina .....	47
5.3. Citarabina.....	48
5.4. Paclitaxel.....	48
5.5. Vincristina.....	49
5.6. Outros fármacos vetorizados por lipossomas .....	50
5.7. Trabalho de campo.....	51
6. Conclusão .....	53
7. Bibliografia.....	55

## Índice de figuras

<b>Figura 2.1</b> – Esquema dos pontos-chave para a formação de neoplasias .....	<b>3</b>
<b>Figura 2.2</b> – Esquema explicativo do mecanismo de supressão do p53 através da ligação à proteína <i>Snail</i> .....	<b>8</b>
<b>Figura 2.3</b> – Mecanismo de formação de novos vasos sanguíneos - angiogénese .....	<b>11</b>
<b>Figura 3.1</b> – Representação do extravasamento dos nanocomplexos na região tumoral (efeito do aumento da permeabilidade e retenção) .....	<b>20</b>
<b>Figura 3.2</b> – Esquema da construção de um dendrímero de quarta geração pela técnica divergente .....	<b>26</b>
<b>Figura 3.3</b> – Representação das estruturas de diferentes nanovetores.....	<b>29</b>
<b>Figura 4.1</b> – Representação esquemática da estrutura de um lipossoma e local de encapsulação para um fármaco hidrofílico e outro hidrofóbico .....	<b>30</b>
<b>Figura 4.2</b> – Representação esquemática das estruturas dos diferentes tipos de lipossomas de acordo com a classificação baseada no seu tamanho e número de bicamadas .....	<b>32</b>
<b>Figura 4.3</b> – Representação das estruturas dos lipossomas classificados consoante a sua composição (lipossomas convencionais, catiónicos, estericamente estabilizados e imunolipossomas).....	<b>33</b>
<b>Figura 4.4</b> – Representação de um mecanismo celular de multirresistência a fármacos.....	<b>37</b>
<b>Figura 4.5</b> – Efeito de estabilização e destabilização dos lípidos que constituem a membrana dos lipossomas, provocado pelo carácter super-hidrofílico do PCB e hidrofóbico do PEG, respetivamente.....	<b>39</b>

## Índice de quadros

<b>Quadro 3.1</b> – Resumo das vantagens e desvantagens da nanovetorização .....	<b>24</b>
<b>Quadro 4.1</b> – Polímeros utilizados com maior e menor frequência para revestimento da superfície dos lipossomas .....	<b>38</b>
<b>Quadro 5.1</b> – Efeitos adversos provocados administração de DOX na sua forma convencional.....	<b>44</b>
<b>Quadro 5.2</b> – Exemplo de fármacos anticancerígenos que se encontram em ensaios clínicos para vetorização por lipossomas .....	<b>50</b>

## Lista de abreviaturas

- AAT** – Alongamento alternativo dos telómeros
- ADN** – Ácido desoxirribonucleico
- ARN** – Ácido ribonucleico
- CHSJ** - Centro Hospitalar São João
- CMC** – Concentração micelar crítica
- DAU** – Daunorrubicina
- DOX** – Doxorrubicina
- EMA** – Agência europeia de medicamentos
- EPR** – Efeito do aumento da permeabilidade e retenção
- FDA** – *Food and Drug Administration*
- GDP** – Guanosina difosfato
- gP** - Glicoproteína P
- GTP** – Guanosina trifosfato
- HP** – *Helicobacter pylori*
- HPV** – Vírus do papiloma humano (papilomavírus)
- ICC** – Insuficiência cardíaca crônica
- MEC** - Matriz extracelular
- MLV** – Lipossoma multilamelar
- MRF** – Mecanismo de multirresistência a fármacos
- nm** – nanómetro
- OLV** – Lipossoma oligolamelar
- PAMAM** – Poliamidoamina
- PCB** – Poli-(carboxibetaína)
- PEG** – Polietilenoglicol
- RES** – Sistema reticuloendotelial
- SIDA** – Síndrome da imunodeficiência adquirida
- SSL** – Lipossoma estericamente estabilizado
- SUV** – Lipossoma unilamelar pequeno

**TDT** – Tumores dependentes da telomerase

**T<sub>m</sub>** – Temperatura de transição de fase

**V<sub>d</sub>** – Volume de distribuição

## 1. Introdução

A nanomedicina tem proporcionado o desenvolvimento de novos métodos de tratamento e diagnóstico em muitas áreas da medicina, permitindo aumentar a qualidade de vida dos indivíduos. A oncologia é um dos campos que usufrui da aplicação dos complexos construídos à escala nanométrica, os quais têm vindo a ser aplicados para vetorização de fármacos anticancerígenos. Como o cancro é, atualmente, umas das maiores causas de morte a nível mundial, a aplicação de estratégias à escala nanométrica evidencia uma vasta gama de benefícios, uma vez que acarreta grande utilidade no tratamento de neoplasias.<sup>1,2</sup>

Os mecanismos de ação dos fármacos anticancerígenos, utilizados para combater as neoplasias, baseiam-se nos pontos-chave de formação desta patologia. Acontece que, muitos desses fármacos, não provocam o efeito de combate desejado pois, em consequência das características do tecido tumoral, do organismo e do próprio fármaco, atingem a neoplasia mas provocam demasiados efeitos secundários.<sup>3,4</sup>

Devido às suas inúmeras vantagens, a nanovetorização releva-se bastante promissora para tratamento de tumores sólidos uma vez que permite a redução dos efeitos secundários associados à quimioterapia. Além do seu reduzido tamanho, a possibilidade de adaptação das moléculas de superfície dos nanovetores, que constitui a introdução de ligandos específicos para uma determinada célula ou tecido, permite aumentar a eficácia associada ao tratamento. Estes dois benefícios principais comportam a elevada importância da vetorização à escala nanométrica. Por outro lado, o transporte de fármacos através de nanovetores aumenta o tempo de circulação na corrente sanguínea de muitos deles, permitindo também o controlo da libertação do mesmo.<sup>1,5,6</sup>

Existem, então, diferentes estruturas passíveis de serem aplicadas para este fim, de que são exemplos os lipossomas. A título de exemplo acerca da aplicação destas nanoestruturas para tratamento na área da oncologia, menciona-se a formulação denominada Caelyx<sup>®</sup>, a qual consiste na encapsulação de doxorubicina em lipossomas peguizados. Esta forma de tratamento evidencia elevada eficácia terapêutica bem como uma redução dos efeitos secundários, nomeadamente uma diminuição da cardiotoxicidade associada à utilização de fármacos antraciclínicos isolados. Além desta, são também referenciados outros fármacos, em estudo ou uso clínico, vetorizados por lipossomas para terapêutica oncológica.<sup>8,9</sup>

## **2. O cancro**

### **2.1. Incidência e prevalência**

No ano de 2012 surgiram 14.1 milhões novos casos de cancro em todo o mundo e 8.2 milhões de mortes ficaram a dever-se a esta patologia. Os indivíduos do sexo masculino foram, nesse mesmo ano, mais afetados do que os do sexo feminino sendo que apareceram 7.4 e 6.7 milhões novos casos em cada género, respetivamente. Além disto, foi o cancro do pulmão o predominante nos indivíduos do género masculino, enquanto nos do género feminino foi o cancro da mama. Estes são, então, dois dos cinco tipos mais frequentes de cancro, sendo os restantes o hepático, colo-retal e do estômago. Estima-se que a incidência do cancro terá tendência para aumentar até ao ano de 2030, tanto em Portugal como no resto do mundo, o que se relaciona, sobretudo, com o crescimento da população mundial e com o aumento da esperança média de vida. Até ao término do ano de 2012, e desde os cinco anos que o antecedem, estavam diagnosticados 32.5 milhões de casos de cancro em ambos os géneros.<sup>9-12</sup>

Através da comparação entre os valores apresentados acima e os referentes ao ano de 2008 pode verificar-se que, nos últimos anos, a doença tem ganho uma proporção cada vez maior. Nesse ano, ocorreram 12.7 milhões novos casos de cancro em todo o mundo e 7.6 milhões de mortes devidas a esta patologia. Atualmente, os países em desenvolvimento possuem taxas mais elevadas de morte relacionadas com o cancro enquanto os países desenvolvidos apresentam as maiores taxas de incidência relatadas para esta patologia. Esta discrepância deve-se sobretudo ao elevado custo do tratamento que, nos países em desenvolvimento, o torna inacessível a grande parte da população. Muitos países de África e Ásia, por exemplo, não possuem uma única máquina de radioterapia tendo esta um papel preponderante no tratamento de alguns tipos de cancros. Além disto, em alguns países desenvolvidos, o acesso ao tratamento é limitado já que depende apenas do poder económico do doente para suportar todo o tratamento ou para garantir o acesso a um seguro de saúde. Por outro lado, também o diagnóstico tardio contribui para o mau prognóstico associado a esta patologia pelo que, em alguns países, o acesso restrito a meios de diagnóstico pode ser um fator para aumentar as mortes relacionadas com casos de cancro.<sup>12-14</sup>

O cancro detém repercussões na economia mundial já que os custos associados à perda de produtividade, à morbilidade e a mortes prematuras devidas a esta patologia parecem ser superiores aos custos combinados da malária, SIDA e tuberculose. Devido

a estes números, o cancro é associado a uma doença inevitavelmente fatal sem que isso corresponda totalmente à realidade, uma vez que existem pessoas que conseguem vencer o cancro, normalmente se o diagnóstico for realizado precocemente.<sup>12</sup>

## 2.2. Os pontos-chave para a formação de neoplasias

A formação de uma neoplasia envolve não só o crescimento celular descontrolado mas também a desregulação de diversos processos fisiológicos. Num tecido normal subsiste um equilíbrio entre a divisão e a morte celular que possibilita a manutenção da arquitetura do tecido e proporciona o cumprimento da sua função. Nos tumores este equilíbrio não se verifica e as células não são reguladas pelos mecanismos de controlo, o que faz com que a sua proliferação seja exacerbada e a morte celular reduzida.<sup>15</sup>

O cancro advém, portanto, de um conjunto de processos celulares desregulados necessários para a sua proliferação, invasão e metastização, isto é, a aquisição de malignidade está meramente dependente da ocorrência destes fenómenos. Neste sentido, uma célula normal apenas se torna cancerígena quando adquire todas essas características sendo a malignidade um processo que envolve diversas etapas. A figura 2.1 resume os pontos-chave do processo cancerígeno sendo que cada um deles é posteriormente desenvolvido. Importa realçar que as mutações genéticas poderão estar na base destas características.<sup>16</sup>



**Figura 2.1** - Esquema dos pontos-chave para a formação de neoplasias. [adaptado de (16)]

### **2.2.1. Imortalização celular – o papel da telomerase**

As células humanas normais são dotadas de uma capacidade limitada para se dividirem, o que faz com que não sejam capazes de se multiplicar indefinidamente. Quando as células atingem este momento de paragem de divisão entram num estado denominado senescência replicativa caracterizado pela presença de telómeros curtos. Os telómeros consistem em várias repetições da sequência nucleotídica 5'-TTAGGG-3' localizadas nas extremidades dos cromossomas, os quais vão ficando cada vez mais curtos ao longo das diversas divisões celulares. O seu comprimento varia entre espécies de seres vivos diferentes pelo que organismos distintos possuem números diferentes de repetições dessa sequência, provocando dimensões distintas nos telómeros. A sua estrutura pode ser linear ou ligar-se a uma região complementar produzindo uma conformação em laço. Além disto, existem diversas proteínas com funções na zona telomérica as quais parecem ser responsáveis pela manutenção da sua estabilidade e proteção. Após a entrada neste estado de senescência, algumas células são capazes de o ultrapassar entrando num outro denominado crise no qual os telómeros já se encontram ausentes. Este estado conduz à ativação dos mecanismos celulares responsáveis pela apoptose.<sup>17,18</sup>

As células cancerígenas conseguem manter os telómeros ao longo das sucessivas divisões celulares através da expressão da enzima telomerase ou de um outro mecanismo baseado na recombinação homóloga denominado alongamento alternativo, os quais possibilitam que estas células se continuem a proliferar, tornando-se células imortais, capazes de se multiplicarem infinitamente. A presença desta enzima nas células tumorais comporta um recurso tanto ao diagnóstico como ao tratamento desta patologia sendo possível a utilização de fármacos para a sua inibição ou inativação. Estas terapêuticas baseadas na atividade da telomerase são dotadas de alta especificidade e baixa toxicidade uma vez que a grande maioria das células somáticas do ser humano não apresenta atividade desta enzima. A terapia génica, a imunoterapia e o uso de inibidores da telomerase integram mecanismos utilizados para reduzir ou erradicar a atividade da enzima. A combinação de inibidores da telomerase com a quimioterapia convencional, a radioterapia ou inibidores da angiogénese aumenta a eficácia do tratamento e diminui a probabilidade da recorrência da doença. As células tumorais foram inicialmente células normais capazes de superar o fenómeno de senescência replicativa através da ativação da telomerase. O encurtamento inicial dos

telómeros das células pré-cancerígenas é responsável pela instabilidade genómica destas células e desencadeia novos rearranjos a nível dos cromossomas que contribuem, também, para o processo maligno. Após a reposição dos telómeros pela telomerase a instabilidade genómica é revertida de modo a que seja compatível com a manutenção da replicação. Isto significa que, inicialmente, a instabilidade genómica conduz a alterações celulares capazes de iniciar um processo cancerígeno enquanto depois de ativada a telomerase numa célula tumoral esta instabilidade retrocede para níveis compatíveis com a proliferação celular. As células estaminais dos tecidos expressam um encurtamento dos telómeros ao contrário das células estaminais embrionárias que conservam o comprimento normal dos telómeros. A nível dos tecidos, este encurtamento aumenta progressivamente com a idade e a telomerase não é continuamente expressa, em oposição ao que ocorre em algumas células cancerígenas, nas quais esta enzima surge ininterruptamente.<sup>17,19,20</sup>

Apesar de atualmente se empregarem moléculas inibidoras da telomerase para tratamento do cancro, esta técnica não se revela totalmente eficaz já que existem algumas neoplasias humanas que conseguem manter o tamanho dos telómeros sem que esta enzima tenha sido ativado (apenas 10-15% dos tumores humanos não expressam esta enzima). Estes tumores desenvolvem-se por recurso a um mecanismo alternativo que envolve recombinação homóloga, denominado como alongamento alternativo dos telómeros (AAT). Neste sentido, recorrendo-se a inibidores da telomerase para impedir a manutenção do comprimento dos telómeros espera-se que apenas os tumores dependentes da telomerase (TDT) possam ser controlados. Além disso, a utilização dessas moléculas nos TDT pode gerar fenómenos de resistência pela ativação do AAT, o que tem como consequência a ineficácia do tratamento. Futuramente, de modo a combater estas situações de insucesso poderão também ser utilizados inibidores do AAT.<sup>21,22</sup>

As proteínas que se ligam aos telómeros formam agrupamentos e, por isso, estes são muitas vezes conhecidos como complexos núcleo-proteicos. Além da sua função protetora, estas proteínas sustentam a atividade da polimerase específica dependente de ARN, a enzima telomerase, já que na presença de mutações na sequência telomérica essas proteínas perdem afinidade de ligação ao ADN e este torna-se mais instável aumentando a possibilidade de recombinação o que conduz, portanto, ao alongamento alternativo dos telómeros.<sup>21</sup>

Segundo Heindinger e os seus colaboradores, o comprimento dos telómeros numa fase inicial da vida de um individuo é indicativo da sua esperança de vida. Indivíduos com telómeros curtos à nascença irão viver poucos anos enquanto aqueles que apresentem telómeros longos terão uma vida longa. Apesar de poder haver esta relação, os autores referem que o estilo de vida obviamente influencia a longevidade já que quando sujeitos a fatores prejudiciais, como o stress oxidativo ou condições ambientais, a taxa de encurtamento dos telómeros é acentuada. Estes autores realizaram um estudo em pássaros com o objetivo de demonstrar esta relação.<sup>23</sup>

### **2.2.2. Capacidade de proliferação celular**

Os tecidos normais possuem mecanismos de controlo celular capazes de controlar o crescimento celular. No entanto, as células cancerígenas perderam esta capacidade de regulação passando a proliferar-se indefinidamente. Este crescimento desregulado é assegurado pela ligação de fatores de crescimento a recetores membranares localizados na superfície das células. Estes recetores possuem um domínio extracelular que permite a ligação a moléculas ativadoras e um domínio intracelular constituído por uma proteína denominada tirosina quinase que ativa uma cascata de moléculas com efeito sobre o núcleo. Os recetores sofrem dimerização e posteriormente ocorre fosforilação dos resíduos de tirosina intracelulares o que conduz à ativação das vias de sinalização, nomeadamente, da ativação de fatores de transcrição responsáveis por regular a transcrição de vários genes necessários para a replicação. Existem três mecanismos diferentes através dos quais as células cancerígenas conseguem manter o sinal de proliferação. As células podem aumentar a produção de fatores de crescimento e serem estimuladas a proliferar pela sua ligação aos recetores específicos de membrana, alterar a estrutura ou os níveis dos recetores de superfície permitindo que estes sejam ativos sem que tenham sido ativados por ligandos provocando uma amplificação da resposta, respetivamente, e por último, através da ativação dos componentes intermédios da cascata de sinalização.<sup>24,25</sup>

A capacidade de proliferação das células cancerígenas relaciona-se também com a existência de oncogenes. Estes genes resultam de proto-oncogenes existentes nas células normais os quais controlam a divisão celular. A ocorrência de mutações nestes genes normais origina genes mutados então denominados oncogenes os quais, por sua vez, produzem proteínas capazes de induzir permanentemente a divisão celular. Além

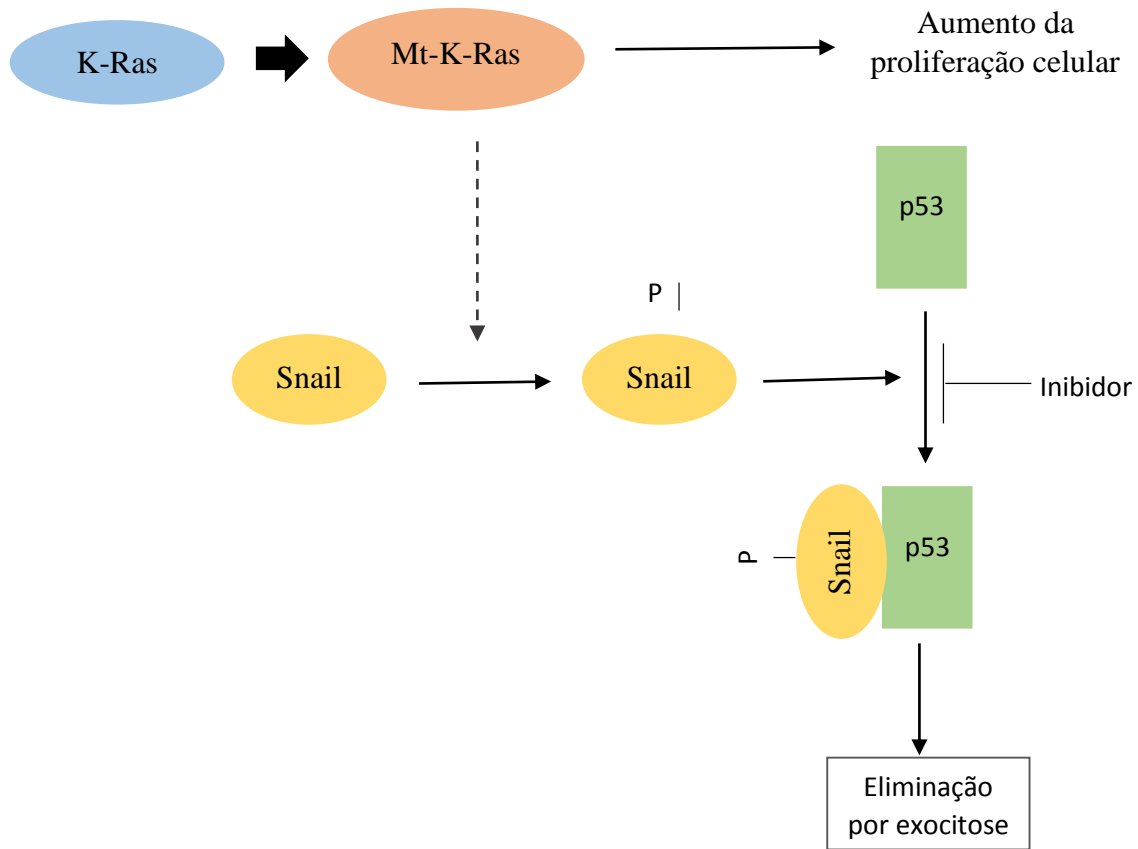
da possibilidade de ocorrência de mutações pontuais pode ocorrer amplificação do gene (aumento no número normal de cópias do gene) ou translocação, dando origem a proteínas ativas capazes de produzir um aumento da resposta biológica.<sup>15,24,26,27</sup>

O gene *ras* constitui um exemplo de um oncogene, o qual origina uma proteína denominada Ras. Esta proteína é ativada através da ligação com a guanosina trifosfato (GTP) sendo que, quando estabelece ligação com a guanosina difosfato (GDP), permanece na sua forma inativa. Quando esta proteína se torna ativa intervém na sinalização de vias celulares que controlam o ciclo celular bem como na destabilização da arquitetura tecidual, contribuindo desta forma para a progressão e invasão do tumor. Note-se que este gene está presente nas células normais sob a forma de proto-oncogene sendo que se tornou um oncogene existente em muitas células cancerígenas devido à ocorrência de uma ou várias mutações. Estas mutações impedem que a proteína seja desativada o que conduz a uma expressão contínua da mesma.<sup>28-30</sup>

### **2.2.3. Genes supressores de tumores**

A existência de genes supressores de tumores permite, também, o controlo da proliferação celular. Após a produção das proteínas resultantes desses genes, a célula é impedida de se continuar a dividir sendo o ciclo celular inibido. Inibem, então, a proliferação celular encaminhando a célula a entrar em apoptose. Desta forma, estes genes operam como um mecanismo de defesa celular.<sup>27</sup>

O gene p53 constitui um exemplo de um supressor tumoral. Este gene induz a célula a entrar em apoptose suprimindo também a metastização. Em muitos cancros a função deste gene está suprimida devido à existência de mutações ou desregulação dos níveis normais de alguns sinalizadores. Em tumores providos de ativação do gene *K-ras*, o qual pertence a uma subfamília do gene *ras*, ocorre uma inibição da proteína p53 motivada pela sua ligação à proteína Snail. Esta ligação conduz a que a proteína p53 seja eliminada da célula por exocitose tendo como consequência a inibição da supressão tumoral. A expressão da proteína Snail aumenta por indução da proteína K-Ras e, assim sendo, quando a expressão de Snail é elevada devido à expressão excessiva de K-Ras, os níveis de p53 estão muito reduzidos. Deste modo, estas duas proteínas constituem possíveis alvos terapêuticos visto que ao impedir a ligação de Snail à proteína p53 esta permanece disponível na célula, podendo exercer a sua função de inibição tumoral.<sup>31,32</sup> Este processo encontra-se esquematizado na figura 2.2.



**Figura 2.2** - Esquema explicativo do mecanismo de supressão do p53 através da ligação à proteína Snail. Ao ocorrer uma mutação no gene K-ras (que conduz à ativação constante da proteína), Snail é ativado através de intermediários que o fosforilam, originando a sua ligação ao p53. Esta ligação conduz à eliminação de p53 da célula por apoptose fazendo com que a sua função esteja comprometida. Ao inibirmos a ligação entre p53 e Snail faz-se com que p53 não seja eliminado da célula e, portanto, possa exercer a sua função de supressão tumoral [adaptado de (32)].

Existem diversos fatores que podem contribuir para a ativação do gene p53 provocando um aumento da apoptose celular. Quando a célula sofre danos a nível genético, quando ocorre um aporte insuficiente de oxigénio, quando as adesões celulares são alteradas, ou quando os oncogenes estão permanentemente ativados, a célula entra numa fase de stress que conduz a ativação do gene p53.<sup>31,33</sup>

#### 2.2.4. Invasão e metastização: A influência da matriz extracelular

A matriz extracelular (MEC) detém também extrema importância na formação e progressão dos tumores. A sua rigidez proporciona o desenvolvimento de fenómenos responsáveis pelo processo cancerígeno, nomeadamente, a proliferação e migração

celular. No cancro, os níveis de colagénio encontram-se elevados assim como os das metaloproteinases da matriz. As células têm tendência a migrar no sentido de aumentar a sua rigidez e tendem a adaptar-se ao seu substrato, pelo que ao haver um aumento da rigidez do substrato aumentam as forças de tração entre a MEC e o citoesqueleto da célula e ocorrem outras alterações ao nível da célula que conduzem ao incremento da proliferação celular. A adição de fármacos responsáveis por destruir o citoesqueleto de actina e miosina consiste numa estratégia para impedir a proliferação celular, uma vez que esta apenas ocorre quando o mesmo está ileso.<sup>34-36</sup>

Os tumores podem ser detetados por palpação física devido à sua rigidez característica. Uma MEC que possua uma rigidez acima do normal é responsável por ativar fatores de crescimento, a enzima Rho GTPase, aumentar os níveis de integrinas e várias vias de sinalização intracelulares o que origina um aumento da proliferação celular. O processo de malignidade inicia-se quando a MEC é parcialmente degradada e as adesões célula-célula enfraquecidas uma vez que isso permite que as células cancerígenas se desprendam e migrem para a corrente sanguínea ficando aptas a formar metástases noutros órgãos. Ao ser descontínua a MEC contribui, assim, para a invasão do tumor nos tecidos vizinhos. As metaloproteinases são produzidas pelos fibroblastos do estroma por indução das células neoplásicas e são responsáveis por destruir a MEC. Neste sentido, os tumores não malignos são rodeados por uma MEC intacta enquanto os malignos por uma descontínua. Além disto, a MEC que rodeia o tumor primário parece ter quebras na sua estrutura enquanto que as metástases são caracterizadas pela presença de matriz contínua.<sup>29,37,38</sup>

Em suma, numa fase de formação inicial do tumor a MEC detém uma rigidez elevada devido à acumulação dos seus componentes, o que contribui para a proliferação celular e aumento da massa tumoral. Numa segunda etapa, a MEC perde rigidez tornando-se flácida e descontínua, facilitando desta forma a migração de células cancerígenas e consequente formação de metástases.<sup>39</sup>

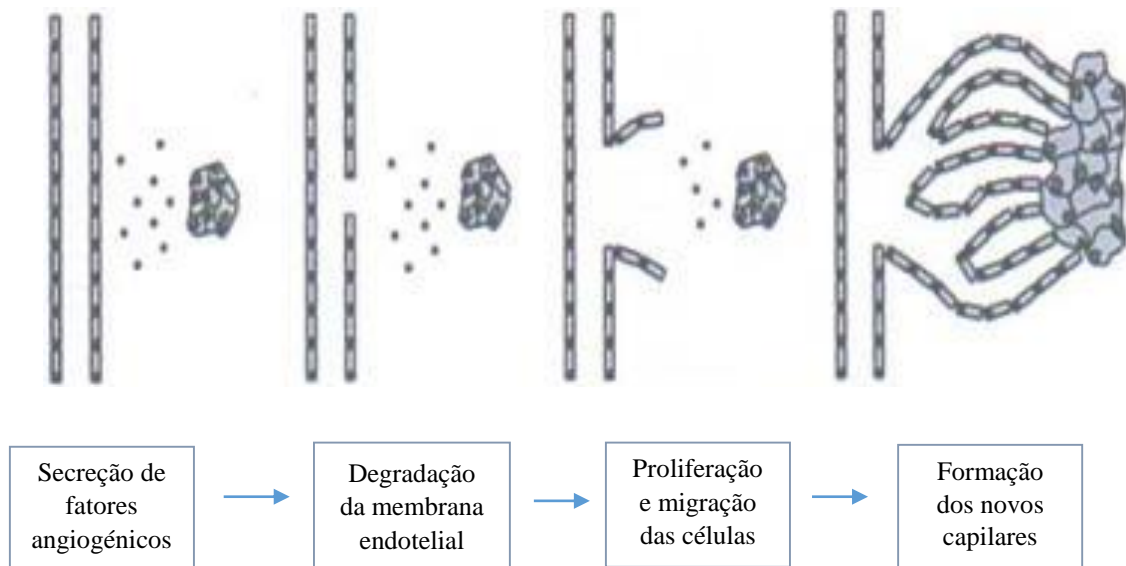
### **2.2.5. Inibição da morte celular programada**

A apoptose consiste num mecanismo fortemente regulado no qual as células, em resposta a diversos estímulos de origem química, física ou biológica, iniciam um processo de morte programada. A condensação da cromatina, a degradação do ADN e do citoesqueleto, a formação de corpos apoptóticos resultantes da destruição celular

constituem fenómenos que fazem parte deste processo. Posteriormente, são as células vizinhas que digerem os corpos apoptóticos por fagocitose. Nos tecidos normais ocorre um equilíbrio entre a morte e a renovação celular. Contrariamente à apoptose, a necrose desencadeia um processo inflamatório e ocorre o extravasamento do conteúdo celular para o meio extracelular. Existem diversas proteínas capazes de controlar a apoptose. A proteína codificada pelo gene *Bcl-2* é responsável por inibir a apoptose enquanto a do gene *Bax* é indutora da morte celular programada. As células cancerígenas são dotadas de diversas estratégias para evitar a sua própria morte de que são exemplos o aumento da expressão do gene *Bcl-2* e diminuição do gene *Bax*. Também o gene *p53* é responsável por ativar a apoptose já que aumenta a transcrição do gene *Bax* pelo que perante uma diminuição da expressão desse gene nas células cancerígenas a apoptose é inibida. Esta diminuição da apoptose nas células cancerígenas faz com que o crescimento celular seja superior à morte celular e contribui, como tal, para a progressão da doença.<sup>15,24,40</sup>

#### **2.2.6. Angiogénese**

O crescimento tumoral está profundamente dependente da angiogénese. Este processo consiste na formação de novos vasos sanguíneos em tecidos vivos. Para que um tumor prossiga o seu crescimento é imprescindível o aporte de oxigénio e nutrientes, o que é assegurado através da corrente sanguínea. Neste sentido as células cancerígenas são capazes de induzir a formação de novos vasos sanguíneos, os quais assumem também um papel preponderante na metastatização. Estes vasos sanguíneos são dotados de características diferentes dos capilares normais na medida em que possuem uma elevada permeabilidade e não são lineares, possuindo curvaturas. Após a secreção de fatores angiogénicos pelas células cancerígenas ocorre a degradação da membrana endotelial e a migração das células endoteliais em direção à origem do estímulo com posterior formação de novos capilares. Este processo está sintetizado na figura 2.3. Uma estratégia de tratamento do cancro assenta também na utilização de inibidores da angiogénese, embora esta abordagem deva ser empregada em simultâneo com fármacos direcionados a outros alvos tumorais com o objetivo de aumentar a eficácia terapêutica.<sup>15</sup>



**Figura 2.3** - Mecanismo de formação de novos vasos sanguíneos - angiogênese [adaptado de (15)].

### 2.3. Fatores de risco para o desenvolvimento de neoplasias

Durante toda a nossa vida somos confrontados com variadas situações que, podendo ou não depender de nós próprios modificá-las, nos colocam em risco a curto ou longo prazo. No caso do cancro, estes comportamentos de risco apenas se manifestam, na maior parte dos casos, passados alguns anos. Desta forma, além de fatores individuais como a idade, o sexo e a herança genética, estão também associados ao desenvolvimento de neoplasias fatores comportamentais e ambientais. O consumo excessivo de álcool, uma dieta pobre em frutas e vegetais, o tabagismo e o sedentarismo são alguns dos fatores que deixam os seres humanos mais suscetíveis ao desenvolvimento de doenças oncológicas. Alguns estudos parecem revelar que a elevada ingestão de frutas e vegetais diminui a incidência de cancro em humanos na medida em que estimula a resposta imunológica e a atividade antiproliferativa além de regular a atividade de destoxificação, aumentando a capacidade antioxidante. Certos vírus ou bactérias podem também ser responsáveis pelo desenvolvimento de neoplasias, como é o caso do vírus do papiloma humano - papilomavírus (HPV) que provoca cancro do colo do útero e a *Helicobacter pylori* (HP) que desencadeia o aparecimento de cancro gástrico. Dentro dos fatores ambientais destacam-se a poluição e a exposição à radiação ultravioleta. A primeira engloba carcinogênicos químicos que aumentam a probabilidade de desenvolvimento de cancro à medida que decorrem os anos de exposição, como é o caso dos produtos resultantes da combustão dos combustíveis

fósseis enquanto a segunda pertence a um conjunto de radiações nefastas para o ser humano. Tanto as radiações ultravioletas como os raios X constituem fontes para a lesão direta do genoma ou inibição das defesas. Existem, no nosso dia-a-dia, muitos carcinogênicos presentes, por exemplo, na comida, na água que consumimos e no ar que respiramos. Estes fatores, associados à suscetibilidade genética de alguns indivíduos, aumentam o risco de desenvolvimento de doenças neoplásicas, embora isolados possam igualmente ser responsáveis pela formação cancerígena. Do mesmo modo as mutações genéticas sozinhas podem ser responsáveis pelo surgimento destas patologias embora originem menos de 5% das neoplasias mortais.<sup>15,41 – 43</sup>

Também a idade pode ser considerada um fator de risco para o desenvolvimento de carcinomas ou sarcomas. Os carcinomas são provenientes de alterações nas células epiteliais enquanto os sarcomas têm origem nas células do mesênquima.<sup>44</sup>

#### **2.4. Contornando os mecanismos de defesa**

O organismo humano possui um sistema de defesa muito complexo, o sistema imunitário. Este é responsável por reconhecer células estranhas ao organismo e, posteriormente, desencadear um conjunto de mecanismos que conduzem à morte ou eliminação das mesmas. Neste sentido, uma célula cancerígena expressa antigénios que vão desencadear uma resposta de modo a destruí-las ou eliminá-las. Isto acontece numa fase em que o organismo ainda é capaz de se defender, destruindo as células cancerígenas que eventualmente possam surgir. No entanto, o sistema imunitário não é capaz de controlar o desenvolvimento do cancro quando este já se encontra numa fase de crescimento acentuado. Além disto, o sistema imunitário nem sempre consegue destruir essas células cancerígenas e como tal, estas permanecem no organismo aumentando a probabilidade do desenvolvimento de neoplasias. Os antigénios constituem um meio de diagnóstico e acompanhamento para as doenças cancerígenas na medida em que podem ser específicos do tumor ou encontrarem-se elevados numa situação patológica.<sup>15,44</sup>

#### **2.5. Modalidades para tratamento de neoplasias**

O tratamento do cancro baseia-se essencialmente na remoção do tumor ou na sua destruição. Atualmente existem vários métodos que podem ser utilizados isoladamente ou em associação com a finalidade de combater a doença. Os três procedimentos

principais são a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. A cirurgia está aconselhada quando o tumor está localmente localizado, não se encontrando disseminado, já que esta técnica apenas remove a massa tumoral, não eliminando possíveis células cancerígenas que já tenham atingido a circulação sanguínea (as quais podem posteriormente originar metástases). A remoção do tumor permite a sua análise e posterior caracterização. Muitas vezes, a cirurgia implica remoção de uma porção sã do tecido afetado. Ao contrário da cirurgia, a radioterapia está indicada quando o tumor já se encontra localmente infiltrado e baseia-se na irradiação do mesmo com raios X ou  $\gamma$ , embora possa também ser utilizada em tumores confinados a uma zona afetada. Este procedimento provoca danos diretos nas células cancerígenas encaminhando-as a entrar em apoptose. A quimioterapia é utilizada quando o tumor já se encontra disseminado e os fármacos têm a função de impedir a divisão celular, embora muitas vezes esta técnica não seja utilizada isoladamente. É importante realçar que tanto a radioterapia como a quimioterapia atingem não só células cancerígenas mas também as restantes células do organismo. No caso da primeira, o investimento em equipamentos cada vez mais sofisticados diminui esta probabilidade, embora não a consiga eliminar totalmente. Na quimioterapia, os fármacos atingem não só as células cancerígenas mas também células com uma renovação celular mais acentuada como as da medula óssea, as dos folículos pilosos e do epitélio gastrointestinal.<sup>15,44,45</sup>

Atualmente muitas das estratégias de combate ao cancro baseiam-se nos alvos enunciados anteriormente como pontos-chave para o desenvolvimento de neoplasias. Assim sendo, o objetivo é impedir o desenvolvimento do cancro pela inibição dos mecanismos envolvidos na sua formação, como por exemplo a inibição da angiogénese ou da enzima telomerase. Por vezes recorre-se a diversos fármacos em simultâneo para atingir diferentes alvos terapêuticos e assim aumentar a eficácia do tratamento. Isto porque as células cancerígenas desenvolvem resistência aos fármacos o que faz com que um tratamento múltiplo seja mais eficaz. Além disto, podem também ser combinados vários métodos, ou seja, pode recorrer-se à cirurgia e radioterapia ou quimioterapia por exemplo. Outras técnicas mais recentes são já utilizadas tais como a imunoterapia, que consiste na estimulação do sistema imunitário para combater o cancro, e outras como a hormonoterapia aplicada principalmente em cancros hormonodependentes.<sup>24,44,45</sup>

## 2.6. Efeitos adversos subjacentes ao tratamento de neoplasias

A grande maioria dos fármacos utilizados na quimioterapia terá efeitos nefastos para o organismo apesar de serem também os responsáveis pela cura. Alguns apresentam cardiotoxicidade já que parecem afetar o normal funcionamento do coração podendo provocar arritmias, pericardites, isquemia do miocárdio ou diminuição da função cardíaca. Uma vez que estes fármacos possuem como alvo as células cancerígenas dotadas de uma taxa de divisão celular muito elevada, vão afetar as células normais do organismo que manifestem também um divisão celular acentuada. Desta forma, a quimioterapia pode originar desidratação, mucosite, depressão e ansiedade, alopecia, diarreia, vômitos e náuseas, dores de cabeça, perda de apetite e cansaço. Todos estes efeitos secundários afetam a qualidade de vida do paciente e conduzem, muitas vezes, à desistência do tratamento. Além de todos os efeitos já referidos podem surgir também alterações no peso corporal e problemas de pele e unhas.<sup>46</sup>

Um efeito também muito importante é a mielossupressão. Devido a esta inibição da medula óssea é necessário realizar análises antes de cada ciclo de quimioterapia para que assim se garanta que os valores dos constituintes do sangue se encontram aceitáveis para a realização da mesma. A diminuição dos valores de leucócitos, linfócitos e neutrófilos pode ser um fator desencadeante para a ocorrência de infeções.<sup>44,47</sup>

Alguns pacientes apresentam náuseas e vômitos que antecedem a sessão de quimioterapia provocados, sobretudo, pela pressão e estado emocional inerentes ao tratamento. Atualmente, a quimioterapia surge associada a medicação oral que ajuda a combater os efeitos adversos causados pela mesma. Neste sentido, os pacientes são muitas vezes medicados com antieméticos e, em alguns casos, com fármacos que aceleram a reparação da medula óssea, aumentando os níveis das células sanguíneas.<sup>45</sup>

O cancro encontra-se associado a uma elevada carga emocional tanto por parte do doente como por parte dos seus familiares. Apesar de, nos dias que correm, uma elevada percentagem dos cancros diagnosticados serem curáveis, esta patologia é ainda inevitavelmente relacionada a um prognóstico desfavorável. A relação médico-doente é muito importante para a forma como o doente encara a doença bem como o apoio dos mais próximos. Eticamente, para o médico e para os restantes profissionais de saúde, existe uma árdua tarefa de distinguir se o doente deve ou não ser conhecedor de toda a

verdade relacionada com a sua doença. Isto porque o conhecimento da gravidade da sua doença pode deixar o doente ainda mais afetado psicologicamente e perder as forças para lutar. Por outro lado, pode dar-lhe ainda mais força para seguir em frente e combater a doença. No entanto, defende-se que apenas se deve contar a verdade ao doente quando este a solicitar ou quando mostrar ser capaz de a enfrentar.<sup>48,49</sup>

### 3. Nanomedicina

A nanomedicina é uma área da ciência relativamente recente que tem sido responsável por impulsionar diversos estudos ao longo dos últimos anos. Consiste na convergência da nanotecnologia com a medicina, ou seja, na utilização de materiais à escala nanométrica aplicados à saúde. Um nanómetro corresponde a um milionésimo de um milímetro ou a  $1 \times 10^{-9}$  do metro e a escala de utilização da nanotecnologia varia desde 1 nanómetro até às centenas desta unidade de medida. Neste sentido, a nanomedicina opera ao mesmo nível de muitos fenómenos biológicos já que a grande maioria das moléculas, estruturas e processos do organismo humano ocorrem nesta mesma ordem de grandeza.<sup>50,51</sup>

Embora atualmente já se empregue a nanomedicina para diagnóstico, monitorização e tratamento de algumas patologias, no futuro espera-se que a sua utilização seja muito mais alargada a todas as vertentes dos cuidados de saúde, nomeadamente na prevenção de certas patologias. Desta forma, a aplicação da nanotecnologia aos cuidados médicos possibilita um aumento da qualidade de vida da população. A aplicação da nanomedicina à saúde proporcionará diagnósticos mais eficazes bem como uma redução das doses terapêuticas, diminuindo os efeitos secundários associados. O grande objetivo dos estudos desenvolvidos nesta área assenta no desafio de um diagnóstico anterior ao aparecimento dos sintomas com consequente tratamento atempado e precoce.<sup>52,53</sup>

Este novo ramo da ciência detém, assim, utilidade em todas as fases dos cuidados de saúde e diversas patologias podem beneficiar com a sua aplicação, nomeadamente, as doenças cardiovasculares, o cancro, doenças músculo-esqueléticas, diabetes e infeções.<sup>52</sup>

Tendo por base alguns destes conceitos, surgem diversas definições para o termo nanomedicina. De acordo com a *European Science Foundation*, nanomedicina é “a ciência e tecnologia do diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças, alívio da dor de

lesões traumáticas, e a preservação e melhoramento da saúde humana com recurso a ferramentas moleculares e ao conhecimento molecular do corpo humano”. Por outro lado, a *European Technology Platform on Nanomedicine* define-a como sendo “a aplicação da nanotecnologia à saúde. Ela explora a melhoria e, muitas vezes, as novas propriedades físicas, químicas e biológicas dos materiais à escala manométrica. A nanomedicina tem um potencial impacto sobre a prevenção, o diagnóstico precoce e confiável e o tratamento de doenças”.<sup>54,55</sup>

Como aqui mencionado, o conceito de nanomedicina encontra-se intimamente relacionado com o termo nanotecnologia, consistindo este último na produção e utilização de qualquer estrutura à escala manométrica, com aplicações nas mais variadas áreas.<sup>56</sup>

### **3.1. Aplicação da nanomedicina no tratamento de doenças oncológicas**

A nanomedicina parece ser atualmente utilizada para tratamento de neoplasias em duas vertentes: vetorização de fármacos anticancerígenos através da utilização de nanotransportadores e terapia com fármacos biologicamente ativos à escala nano. A vetorização baseada na utilização de materiais à escala manométrica proporciona uma terapia localizada direcionada para as células afetadas, o que conduz a um aumento da eficácia e diminuição dos efeitos secundários. Deste modo, o recurso a vetores à escala manométrica aumenta a biodisponibilidade do fármaco transportado quando comparada com a forma isolada do mesmo.<sup>51,53</sup>

A pesquisa e construção de novos sistemas à escala nanométrica baseia-se em três objetivos principais: encontrar formas de vetorização mais específicas para alcançar o alvo terapêutico, segurança e biocompatibilidade e rápido desenvolvimento de novos fármacos. Os materiais à escala nano permitem vetorização dos fármacos uma vez que são capazes de atravessar as barreiras biológicas devido ao seu tamanho. Neste sentido, a nanovetorização possibilita uma redução dos efeitos secundários associados à quimioterapia, bem como uma diminuição da dose dos fármacos já que os mesmos atingem em maior concentração o alvo terapêutico.<sup>52,54</sup>

Os fármacos transportados podem encontrar-se na forma ativa ou pró-ativa. Na primeira, o fármaco é libertado no local de ação e encontra-se imediatamente disponível para exercer a sua função enquanto na forma pró-ativa necessita de ser ativado por enzimas do organismo formando-se, assim, um produto ativo.<sup>50</sup>

Existem vários nanossistemas empregados para a vetorização de fármacos com o objetivo de tratar diversas patologias, nomeadamente as micelas, nanoemulsões, nanopartículas, nanocápsulas, nanotubos, dendrímeros e lipossomas.<sup>54</sup>

Com o avanço da tecnologia e a descoberta de novos métodos de diagnóstico, nomeadamente na área da nanomedicina, surgem diversas questões éticas como por exemplo quando se pode considerar que uma pessoa está ou não doente. Quando lhe é detetada uma única célula cancerígena ou já desenvolveu um tumor? E o que significa tratar um doente que não apresenta nenhum sinal clínico? Tal como em todas as outras áreas da medicina, deve sempre respeitar-se a privacidade da pessoa em causa, garantindo que todos os procedimentos, quer de tratamento quer de diagnóstico, são efetuados com o seu consentimento, salvo raras exceções em que o indivíduo não esteja psicologicamente capaz de tomar decisões. Além disto deve-se facultar informação acerca dos riscos de cada procedimento e avaliá-los de acordo com os benefícios dos mesmos.<sup>52</sup>

O respeito pelo direito à privacidade do doente deve ser sempre tomado em consideração bem como o direito ao princípio da equidade. Além disto, existem opiniões muito diferentes acerca da utilização dos fundos económicos coletivos para tratamento individual através da nanomedicina, já que também pertence aos princípios éticos o melhor para o maior número de pessoas. Ao serem disponibilizados mais fundos para tratamento individual pela nanomedicina, os cuidados gerais à população poderiam ficar condicionados, pelo que subsiste uma necessidade constante de considerar os benefícios e os riscos de cada procedimento.<sup>51</sup>

### **3.2. Mecanismos e interações biológicas das nanomedicinas**

Quando se desenvolve um novo sistema nanométrico há que ter em conta alguns aspetos imprescindíveis para a obtenção de um bom resultado terapêutico, os quais também devem ser tidos em conta no momento da administração. Deste modo, revela-se de extrema importância conhecer o mecanismo de transporte e eliminação do sistema em causa pelo organismo, bem como outras interações biológicas.<sup>50</sup>

Diversos estudos devem ser realizados de forma a assegurar a eficácia e a segurança das nanoestruturas recentemente desenvolvidas. Neste sentido, ao serem planeadas devem ser ponderadas propriedades que impeçam a opsonização ou eliminação do sistema antes do mesmo atingir o seu alvo terapêutico. O mecanismo de

interação da estrutura nanométrica com as proteínas plasmáticas deve ser também considerado uma vez que influenciará o seu tempo de circulação sanguínea e, conseqüentemente, a sua eliminação.<sup>52</sup>

O objetivo da nanovetorização consiste em dirigir o fármaco para as células cancerígenas para que aí possa ser libertado e, então, concretizar a sua função. Assim sendo, revela-se de extrema importância avaliar a absorção dos nanovetores pelas células tendo em conta o tamanho e a forma destas estruturas. Além de ser necessário ajustar as características das estruturas nanométricas para a melhor eficácia praticável é também importante garantir a menor toxicidade possível para o organismo.<sup>52</sup>

Idealmente, as nanomedicinas possuem um diâmetro superior a dez nanómetros uma vez que essa propriedade permite o escape à filtração renal e conseqüente impedimento de excreção urinária. A conjugação entre o tamanho e a forma possibilita o aumento do seu tempo de semivida pelo que a duração da circulação na corrente sanguínea torna-se maior quando estas propriedades são adequadas. Por outro lado, estes sistemas devem ser menores que 100 nm para que consigam escapar à ação do sistema reticuloendotelial (RES). Além das estratégias já referidas, para maximizar o tempo de semivida destas partículas no organismo, pode efetuar-se uma peguilação, com polietilenoglicol (PEG), diminuindo-se assim a opsonização. Esta impede igualmente o reconhecimento das nanomedicinas pelo RES.<sup>57</sup>

### **3.3. Toxicologia associada às nanomedicinas**

Os nanomateriais possuem entre si propriedades químicas, físicas e biológicas diferentes que podem ser responsáveis por provocar efeitos adversos no organismo humano. Neste sentido, existe uma constante necessidade de realização de estudos toxicológicos a fim de averiguar quais os materiais mais vantajosos para uso clínico em seres humanos sendo que estes tanto devem ser biocompatíveis como biodegradáveis.<sup>51</sup>

Como as estruturas nanométricas não são eliminadas através de excreção urinária e as suas propriedades permitem-lhes escapar à ação do RES, permanecem no organismo durante longos períodos de tempo o que pode ter conseqüências nefastas para o organismo, a longo prazo. Isto é agravado pelo facto de o seu tamanho ser compatível com muitos processos fisiológicos, podendo surgir interferências. No entanto, é possível combater este efeito utilizando-se materiais que possam ser destruídos após a internalização celular.<sup>58,59</sup>

A interação das nanopartículas com as células pode dar origem a radicais livres. Estes ficam disponíveis no meio produzindo danos irreversíveis que podem mesmo conduzir à morte celular. Neste sentido, a maior razão de toxicidade causada pelos nanocomplexos deve-se à sua elevada área de superfície pelo que é importante realizar modificações superficiais que reduzam a toxicidade.<sup>53</sup>

### **3.4. As bases da nanovetorização**

O tratamento de neoplasias sólidas em humanos, com recurso à nanomedicina, tem por base diversas propriedades desses tecidos patológicos. Em baixo serão abordados dois pressupostos para a nanovetorização que, quando combinados, aumentam consideravelmente a eficácia do tratamento. Em simultâneo, possibilitam uma redução do tumor, bem como dos efeitos secundários associados à quimioterapia.<sup>51</sup>

#### **3.4.1. Vetorização passiva**

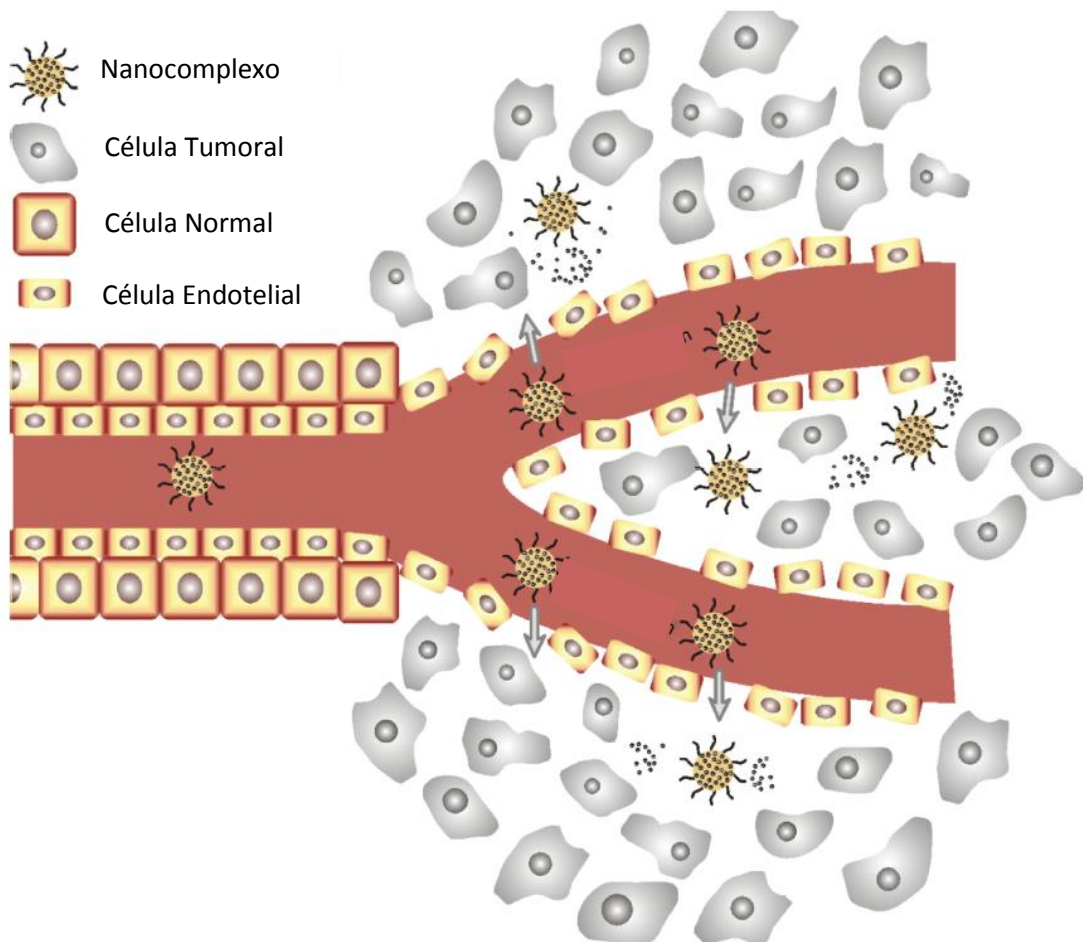
Os tumores sólidos evidenciam, normalmente, capilares sanguíneos com características muito próprias. Ao contrário do que ocorre na grande maioria dos tecidos saudáveis, na região tumoral os vasos sanguíneos são fracos e possuem alta permeabilidade. As células endoteliais são defeituosas e não se encontram rodeadas de musculatura, o que faz com que o espaçamento entre as mesmas seja superior ao normal. Devido a estas propriedades, os sistemas nanométricos circulantes, ao atingirem esta região, tendem a extravasar para o tecido tumoral onde têm, também, tendência a acumular-se. Por outro lado, como nos tecidos normais a taxa de extravasamento é menor, o fármaco não se acumula facilmente nesta região o que contribui para a proteção deste tecido. Além disto, nos tumores o sistema linfático encontra-se muito reduzido ou é quase inexistente contribuindo para a acumulação do fármaco na região cancerígena.<sup>51,57</sup>

Os fármacos anticancerígenos utilizados na sua forma livre além de serem capazes de atravessar os capilares sanguíneos dos tecidos tumorais conseguem, também, trespassar os capilares dos tecidos normais sendo, por isso, responsáveis pela grande maioria dos efeitos secundários ocorridos. Desta forma, a aplicação de sistemas nanométricos impede o extravasamento dos fármacos nos tecidos normais uma vez que estas moléculas possuem um tamanho demasiado elevado que impede a sua passagem através dos capilares sanguíneos nestes tecidos. Atualmente, muitas das técnicas de

tratamento na área da nanomedicina assentam neste fenómeno denominado efeito do aumento da permeabilidade e retenção (EPR) o qual ocorre na grande maioria dos tumores sólidos humanos. Existem, no entanto, tumores nos quais a aplicação deste método parece ser ineficaz como é o caso do da próstata e do pâncreas, por serem tumores pouco vascularizados.<sup>57,60,61</sup>

Tal como demonstrado na figura 3.1, que esquematiza o EPR, a estrutura manométrica atinge o tecido tumoral devido sobretudo à elevada dimensão dos poros endoteliais característica desta região. Além disto, esta é uma zona altamente vascularizada onde os capilares sanguíneos apresentam uma arquitetura irregular.<sup>62</sup>

O requisito mais importante nesta área é o tamanho. As nanomedicinas utilizadas para a vetorização de fármacos, como já referido anteriormente, devem possuir um diâmetro superior a 10 e inferior a 100 nanómetros. Um tamanho superior a 10 nm permite-lhes escapar à filtração renal e, por outro lado, para que possam atravessar os poros da região tumoral e escapar à ação do RES é requerido um tamanho inferior a 100 nm.<sup>62,63</sup>



**Figura 3.1** – Representação do extravasamento dos nanocomplexos na região tumoral - efeito do aumento da permeabilidade e retenção [adaptada de (64)].

### **3.4.2. Vetorização ativa**

Atualmente é possível direcionar grande parte dos fármacos para um determinado alvo terapêutico tendo por base interações entre recetores celulares e moléculas de superfície. Estas moléculas podem ser introduzidas à superfície dos nanovetores de modo a que estes sistemas sejam absorvidos por células que expressem os seus recetores, nomeadamente células cancerígenas. Isto ocorre já que a grande maioria das células cancerígenas expressa à sua superfície determinadas proteínas em quantidades muito superiores às das células normais.<sup>51,58</sup>

Além destas interações entre os recetores e os antígenos existem ainda outras formas de vetorização ativa de que são exemplos o direcionamento por recurso a anticorpos e seus ligandos ou pela interação entre as lecitinas e os carboidratos.<sup>50</sup>

### **3.5. Internalização celular das nanomedicinas**

Os sistemas nanométricos, após a passagem e acumulação no tecido tumoral, necessitam ser internalizados pelas células cancerígenas para que possam exercer a sua função. Este processo é, normalmente, assegurado por endocitose. Existem diversas estratégias para aumentar a absorção do sistema nanométrico pelas células cancerígenas. A introdução, à superfície do nanovetor, de moléculas de transferrina possibilita a interação com recetores específicos presentes na superfície das células tumorais. Estes recetores encontram-se expressos em níveis muito elevados nestas células e, por mediarem a endocitose, tornam-se responsáveis pelo aumento da internalização destas estruturas nas células. Uma outra estratégia consiste na introdução de um grupo folato na superfície do nanotransportador uma vez que os recetores dos folatos (ou ácido fólico) se encontram presentes em grandes quantidades nas células tumorais, chegando mesmo a funcionar como marcadores tumorais. O ácido fólico é necessário para a formação dos ácidos nucleicos e, como estas células têm a divisão celular aumentada, a taxa de internalização dos seus conjugados é, também, muito elevada.<sup>57,61</sup>

Após se encontrarem no interstício celular, as nanomedicinas necessitam atravessar a matriz extracelular para que possam alcançar a totalidade das células cancerígenas, o que não ocorre na realidade. Estas estruturas não são capazes de se difundir através da matriz, acumulando-se na periferia dos vasos sanguíneos. Além disto, a taxa de libertação do fármaco parece assumir, também, extrema importância. Uma rápida velocidade de libertação do fármaco faria com que este se encontrasse na

sua forma livre ainda na circulação sanguínea potenciando os efeitos secundários. Por outro lado, uma taxa de libertação extremamente lenta seria responsável pela ineficácia do tratamento já que, mesmo dentro da célula cancerígena, a concentração do fármaco na sua forma livre seria demasiado baixa. Assim, deve estabelecer-se um equilíbrio entre a força da ligação do transportador ao fármaco tendo em conta que a quebra desta ligação (libertação do fármaco) está dependente do pH, da temperatura e da clivagem enzimática. As características do tumor influenciam, também, a eficácia do tratamento e, como tal, os sistemas nanométricos com uma ligação forte entre o transportador e o fármaco revelam-se mais eficazes para tumores com elevado tempo de duplicação como é o caso do cancro da próstata, enquanto os que possuem ligações fracas e, conseqüentemente, libertam facilmente o fármaco, são mais eficazes em tumores com baixo tempo de duplicação de que é exemplo o cancro do estômago. Como o próprio nome indica, o tempo de duplicação é uma medida relativa ao período decorrido até que o tumor duplique o seu tamanho, a qual pode ser influenciada pelo grau do tumor e pela sua localização. Neste sentido, tumores com altos tempos de duplicação são, normalmente, menos agressivos e encontram-se associados a um melhor prognóstico ao contrário dos que possuem baixos tempos de duplicação.<sup>57</sup>

### **3.6. Vantagens e desvantagens da nanovetorização**

A utilização de vetores à escala nanométrica proporciona um aumento da solubilidade de certos fármacos fazendo com que o seu tempo de circulação na corrente sanguínea se torne maior. Assim, o fármaco fica disponível durante um longo período de tempo fazendo com que a sua concentração no tecido alvo se mantenha elevada durante mais tempo. Além disto, havendo uma estrutura que envolve o fármaco, são asseguradas condições de proteção do mesmo, evitando-se o rápido metabolismo, reações imunológicas e a eliminação ainda na corrente sanguínea, antes de atingir o alvo terapêutico.<sup>51,60,61</sup>

Algumas condições são imprescindíveis para a eficácia e segurança da terapêutica com recurso à nanovetorização. Os materiais utilizados, nomeadamente para a construção dos nanovetores, devem ser biodegradáveis e biocompatíveis a fim de causar o menor dano possível no organismo humano. Além disto, devem ser estáveis no organismo para que se possam manter o maior tempo possível na circulação sanguínea.<sup>61,63</sup>

Enquanto os fármacos livres se disseminam facilmente por todo o organismo, provocando acentuados efeitos secundários e resultando num elevado volume de distribuição (Vd), os nanovetores permitem um direcionamento mais específico para as células cancerígenas fazendo com que o Vd seja menor e verificando-se, como tal, uma diminuição das consequências nefastas e um aumento da eficácia terapêutica. Neste sentido, a janela terapêutica torna-se maior, o que possibilita ajustes baseados em determinadas condições do doente. O efeito do aumento da permeabilidade e retenção contribui, também, para a acumulação do fármaco no tecido tumoral enquanto diminui a presença nos tecidos saudáveis. Isto ocorre uma vez que o fármaco é capaz de trespassar os vasos sanguíneos da região tumoral embora nos tecidos saudáveis permaneça na corrente sanguínea.<sup>57,60,62</sup>

A libertação do fármaco pode ser controlada levando a que esta ocorra sob determinadas condições de pH ou perante a presença de certas enzimas garantindo-se, assim, a sua ação no alvo terapêutico. Além disto, os nanovetores podem ser adaptados de modo a maximizar a internalização pelas células tumorais.<sup>51,62</sup>

A encapsulação de fármacos em materiais resistentes à atuação das bombas de efluxo presentes nas células permite aumentar a retenção dos mesmos no citoplasma celular e, assim ultrapassar mecanismos de resistência. Devido à elevada razão entre a área de superfície e o volume, o mesmo nanovetor encontra-se apto a carregar várias moléculas de fármaco<sup>7,65,66</sup>

A nanovetorização parece estar intimamente dependente do grau de vascularização da região tumoral. O tratamento revela-se mais eficaz em tumores altamente vascularizados uma vez que o sistema nanométrico é capaz de atingir um maior número de células cancerígenas. Ao contrário, se o tumor for pouco vascularizado o fármaco (contido no nanoveículo) não atinge a região tumoral em concentrações terapêuticas. Isto constitui uma desvantagem da nanovetorização.<sup>62</sup>

O manuseamento de materiais à escala nanométrica torna-se bastante complexo devido às interações e forças a este nível.<sup>59</sup>

A gradual aplicação da nanomedicina aos cuidados da saúde conduz à crescente necessidade de implementação de leis que regulem o exercício neste campo. Embora atualmente se torne ainda muito dispendioso optar por estes recursos, a sua utilização terá grande impacto na economia do futuro já que possibilita uma prevenção precoce e um tratamento mais eficaz para algumas doenças. Assim, os custos associados ao

tratamento de certas patologias diminuem por serem detetados numa fase ainda muito precoce. É necessário avaliar a relação risco benefício quer em termos económicos como em termos ambientais. Apesar de envolver, ainda, procedimentos muito dispendiosos, os benefícios da sua utilização parecem justificar esse investimento.<sup>53, 59,63</sup>

O quadro 3.1 resume as vantagens e desvantagens da nanomedicina aqui explicadas.

**Quadro 3.1** – Resumo das vantagens e desvantagens da nanovetorização de fármacos anticancerígenos.

Vantagens	Desvantagens
Aumento da solubilidade	Ineficácia em neoplasias pouco vascularizadas
Proteção do fármaco	Acumulação na periferia dos vasos
Reduzida toxicidade sistémica	Elevados custos económicos
Direcionamento para as células tumorais	Manuseamento difícil
Capacidade de carga	
Aumento da absorção celular	
Controlo da taxa de libertação do fármaco	
Ultrapassar barreiras fisiológicas	
Transpor mecanismos de resistência	

### 3.7. Tipos de nanovetores

#### 3.7.1. Micelas

As micelas são estruturas esféricas com um tamanho que varia de 10 até 100 nanómetros. Possuem um núcleo hidrofóbico e uma superfície hidrofílica tornando-se, por isso, preciosas para o transporte de compostos pouco solúveis em água. Estas propriedades ficam a dever-se à sua constituição rica em lípidos anfipáticos. Devido à sua estrutura, as micelas estão aptas a transportar moléculas com diferentes polaridades. Uma molécula hidrofóbica é encapsulada no interior da micela, ou seja, no seu núcleo, uma molécula hidrofílica é adsorvida à sua superfície e, por último, uma molécula com uma polaridade intermédia é incorporada no seio da sua estrutura anfipática.<sup>8,66,67</sup>

A formação micelar envolve um mecanismo de montagem imediata que ocorre quando a entropia do solvente aumenta em simultâneo com uma diminuição da energia de Gibbs. Para que isto se torne possível, é ainda necessário que a concentração das moléculas anfipáticas do meio atinja um determinado valor, designado concentração micelar crítica (CMC), abaixo do qual não ocorre formação de micelas.<sup>67</sup>

Existem dois tipos de micelas, as poliméricas e as convencionais. As primeiras possuem polímeros associados aos lípidos da sua constituição, enquanto as segundas não os contém, podendo ser constituídas por diferentes tipos de fosfolípidos. Além disto, as micelas poliméricas apresentam um reduzido valor de CMC, uma elevada viscosidade no núcleo e uma superfície muito hidratada. Desta forma, este tipo micelar é o escolhido para servir as funções de vetorização de fármacos.<sup>67</sup>

Diversos polímeros são incorporados à superfície das micelas com o objetivo de as tornar inertes na corrente sanguínea, como já abordado nos capítulos anteriores. Neste caso, os mais utilizados são o PEG, álcool polivinílico e polivinilpirrolidona.<sup>20</sup>

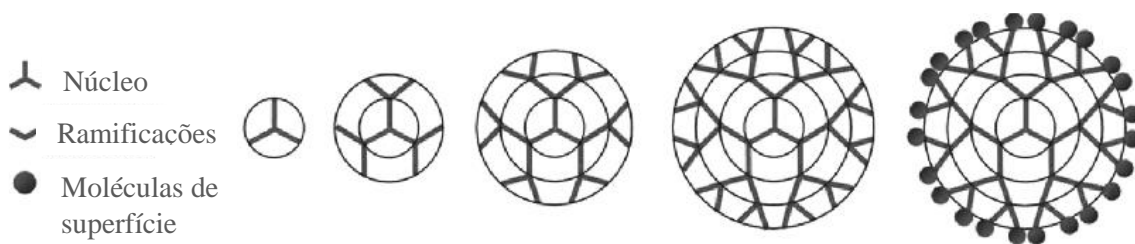
Kenmotsu e os seus colaboradores publicaram, em 2010, um artigo sobre um estudo no qual é demonstrada a eficácia anticancerígena de um composto micelar. Neste estudo, a molécula 7-etil-10-hidroxicamptotecina, mais conhecida como SN-38, foi incorporada em micelas poliméricas possuindo um diâmetro que rondava os 20 nm. Este composto detinha um elevado tempo de semivida no plasma devido, sobretudo, à presença do polímero PEG na superfície da micela. Por ser uma estrutura micelar, a sua eficácia depende intimamente do grau de permeabilidade dos capilares sanguíneos do tumor e revela ser superior à do composto isolado. Foi demonstrada que a acumulação deste composto no tumor é mais elevada do que a do SN-38 isolado. Neste estudo, além disto, os autores concluem também que a utilização simultânea deste composto com um anticorpo monoclonal, que por interação com o fator de crescimento endotelial vascular diminui o grau de vascularização e a permeabilidade, contribui para melhorar os resultados de inibição tumoral.<sup>69</sup>

### **3.7.2. Dendrímeros**

Os dendrímeros são estruturas poliméricas altamente ramificadas constituídas por um núcleo (região interior) e pela superfície (região exterior). A sua síntese requer uma sucessão de reações químicas que ocorrem no núcleo e possuem uma estrutura definida. A geração desta molécula é definida pelo número de ramificações existentes,

uma vez que à medida que se vão introduzindo mais ramificações a geração aumenta e a última camada torna-se a superfície da estrutura, a qual possui grupos funcionais livres.<sup>63,67</sup>

Existem dois métodos para produzir os dendrímeros, o divergente e o convergente. No primeiro, a síntese é iniciada pelo núcleo sendo que posteriormente se vão introduzindo as sucessivas camadas de ramificações. Por outro lado, no convergente, o interior da molécula é construído a partir dos grupos funcionais da sua superfície. Comparativamente, a técnica divergente é mais suscetível à ocorrência de defeitos na estrutura da molécula já que requer várias reações químicas numa mesma molécula (o núcleo inicial), ao contrário do que sucede no método convergente, no qual existem múltiplas moléculas iniciais (as de superfície). A figura 3.2 representa a construção de um dendrímero da quarta geração, bem como a sua estrutura final, obtido através de uma técnica divergente.<sup>70,71</sup>



**Figura 3.2** – Esquema da construção de um dendrímero da quarta geração pela técnica divergente [adaptada de (63)].

Atualmente, estes vetores usufruem de uma vasta gama de aplicações. Podem ser utilizados como agentes de contraste ou sensores em diagnóstico, como vetores para aumentar a atividade farmacológica de determinados fármacos e ainda em técnicas para diminuir a cicatriz após uma intervenção cirúrgica. Os compostos podem ser transportados no seu interior ou ligados à sua superfície por ligações covalentes.<sup>66,70</sup>

A baixa toxicidade e imunogenicidade, a elevada biocompatibilidade, a alta capacidade de carga (devido à sua estrutura interna), o controlo da arquitetura, da forma e do tamanho, assim como a possibilidade de adaptação das moléculas de superfície (permite aumentar a afinidade para determinados alvos) são propriedades deste tipo de

nanovetores. Além disto, estas estruturas são capazes de penetrar facilmente nas células.<sup>66,68</sup>

Tal como no caso das micelas, é possível aumentar a sua estabilidade por introdução de polímeros superficiais.<sup>55</sup>

Hoje em dia, os dendrímeros mais estudados são denominados de poliamidoamina (PAMAM). Como o nome sugere, os PAMAM possuem elevado número de grupos amina os quais podem ser controlados de acordo com a molécula a ser transportada. O paclitaxel, por exemplo, é um fármaco cancerígeno que pode ser incorporado dentro destas estruturas de forma a estimular a eficácia terapêutica do fármaco.<sup>72</sup>

### **3.7.3. Nanopartículas poliméricas**

As nanopartículas podem ser agrupadas em dois grupos, as nanoesferas e nanocápsulas. Enquanto as primeiras são constituídas por um interior compacto (matriz), onde o fármaco se encontra regularmente disperso, as segundas possuem uma cavidade central oca rodeada por uma membrana polimérica.<sup>55,73</sup>

Estas estruturas são produzidas a partir de polímeros sintéticos ou naturais e, se não forem adaptadas, os mecanismos de defesa do organismo reconhecem-nas como substâncias estranhas ativando os processos de eliminação. Como tal, para contrabalançar esta rápida excreção, introduz-se um polímero, por exemplo o PEG, na sua superfície o que proporciona um aumento do tempo de circulação sanguínea. O fármaco é encapsulado no interior da nanopartícula no momento da sua síntese ou, por outro lado, é adsorvido à sua superfície após a sua síntese.<sup>74</sup>

O elevado potencial das nanopartículas para aplicações na área da medicina encontra-se relacionado com a sua estrutura química, a elevada biocompatibilidade, a eficiente endocitose a nível celular e ainda com a capacidade de transporte de uma vasta gama de moléculas. Estas propriedades permitem a síntese de nanopartículas capazes de encapsular fármacos diferentes, tendo por objetivo a atuação em diferentes alvos no tumor. Torna-se, assim, possível aumentar o efeito terapêutico associado ao tratamento conduzindo a um combate mais eficaz da neoplasia. Além disto, é ainda possível desenvolver estas mesmas nanopartículas, denominadas multifuncionais, com a finalidade de transportar compostos orgânicos e inorgânicos, ou fármacos e agentes de diagnóstico, em simultâneo.<sup>68</sup>

O polímero mais frequentemente empregado para a formação de nanopartículas é o ácido poliláctico-glicólico visto que parece ser biodegradável e origina, após hidrólise, dois monómeros com efeitos tóxicos muito reduzidos, os ácidos láctico e glicólico. Apesar de este polímero se encontrar aprovado pela FDA para esta finalidade, outros podem ser utilizados para fins terapêuticos desde de que sejam biodegradáveis.<sup>74</sup>

O Abraxane<sup>®</sup> foi aprovado pela FDA a 6 de setembro de 2013 para tratar neoplasias pancreáticas. Este é um composto à escala manométrica que consiste em nanopartículas transportadoras de paclitaxel conjugado com albumina. Este complexo migra para o tecido tumoral através do EPR e, além disto, a entrada nas células tumorais é mediada pela glicoproteína gp60, envolvida no mecanismo de transcitose da albumina endógena.<sup>60,75</sup>

#### **3.7.4. Nanopartículas inorgânicas**

Um exemplo de nanopartículas com grande impacto clínico são as de ouro. Estas nanoestruturas possuem funções em diversas patologias, nomeadamente, na malária, na SIDA e em neoplasias. O ouro detém, além disto, propriedades antimicrobianas. A sua utilidade, em oncologia, encontra-se relacionada com a capacidade de transporte de fármacos anticancerígenos altamente tóxicos, tornando possível a sua administração por redução dos mesmos.<sup>70</sup>

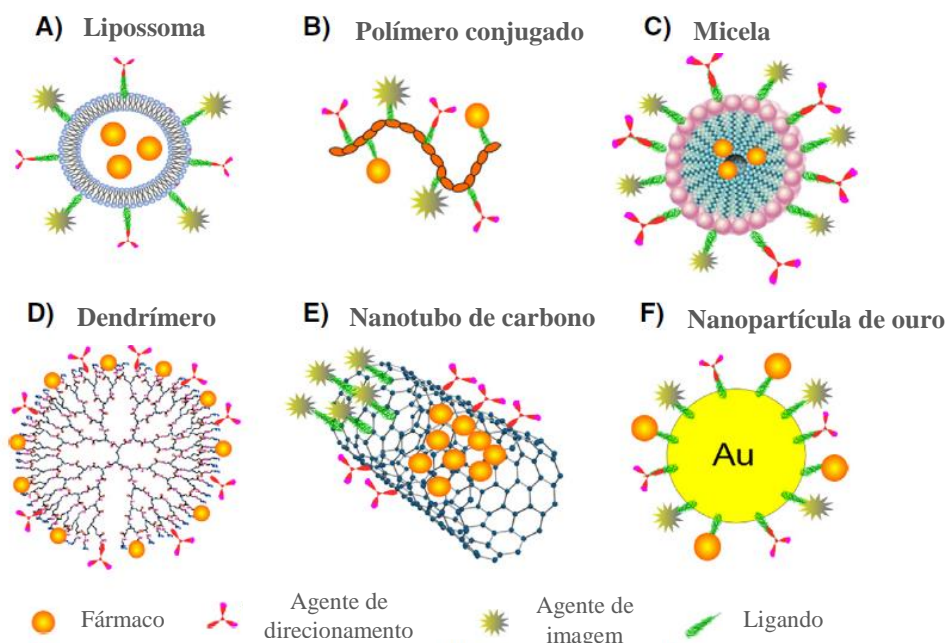
#### **3.7.5. Nanotubos de carbono**

Estas estruturas nanométricas tubulares providenciam uma elevada área tanto à sua superfície como também no seu interior. Por esta razão, existe a possibilidade de ligação de diversos ligandos bem como da encapsulação de fármacos na sua região interna. São dotados de condutividade elétrica o que parece estar associado a diversas aplicações na área da oncologia. Relativamente à sua estrutura, uma parede simples ou múltipla integra a sua constituição. Os nanotubos podem ser utilizados como agentes de contraste ou incorporar fármacos, como o paclitaxel, e ácidos nucleicos. Isto torna-se possível uma vez que o tamanho destes nanocomplexos impede o desenvolvimento de reações inflamatórias.<sup>76,77</sup>

### 3.7.6. Polímeros conjugados

Estes tipos de transportadores nanométricos são constituídos pela ligação entre um polímero e um fármaco, ou molécula pretendida, geralmente por recurso a uma ligação química capaz de ser quebrada. Esta estratégia baseia-se no facto de os polímeros empregados serem semelhantes aos do organismo e, assim, poderem integrar as vias metabólicas desses compostos.<sup>78</sup>

Na figura 3.3 encontram-se representados os tipos de nanovetores explicados anteriormente e os lipossomas serão abordados no próximo capítulo.



**Figura 3.3** – Representação das estruturas de diferentes nanovetores [adaptada de (77)].

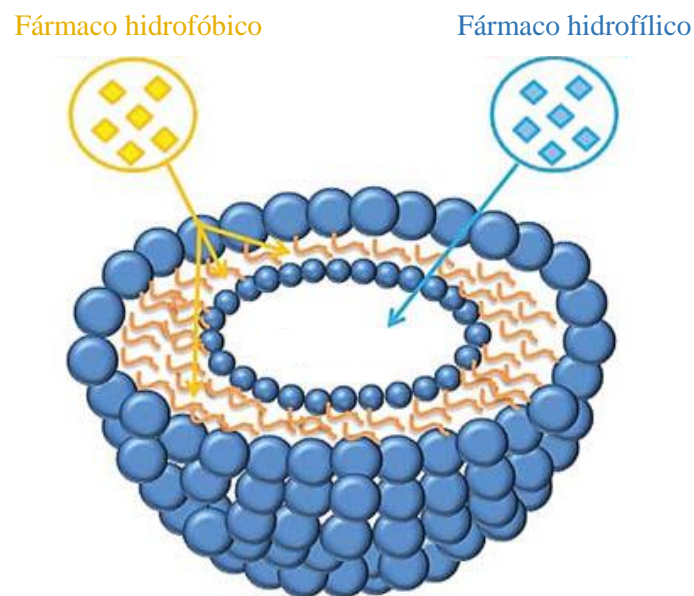
### 3.7.7. Lipossomas

Os lipossomas podem formar-se espontaneamente a partir de lípidos naturais que se organizam em vesículas quando são hidratados. Estes foram descritos pela primeira vez em 1965 e constituem, atualmente, um excelente recurso para o transporte e direcionamento de fármacos anticancerígenos, contribuindo para aumento da eficácia terapêutica e diminuição dos efeitos secundários. Atualmente, muitos fármacos têm sido, por isso, encapsulados nestas estruturas.<sup>79</sup>

Os próximos capítulos focam com detalhe estes nanovetores no âmbito da sua descrição genérica e aplicação específica na terapêutica de tumores sólidos.

#### 4. Lipossomas

Os lipossomas são estruturas esféricas constituídas por uma ou várias bicamadas de fosfolípidos, que compõem a sua membrana. Os fosfolípidos são lípidos anfipáticos, os quais, possuem, por isso, uma cabeça hidrofílica e duas caudas hidrofóbicas. Estes organizam-se de modo a que as suas cabeças polares fiquem voltadas para o meio aquoso enquanto as caudas se encontrem em contato umas com as outras. Desta forma, o lipossoma é constituído por uma cavidade hidrofílica e uma dupla membrana hidrofóbica, sendo a composição do meio aquoso presente no seu núcleo, na maioria das vezes, a mesma do que a do seu meio exterior, que o rodeia (a estrutura de um lipossoma encontra-se esquematizada na figura 4.1). A sua constituição torna estas estruturas biocompatíveis uma vez que, após sofrerem rutura, os fosfolípidos podem ser inseridos na membrana celular.<sup>8,80</sup>



**Figura 4.1** – Representação esquemática da estrutura de um lipossoma e local de encapsulação para um fármaco hidrofílico e outro hidrofóbico [adaptada de (81)].

Tal como apresentado na figura 4.1, os lipossomas são capazes de transportar compostos hidrofílicos ou hidrofóbicos pois podem encapsulá-los no seu núcleo ou inseri-los na sua membrana, respetivamente.<sup>82</sup>

Os fosfolípidos mais utilizados são os que possuem carga neutra como por exemplo a fosfatidilcolina. No entanto, outros, com carga negativa, podem ser também utilizados. O ácido fosfatídico, fosfatidilserina, fosfatidiletanolaina e fosfatidilglicerol são exemplos de fosfolípidos com carga negativa, os quais diferem sobretudo na sua cauda hidrofóbica. Por vezes há necessidade de formação de lipossomas catiónicos pelo que se recorre, nesses casos, à utilização de estearilamina. É a composição desses lípidos, mais propriamente a quantidade de ligações duplas que os constituem, a principal responsável pela elasticidade da estrutura.<sup>80</sup>

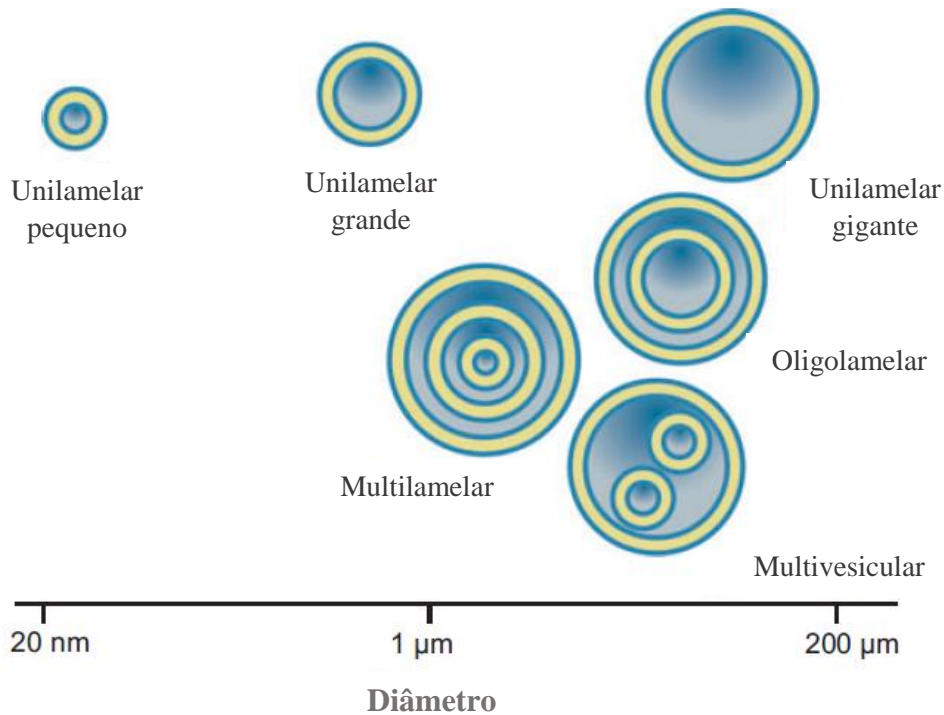
O colesterol faz muitas vezes parte da bicamada de fosfolípidos dos lipossomas. A sua presença permite aumentar a estabilidade dessa membrana bem como reduzir a sua permeabilidade. Além disto, as propriedades dos lipossomas dependem essencialmente da sua constituição, do seu tamanho, da sua carga e até do seu método de preparação.<sup>63,83</sup>

O número de bicamadas que possui a estrutura é proporcional ao número de compartimentos hidrofílicos. Isto significa que, se um lipossoma for constituído por apenas uma membrana lipídica terá apenas uma região hidrofílica, contudo se, por outro lado, ele possuir duas ou mais membranas terá o mesmo número dessas regiões.<sup>82</sup>

Estas nanoestruturas são rapidamente fagocitadas pelos macrófagos do sistema imunitário, se não sofrerem nenhuma modificação da sua superfície como a peguilação. Por outro lado, quando são aptas a escapar à ação do RES, a libertação do fármaco encapsulado é realizada perante uma alteração do pH do meio.<sup>70</sup>

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com o seu tamanho e o número de bicamadas que fazem parte da sua constituição. Para cada bicamada fosfolipídica é adotada a designação de lamela. Sendo assim, os lipossomas são divididos em três grandes grupos. Se possuírem apenas uma única bicamada fosfolipídica denominam-se vesículas unilamelares. De acordo com o seu tamanho, esta classe de lipossomas, pode ser dividida noutros três grupos: os pequenos, grandes e gigantes. As propriedades da membrana desta classe são bem conhecidas e a sua preparação não requer processos muito complexos, um fator favorável à sua aplicação industrial. Dentro desta classe, os pequenos (SUV) possuem um diâmetro entre os 20 e os 40 nm, os grandes entre os 40 e

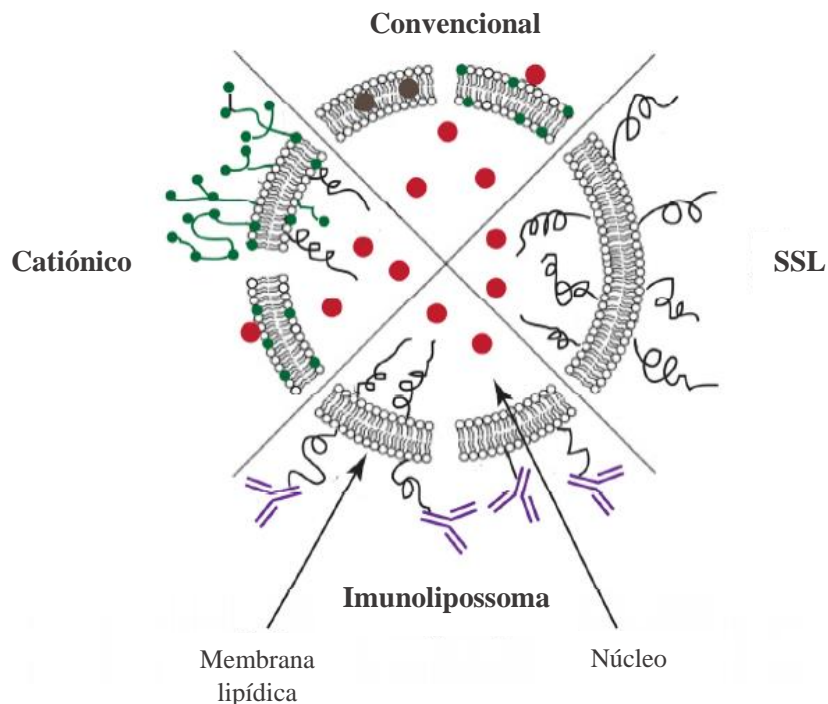
80 nm. Por outro lado, se os lipossomas possuírem várias bicamadas fosfolipídicas, denominam-se multilamelares (MLV) enquanto os oligolamelares (OLV) podem possuir entre duas a dez membranas. Na figura 4.2 estão esquematizados os diferentes tipos de lipossomas tendo por base esta classificação.<sup>80</sup>



**Figura 4.2** – Representação esquemática dos diferentes tipos de lipossomas, de acordo com a classificação baseada no seu tamanho e número de bicamadas [adaptada de (80)].

Além desta classificação surge ainda outra, baseada na composição destas estruturas. Os chamados lipossomas convencionais são aqueles que apenas possuem fosfolípidos na sua membrana celular, podendo apresentar ou não colesterol. Estes podem ser os neutros ou os carregados negativamente. Como não apresentam qualquer alteração à sua superfície, este grupo de lipossomas possui grandes desvantagens já que o seu tempo de circulação na corrente sanguínea é reduzido, sendo rapidamente reconhecidos pelo RES e, assim, eliminados. Outro grupo são os lipossomas estericamente estabilizados (SSL). Estes exibem um elevado tempo de circulação sanguínea pelo facto de se encontrarem revestidos por polímeros. Estes lipossomas são, muitas vezes, denominados de “stealth”. Existem também os chamados imunolipossomas, os quais podem ser estabilizados com recurso à utilização de polímeros e, além disto, possuem anticorpos ou fragmentos destes na sua superfície.

Desta forma, os imunolipossomas são direcionados para um alvo específico. Por último, surge um outro grupo, os lipossomas catiónicos. Tal como o nome indica, estes são carregados positivamente e têm sido alvo de investigação para transporte de material genético. Podem ser aplicados noutras vertentes da oncologia visto que possuem grande facilidade de ligação com o endotélio vascular e locais inflamados. As estruturas destes lipossomas encontram-se esquematizadas na figura 4.3, apresentada em seguida.<sup>79,84,85</sup>



**Figura 4.3** – Representação das estruturas dos classificados consoante a sua composição – lipossoma convencional, catiónico, estericamente estabilizado (SSL) e imunolipossoma [adaptado de (79)].

#### 4.1. Vantagens e desvantagens da vetorização de fármacos anticancerígenos por lipossomas

Estas nanoestruturas constituem um excelente recurso para a vetorização de fármacos uma vez que exibem diversas características vantajosas para esse fim. Os lipossomas podem ser originados através de lípidos que fazem parte do organismo humano, o que tem como consequência a sua elevada biocompatibilidade e segurança. É possível controlar o seu diâmetro, muito embora a sua produção seja realizada de modo simples e rápido, em larga escala. Outra característica muito importante assenta na capacidade de transporte de moléculas lipossolúveis e hidrossolúveis. As primeiras integram-se na membrana lipídica enquanto as segundas são encapsuladas no núcleo.

Pode criar-se um gradiente químico na sua membrana originando a possibilidade de encapsulação de diferentes moléculas. A facilidade de modificação da sua superfície permite regular a internalização celular, o escape endossomal e o direcionamento para um alvo terapêutico específico.<sup>86,87</sup>

Ao serem constituídos por compostos naturalmente presentes no organismo humano, os lipossomas provocam uma reduzida toxicidade no mesmo, o que os torna ainda mais apelativos para uso clínico.<sup>85</sup>

Além de todas estas vantagens, os lipossomas contribuem, também, para a proteção do fármaco transportado fazendo com que este fique menos suscetível à ação dos mecanismos de defesa do organismo. Permitem ainda a redução dos efeitos causados pelo fármaco em tecidos saudáveis, já que reduzem a quantidade do mesmo que os atinge. Além disto, o fármaco está protegido e, como tal, não sofre degradação ainda na corrente sanguínea. Tudo isto permite reduzir a dose de fármaco necessária para obter um efeito terapêutico, visto que o fármaco atinge a região tumoral em concentrações mais elevadas.<sup>82,88,89</sup>

Através da possibilidade de funcionalização da superfície dos lipossomas, estes tornam-se passíveis de serem direcionados para as células cancerígenas. Para este fim, introduzem-se polímeros ou anticorpos na sua superfície. Isto, além de permitir reduzir a toxicidade associada ao tratamento com fármacos anticancerígenos isolados, conduz, também, ao aumento da eficácia do tratamento. O emprego de fármacos anticancerígenos sem recurso a nanovetores obriga a um controlo rigoroso das doses administradas, de forma a haver um equilíbrio entre a dose que causa toxicidade e a dose eficaz. Neste sentido, não é necessário um ajuste tão profundo das doses administradas dos mesmos fármacos, quando estes são vetorizados por lipossomas.<sup>90</sup>

Além da possibilidade de vetorização ativa, estes nanovetores são, também, capazes de transportar o fármaco, acumulando-o na região tumoral devido ao EPR, ou seja, por vetorização passiva. Os lipossomas atravessam os vasos sanguíneos da região tumoral devido ao seu tamanho, o qual é compatível com a dimensão nos poros dos capilares desta área. Por esta ser altamente vascularizada, este efeito é exacerbado e os lipossomas atingem facilmente o tumor. Por outro lado, devido aos reduzidos níveis de vasos linfáticos nesta zona, os lipossomas ficam retidos sem que sejam capazes de abandoná-la.<sup>89</sup>

As células cancerígenas desenvolvem mecanismos de múltipla resistência a fármacos, razão pela qual, por vezes, a quimioterapia convencional, deixa de ser eficaz. A glicoproteína P (gP) é a principal responsável por expulsar os compostos para o exterior da célula. Assim sendo, o objetivo primordial para reduzir a atuação desta bomba de efluxo é mantê-la saturada, pelo que os lipossomas podem também contribuir para esse acontecimento devido à rápida libertação do fármaco.<sup>90</sup>

No entanto, os lipossomas possuem também algumas desvantagens. A solubilidade, a rápida libertação do fármaco, a instabilidade de armazenamento e o reduzido tempo de semivida constituem as principais limitações. De forma a solucionar esta rápida libertação do fármaco, existem várias moléculas que devem ser introduzidas à superfície do lipossoma para que, na corrente sanguínea, a formulação se mantenha estável, e atingindo o alvo terapêutico, este possa ser libertado em grandes quantidades. O éter vinílico, os dissulfuretos e as hidrazonas compõem exemplos dessas moléculas.<sup>87</sup>

Os fosfolípidos da membrana dos lipossomas podem sofrer reações de hidrólise e oxidação, embora este acontecimento seja muito raro. Além disto, a sua produção acarreta elevados custos. Estes dois acontecimentos constituem, também desvantagens da utilização de lipossomas.<sup>83</sup>

Qualquer elemento estranho ao organismo é reconhecido como tal e pode, então, ser fagocitado pelos componentes do RES. Este processo é facilitado pela ligação de anticorpos à sua superfície, num processo denominado de opsonização. A peguilação dos lipossomas impede este reconhecimento e, conseqüente, eliminação dos mesmos. Além deste mecanismo, os lipossomas podem também ser excretados por via renal. A peguilação não só impede este reconhecimento como também aumenta o tempo de circulação na corrente sanguínea, o que conduz à maior disponibilidade do fármaco durante um período de tempo mais alargado.<sup>79,89,90</sup>

Vários conjugados de fármacos com lipossomas foram já aprovadas para uso clínico, entre os quais a doxorubicina lipossômica. Outros exemplos são: a daunorrubicina lipossômica (DaunoXome<sup>®</sup>), a citarabina lipossômica (DepoCyt<sup>®</sup>) e a morfina (DepoDur<sup>®</sup>).<sup>85,91</sup>

A eficácia da vetorização por lipossomas depende de alguns fatores importantes, os quais podem condicionar os resultados da terapêutica. Torna-se essencial os lipossomas serem dotados de elevada estabilidade na circulação sanguínea uma vez que isso permite aumentar o seu tempo de semivida e, conseqüentemente, a duração do

efeito terapêutico. O direcionamento para a região tumoral e a capacidade de liberação do fármaco nessa região constituem fatores de extrema importância pois só assim é possível garantir que o fármaco atinge o tumor em concentrações terapêuticas capazes de controlar o seu crescimento. A adaptação das propriedades dos lipossomas é, por isso, essencial. A eficiência de encapsulação do fármaco permite garantir que o mesmo é transportado nas concentrações adequadas. Assim, quanto maior for a capacidade de encapsulação dos lipossomas, menor será o número de nanoveículos necessários para transporte.<sup>79</sup>

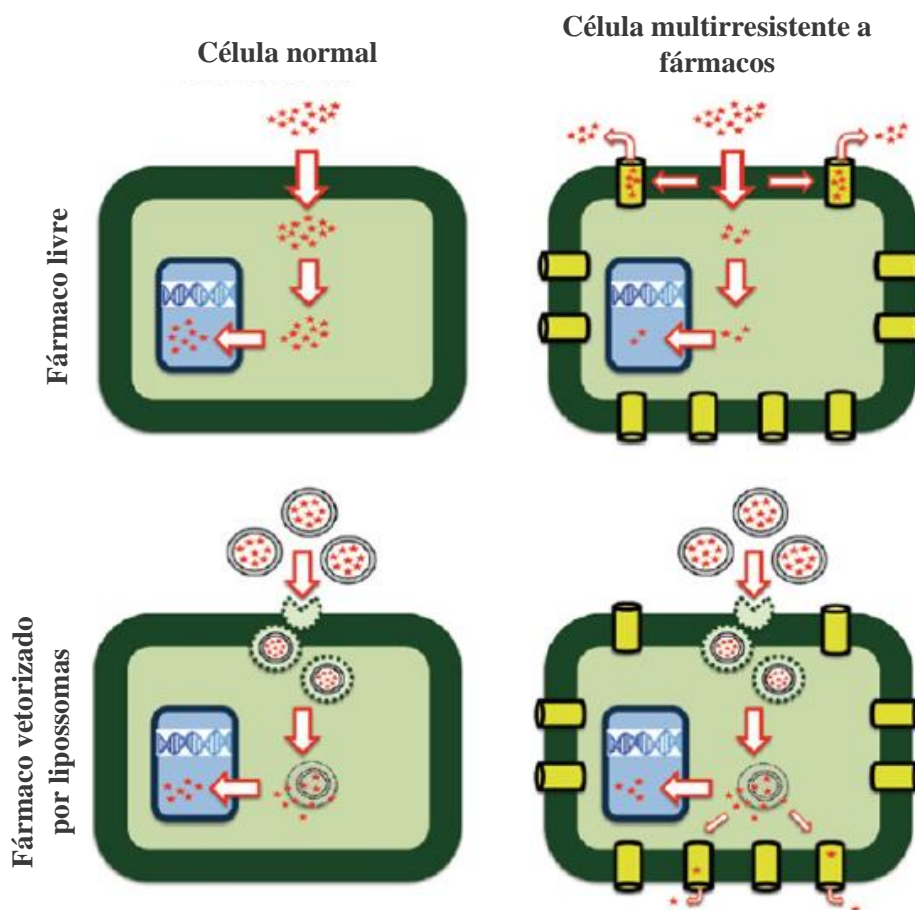
#### **4.2. Interação dos lipossomas com a célula**

Após interação do lipossoma com a célula alvo, isto é, da ligação do ligando presente no lipossoma com o respectivo receptor da célula, ocorre a internalização da nanoestrutura. Este mecanismo ocorre por endocitose. Dentro da célula, o lipossoma é sujeito a diferentes valores de pH, o que provoca a sua destabilização e consequente liberação do fármaco encapsulado. Nas células tumorais o ambiente é mais ácido do que o das restantes células do organismo. Este inferior valor de pH favorece a liberação do fármaco encapsulado em lipossomas suscetíveis a meios ácidos. Neste sentido, para que os lipossomas sejam dotados de características que os tornem sensíveis ao pH das células cancerígenas, podem-se introduzir à superfície dos lipossomas polímeros capazes de reagir ao pH, como é o caso do ácido poliacrílico e do polifosfazeno.<sup>70,79,90</sup>

Além do pH, outros fatores podem contribuir para a liberação do fármaco, nomeadamente a presença de radicais livres na região tumoral. A presença de certas enzimas influencia, também, esta taxa de liberação e, como tal, a eficácia anticancerígena da formulação.<sup>79</sup>

As células cancerígenas podem tornar-se resistentes aos fármacos por aumento dos níveis das bombas de efluxo presentes na sua membrana, usufruindo de mecanismos de multirresistência a fármacos (MRF). Os fármacos livres entram nas células por difusão passiva ou através dos transportadores membranares da célula enquanto os lipossomas o fazem por endocitose. Fármacos hidrofóbicos, normalmente, entram por difusão passiva enquanto os hidrofílicos recorrem aos transportadores para o fazer. Uma célula multirresistente é capaz de ativar os MRF quando o fármaco, na sua forma livre, atravessa a membrana, impedindo que este atinja o citoplasma. Isto faz com que a concentração do fármaco no interior da célula não alcance níveis terapêuticos, evitando

a morte celular. Por outro lado, durante o processo de endocitose dos lipossomas, estes são incorporados em vesículas, o que evita o seu reconhecimento pelas bombas de efluxo celulares. Neste sentido, os lipossomas são capazes de ultrapassar os MRF conduzindo ao aumento da concentração intracelular do fármaco que fica, então, disponível para exercer a sua função antitumoral. O crescimento celular é controlado sendo a eficácia terapêutica superior. Estes mecanismos encontram-se esquematizados na figura 4.4, na qual se observa que, numa célula multirresistente, o fármaco na sua forma livre é expulso do citoplasma pelas bombas de efluxo enquanto os lipossomas são capazes de permanecer no interior da célula. É de realçar que ocorre a expulsão de uma pequena quantidade de fármaco quando o transporte é mediado por lipossomas todavia, esta é mínima quando comparada com a que sucede perante o fármaco livre.<sup>91,92</sup>



**Figura 4.4** – Representação de um mecanismo celular de multirresistência a fármacos. Na sua forma livre, os fármacos são expulsos da célula através das bombas de efluxo enquanto os lipossomas, por entrarem na célula por endocitose, permanecem no interior da célula [adaptada de (92)].

### 4.3. Polímeros para revestimento da superfície dos lipossomas

Como já referido no capítulo anterior, o polímero PEG é o mais utilizado com o objetivo de proteger o nanotransportador da ação do RES, conduzindo ao aumento do tempo de circulação sanguínea. No entanto, outros podem ser empregados para a mesma finalidade sendo que, qualquer um destes polímeros, ao revestir a estrutura nanométrica passa a ser o primeiro a interagir com qualquer componente do seu ambiente envolvente. Assim, é apresentado em seguida o quadro 4.1, no qual são mencionados exemplos de polímeros agrupados segundo o seu grau de utilização.<sup>94,95</sup>

**Quadro 4.1** – Polímeros utilizados com maior (coluna da esquerda) e menor frequência (coluna da direita) para revestimento da superfície dos lipossomas [adaptada de (94) e (95)].

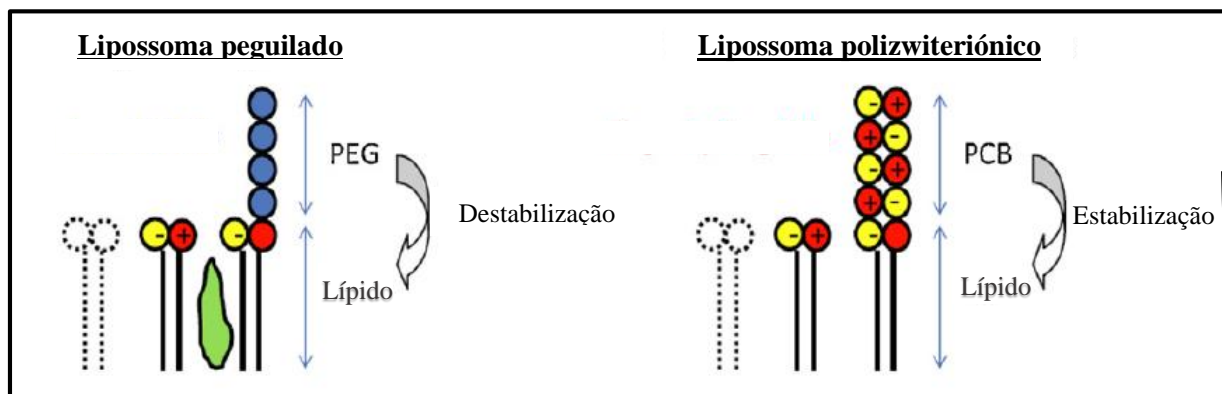
<i>Polímeros mais utilizados</i>	<i>Polímeros menos utilizados</i>
Polietilenoglicol	Poli-(fosfobetaína)
Poli-(N-vinilpirrolidona)	Poli-(sulfobetaína)
Poli-(N-isopropilacrilamina)	Poli-(carboxibetaína)
Ácido poli-acrílico	

O polímero poli-(carboxibetaína), também conhecido como PCB, tem vindo a ser alvo de investigações no sentido de averiguar a sua utilidade para revestimento de nanoveículos. Devido à sua estrutura, o PCB permite uma hidratação elevada da superfície das partículas que reveste, uma vez que as moléculas de água se ligam a si electrostaticamente. Este polímero possui uma estrutura zwitteriónica responsável pelo estabelecimento destas ligações com as moléculas de água. Estas são, portanto, mais fortes do que as que se estabelecem com a utilização do polímero PEG. Isto conduz à elevada hidratação da estrutura.<sup>93</sup>

Em relação à estabilidade e ao tempo de circulação na corrente sanguínea, ambos aparentam ter características semelhantes. O PEG é considerado um polímero hidrofílico todavia, na realidade, este polímero possui características anfipáticas. Tirando partido desta propriedade, o PEG encontra-se apto a revestir partículas hidrofóbicas ou hidrofílicas. Neste sentido, este polímero encontra-se aprovado para revestir formulações lipossómicas de fármacos anticancerígenos. Acontece que, devido ao seu ligeiro carácter hidrofóbico, ocorre uma destabilização da membrana lipídica do lipossoma provocando uma rápida libertação do fármaco. Ocorre, também, uma redução

na polaridade da fase aquosa e uma ligeira desidratação junto da região hidrofóbica do lipossoma. De forma a tentar combater este problema, adiciona-se uma elevada quantidade de colesterol à membrana do lipossoma já que este vai conferir estabilidade à estrutura. Este provoca uma diminuição entre as diferentes cadeias do polímero PEG e aumenta a hidratação da região polar.<sup>94</sup>

A utilização do polímero PCB em detrimento do PEG apresenta algumas vantagens, nomeadamente no que se refere à retenção do fármaco na estrutura lipossómica. Os lipossomas revestidos pelo PCB são capazes de manter o fármaco encapsulado sem requererem a presença das moléculas de colesterol. Este polímero é capaz de estabilizar os fosfolípidos da membrana dos lipossomas devido às suas propriedades de zwitterião, tal como demonstrado na figura 4.5. Outra propriedade consiste na capacidade de manutenção da hidratação à superfície da estrutura.<sup>94</sup>



**Figura 4.5** – Efeito de estabilização e destabilização dos lípidos que constituem a membrana dos lipossomas, provocado pelo carácter super-hidrofílico do PCB e hidrofóbico do PEG, respetivamente [adaptada de (94)].

Além disto, o PCB é biocompatível na medida em que deriva de betaínas encontradas no reino animal, nomeadamente no ser humano, o que o torna ainda mais atraente. Tal como o PEG, este polímero também pode ser alvo de funcionalização, ou seja, podem introduzir-se determinados grupos funcionais de forma a alcançar o pretendido.<sup>94</sup>

Cao e os seus colaboradores realizaram um estudo com o objetivo de comprovar a eficácia do revestimento com o polímero PCB em lipossomas. Neste estudo, sintetizaram-se lipossomas revestidos com o polímero PCB e outros revestidos por PEG. Os que continham o segundo polímero eram isentos de colesterol. Os lipossomas, marcados por fluorescência, foram administrados a ratos sendo que, posteriormente

foram recolhidas amostras de sangue em vários períodos de tempo após a injeção. A concentração de cada um na corrente sanguínea foi medida, tendo-se obtido valores superiores para os lipossomas revestidos por PCB a cada período de tempo. Isto está associado a uma reduzida eliminação e um elevado tempo de semivida. Para validar estes resultados, prepararam uma formulação lipossômica de doxorubicina, um fármaco antitumoral, em que os lipossomas eram revestidos por PCB e comparou-se a sua eficácia com a de uma formulação lipossômica revestida por PEG e também com o fármaco na sua forma livre. Verificou-se que os lipossomas revestidos pelo polímero PCB foram responsáveis por uma remissão tumoral mais rápida quando comparados com os lipossomas revestidos por PEG. Os ratos curaram-se num menor período de tempo, sendo a diferença de seis dias. A elevada eficácia terapêutica do revestimento com o polímero PEG foi, assim, confirmada. Por outro lado, não foram verificadas diferenças significativas relativamente à toxicidade causada por ambos os polímeros.<sup>95</sup>

Existem, atualmente, evidências de que o PEG pode provocar reações adversas no organismo devido ao desenvolvimento de anticorpos contra este polímero. No entanto, de acordo com um estudo realizado pelo autor Mahmoud e os seus colaboradores, a utilização do polímero PEG parece ser, ainda, mais vantajosa do que a do PCB pois este revela-se menos imunotóxico do que o polímero PCB.<sup>93</sup>

#### **4.4. Métodos de preparação de lipossomas**

Existem diversos métodos de preparação de lipossomas e está dependente do método utilizado tanto o tamanho como o número de camadas obtidos. Uma grande percentagem dos trabalhos com lipossomas envolve métodos que se baseiam na hidratação de um filme lipídico seco ou na injeção de um solvente orgânico no qual os lípidos estão dissolvidos.<sup>96</sup>

No geral, existem quatro etapas fundamentais na maioria dos processos de formação de lipossomas. É necessário proceder-se à secagem dos lípidos que se encontram dissolvidos no solvente orgânico sendo que para tal se recorre à evaporação do mesmo. Este passo pode ser realizado previamente ou posteriormente à adição de um meio aquoso facilitando, assim, a dispersão e hidratação desses lípidos. Após a formação dos lipossomas procede-se à purificação dos mesmos com posterior análise do resultado final.<sup>83</sup>

A sonicação e a extrusão constituem dois métodos de formação de SUV a partir de MLV previamente sintetizados e serão resumidos em seguida.<sup>83</sup>

#### **5.4.1. Técnicas de obtenção de lipossomas**

- **Injeção de um solvente orgânico**

Neste método, os lípidos são primeiramente dissolvidos num solvente orgânico, geralmente o éter dietílico ou uma mistura éter-metanol. Em seguida, esta solução é adicionada lentamente à fase aquosa, a qual contém o material a ser encapsulado. Este procedimento deve ser realizado a uma temperatura entre os 55°C e os 65°C ou a uma pressão reduzida. De seguida, procede-se à extração do solvente da mistura a qual é realizada por evaporação do solvente.<sup>83,97</sup>

Uma desvantagem deste método é o facto de os lipossomas obtidos não possuírem tamanhos constantes.<sup>84</sup>

- **Hidratação de um filme lipídico seco**

Os fosfolípidos da membrana dos lipossomas podem apresentar-se na fase gel, a qual é caracterizada por um elevado grau de organização destas moléculas, ou na fase líquido-cristal, a qual é, por sua vez, caracterizada pela elevada hidratação e desorganização destas moléculas. A temperatura à qual esta mudança de fase ocorre denomina-se temperatura de transição de fase ( $T_m$ ).<sup>98</sup>

Esta técnica consiste na adição de um meio aquoso (água destilada, soluções tampão ou salinas, geralmente contendo o fármaco) a um filme lipídico seco, a temperatura controlada, a qual deve ser sempre superior ao valor de  $T_m$ . Esta elevação da temperatura faz com que os lípidos se encontrem altamente hidratados, embora obrigue, também, a uma agitação constante do sistema. Este período de hidratação e agitação deve ter a duração mínima de uma hora, ainda que a sua duração dependa fortemente da estrutura dos lípidos. A solução obtida possui maioritariamente MLV, sendo que posteriormente é necessário efetuar-se uma redução do seu tamanho, por exemplo, através da sonicação ou extrusão.<sup>81,98</sup>

Para se obter o filme lipídico seco inicial, dispersam-se os fosfolípidos (e o colesterol, se necessário) num solvente orgânico, o qual é depois evaporado, ficando os fosfolípidos retidos na parede do balão. Posteriormente, procede-se à hidratação do filme através da adição da solução aquosa.<sup>82</sup>

Além de ser um método simples, este providencia uma elevada taxa de encapsulação das moléculas pretendidas. Por outro lado, é um processo demorado e dispendioso que requer processamentos adicionais para purificação dos lipossomas obtidos.<sup>99</sup>

#### **5.4.2. Técnicas de otimização dos lipossomas previamente obtidos**

- **Sonicação**

Este método consiste no direcionamento de ondas ultrassónicas sobre os MLV, o que conduz à formação de vesículas mais pequenas. Diversas desvantagens caracterizam este método. A baixa eficácia de encapsulação do fármaco na estrutura lipossómica e a possibilidade de nem todos os MLV serem convertidos em SUV, existindo por isso uma mistura final de ambos são duas limitações da sonicação. Além disto, a incidência das ondas sobre os fosfolípidos da membrana dos lipossomas pode provocar a sua destruição, bem como a dos componentes disponíveis para encapsulação. A sonicação pode ser realizada com recurso a uma sonda ou por meio de um banho de ultrassons.<sup>83</sup>

Quando se utiliza uma sonda, a temperatura da solução aumenta abruptamente o que faz com que seja fundamental o recipiente estar colocado sobre gelo. Desta forma, é possível evitar a destruição dos fosfolípidos causada por esta subida da temperatura.<sup>83,84</sup>

- **Extrusão**

A extrusão consiste na passagem dos MLV através de pequenos orifícios de tamanhos bem definidos. Os lipossomas SUV obtidos através deste método possuem um diâmetro relativamente superior aos obtidos por sonicação. Este método é simples, rápido e reprodutível. Apesar disto, este requer um controlo rigoroso da temperatura, o que parece constituir uma limitação deste método.<sup>83,84</sup>

Existem outros métodos de formação de lipossomas para além dos aqui mencionados, todavia parecem ser mais utilizados para sintetizar lipossomas maiores, pelo que não são referidos. Embora o método de hidratação de um filme lipídico seco origine MLV, é explicado a título exemplificativo da obtenção dessa classe de lipossomas, já que estes podem ser posteriormente convertidos em lipossomas mais pequenos, à escala manométrica.

## 5. Exemplos de fármacos lipossômicos para terapêutica de tumores sólidos

### 5.1. Doxorrubicina

A doxorrubicina (DOX) é um fármaco que pertence ao grupo das antraciclina. Esta foi descoberta pela primeira vez nos anos sessenta como resultado da fermentação realizada pela bactéria *Streptomyces peucetius var. caesius*. Atualmente é um fármaco muito utilizado para tratamento de diversas neoplasias, sendo o seu efeito anti-tumoral bastante reconhecido. Este efeito anticancerígeno deve-se essencialmente a três mecanismos distintos de atuação deste fármaco. O primeiro consiste na intercalação da DOX na dupla hélice de ADN, impedindo a atuação tanto da ARN como da ADN polimerase. Como a nova cadeia de ácido nucleico não pode ser sintetizada sem que estas enzimas se liguem, ocorre a paragem da replicação do ADN e, como tal, o crescimento celular é suspenso. Além disto, este fármaco é um inibidor da topoisomerase II, a qual é responsável pela clivagem da dupla hélice de ADN permitindo reduzir o enrolamento gerado durante a sua replicação. Esta enzima possui uma função essencial para a divisão celular já que após efetuar o corte na dupla hélice, trespassa a outra dupla hélice através do local de corte, voltando a ligar novamente a dupla cadeia cortada. Este mecanismo de ação torna possível o relaxamento do ADN, o qual é essencial para a sua replicação. Neste sentido, a inibição desta enzima provoca uma falha na replicação do ADN, originada pela estabilização do complexo ADN-topoisomerase II que impossibilita a junção da cadeia, impedindo a conclusão do ciclo celular. A proliferação celular é, assim, inibida e a massa tumoral não desenvolve. O terceiro mecanismo envolve a formação de radicais livres. Estes causam danos celulares irreversíveis que conduzem à morte celular.<sup>100-102</sup>

Apesar da eficácia da DOX estar comprovada para diferentes tipos de tumores, como o ginecológico, da mama, do ovário, do estômago e do pâncreas, a sua utilização tem como consequência diversos efeitos secundários severos, onde o mais relevante é a cardiotoxicidade. Este fármaco provoca cardiomiopatia, a qual pode originar uma falha congestiva irreversível do coração. Provoca, também, arritmias e disfunções da condutividade. Estes danos cardíacos são cumulativos e irreversíveis. Além disto, mesmo sendo atualmente um fármaco de primeira linha, é responsável por desencadear mielosupressão grave, náuseas, vômitos e efeitos mucocutâneos. Entre estes últimos

destacam-se a alopecia e a estomatite. Outros efeitos secundários estão associados à terapêutica anticancerígena com DOX, tal como resumido no quadro 5.1.<sup>103-105</sup>

A cardiotoxicidade causada pela DOX parece ser consequência de diversos mecanismos, entre eles a formação dos radicais livres. Estes vão provocar uma depleção energética e danos oxidativos nos miócitos. No músculo cardíaco, a concentração de enzimas antioxidantes é bastante reduzida, razão pela qual este é mais afetado. Outro dos mecanismos assenta na desregulação da homeostasia do cálcio e do ferro. Os efeitos cardíacos mais severos são dependentes da dose acumulada de DOX pelo que o intervalo recomendado é de 450-550 mg/m<sup>2</sup> de DOX acumulada. Acima deste intervalo estes efeitos tornam-se mais pronunciados, podendo mesmo conduzir à morte. Neste sentido, a administração de DOX está associada a efeitos imediatos e efeitos a longo prazo, tal como mencionado no quadro 5.1. e a dose administrada a cada sessão de quimioterapia deve variar entre 60-75 mg/m<sup>2</sup> sendo o período de tempo recomendado entre cada uma de três semanas.<sup>100,106</sup>

**Quadro 5.1** – Efeitos adversos provocados pela doxorubicina na sua forma convencional. [adaptada de (105)].

<i>Sistema Orgânico</i>	<i>Efeitos adversos</i>	
<u>Hematológico</u>	Anemia, leucopenia e trombocitopenia	
<u>Gastrointestinal</u>	Anorexia, náuseas, vômitos, diarreia, ulcerações, mucosite e necrose do cólon	
<u>Dermatológico</u>	Alopecia, urticária, hiperpigmentação ou faixas brancas no leito subungueal, esclerose venosa e eritema facial.	
<u>Cardiovascular</u>	<b>Agudo</b>	Vasodilatação, hipotensão, taquicardia e arritmias
	<b>Subagudo</b>	Miocardite e pericardite
	<b>Crónico</b>	Miocardias dose-dependentes (ICC, entre outras)
	<b>Retardado</b>	Cardiomiopatia 10 a 15 anos após o final do tratamento

Com o objetivo de reduzir os efeitos secundários associados à terapêutica com DOX, sem diminuir significativamente os efeitos terapêuticos, surgiu a doxorrubicina lipossômica. Esta estratégia consiste na encapsulação da DOX por lipossomas e foi o primeiro fármaco à escala manométrica aprovado pela FDA em 1995, tendo a denominação de Doxil<sup>®</sup>.<sup>103,106</sup>

Os nanolipossomas sintetizados para encapsular este fármaco possuem características adequadas à vetorização. O seu tempo de circulação sanguínea tem de ser elevado e o escape à ação do RES é condição obrigatória. Para isso, os lipossomas foram revestidos com o polímero PEG. O seu tamanho situa-se entre os 80 e os 100 nm o que possibilita o extravasamento nos vasos sanguíneos tumorais, devido ao EPR, possibilitando uma acumulação no tecido tumoral, ao contrário do que ocorre com a DOX livre que atinge todos os tecidos do organismo. Este fármaco é administrado por via intravenosa e a concentração mantém-se elevada no tumor por um período mínimo de três dias e um máximo de sete dias. A sua taxa de eliminação é inferior à da DOX livre e usufrui de um volume de distribuição, também, menor.<sup>103,107,108</sup>

A DOX lipossômica peguilada, também denominada de Caelyx<sup>®</sup>, está associada a uma menor toxicidade, quando comparada com a DOX livre, o que conduz a que possam ser administradas doses superiores e, como tal, proporciona um aumento da duração do tratamento. Possibilita, então, o aumento da qualidade de vida do doente.<sup>103</sup>

Um dos benefícios mais significativos da quimioterapia com DOX lipossômica consiste na redução dos efeitos cardiotoxicos, muito frequentes quando a DOX livre é administrada. Isto é possível devido ao direcionamento dos lipossomas para o tecido tumoral.<sup>109</sup>

A atividade biológica da DOX lipossômica depende, essencialmente, do local e da taxa de libertação do fármaco e o seu tempo de semivida é de cerca de 55 horas.<sup>106,110</sup>

Está indicada para terapêutica do sarcoma de Kaposi's, para cancro da mama metastático e cancro do ovário. A dose indicada para a terapêutica dos dois últimos é de 50 mg/m<sup>2</sup> e de 20 mg/m<sup>2</sup> para o caso do sarcoma de Kaposi's.<sup>107,111,112</sup>

No entanto, a administração de Caelyx<sup>®</sup>, apesar de diminuir muitos dos efeitos secundários causados pela administração de DOX livre, está associada ao aparecimento de um síndrome palmo-plantar. O doente desenvolve edema doloroso e eritema nas mãos e nos pés e a quimioterapia deve ser imediatamente suspensa. Este é um dos principais problemas desta formulação já que pode obrigar a uma redução das doses

administradas. Além disto, outras reações de hipersensibilidade estão relacionadas com esta terapêutica. O rubor e inchaço facial, arrepios, dispneia hipotensão e hipertensão são alguns desses sintomas de reações de hipersensibilidade. O surgimento destes efeitos secundários está relacionado com a capacidade de extravasamento dos lipossomas em tecidos com vasos sanguíneos de poros de elevado tamanho, como é o caso da pele.<sup>107,112,113</sup>

Existem evidências de que se a DOX lipossômica for associada com estatinas o tratamento pode ser ainda mais eficaz pois estas últimas são responsáveis por diminuir o colesterol, o qual se encontra presente em elevadas quantidades nas células que desenvolveram mecanismos de resistência a fármacos. Ao diminuir o colesterol presente nas membranas celulares destas células cancerígenas, a bomba de efluxo dirigida pela glicoproteína P perde eficácia, não sendo capaz de expulsar a DOX da célula para o exterior. Além disto, como as estatinas diminuem o colesterol intracelular, a célula é obrigada a sintetizar mais recetores LDL para que seja capaz de adquirir mais do meio exterior. Assim, uma estratégia para aumentar a eficácia do tratamento com Doxil<sup>®</sup>, consiste em acoplá-la com apo-lipoproteínas a fim de aumentar a internalização celular do fármaco.<sup>114</sup>

Esta formulação possui uma coloração avermelhada pelo que é importante alertar o doente para que, durante um período de aproximadamente vinte e quatro horas, a sua urina poderá ter uma coloração também desse tom. Além disto, o doente deve manter uma boa higiene oral e evitar bebidas ou comidas demasiado quentes ou frias pois isto ajudará a curar eventuais feridas na boca que possam surgir associadas ao tratamento (como consequência da mucosite).<sup>109</sup>

Existe também uma outra formulação com DOX lipossômica, o Myocet<sup>®</sup>. Este já se encontra aprovado para uso clínico e a principal diferença em relação ao Caelyx<sup>®</sup> é que os lipossomas não são revestidos pelo polímero PEG. Quando comparada com a DOX livre, verifica-se que a concentração de fármaco na corrente sanguínea é significativamente mais elevada. Em relação à sua clearance, esta é relativamente mais baixa ( $5.1 \pm 4.8$  L/h) do que a da DOX na sua forma livre ( $46.7 \pm 9.6$  L/h), o que é indicativo de um maior tempo de semivida. Estes valores de clearance são, obviamente, superiores aos da formulação lipossômica peguilada de DOX. A eficácia terapêutica parece ser relativamente semelhante à da DOX livre todavia, a cardiotoxicidade parece ser inferior. Os tempos de semivida no plasma destas formulações são muito

discrepantes entre si, sendo o da DOX livre de 0,2 horas, o do Myocet<sup>®</sup> de 2,5 horas e o do Doxil<sup>®</sup> de 55 horas. Estas diferenças estão relacionadas com as propriedades acima mencionadas de cada formulação.<sup>62,104</sup>

O Caelyx<sup>®</sup> apresenta-se no mercado na forma de um concentrado que necessita ser diluído antes da administração intravenosa. Se o seu uso não for imediato, após preparação, deve ser colocado no frigorífico (2 – 8 °C) por um período máximo de vinte e quatro horas. Para a sua diluição deve utilizar-se glucose a 5% e devem ter considerados todos os cuidados adjacentes à manipulação de medicamentos citotóxicos.<sup>111</sup>

Em ensaio clínico encontra-se uma formulação lipossómica de doxorubicina, denominada ThermoDox. Estes lipossomas são sensíveis à temperatura e libertam o fármaco quando se deparam com temperaturas superiores a 39°C. Esta formulação, encontra-se em investigação para diversos tumores sólidos, nomeadamente o cancro da mama e do fígado e parece bastante promissora.<sup>115</sup>

## 5.2. Daunorrubicina

A daunorrubicina (DAU) é outro fármaco anticancerígeno, pertencente ao grupo das antraciclinas, que pode ser vetorizado por lipossomas. Este fármaco, tal como a DOX, intercala-se na cadeia de ADN e impede a sua replicação, além de ser, também, um inibidor da topoisomerase II. Pode ser extraído de *Streptomyces peucetius varcaesitue*. Os lipossomas desta formulação possuem um diâmetro que varia desde os quarenta até aos sessenta nanómetros. Por ser uma formulação lipossómica, tal como a DOX lipossómica, o seu tempo de circulação na corrente sanguínea é superior ao do fármaco na forma livre. Os lipossomas desta formulação estão aptos a escapar à ação do RES e são capazes de atingir o tecido tumoral devido ao extravasamento através dos vasos sanguíneos nesta região (EPR). Enquanto a clearance da DAU convencional é de 44.9 mL/h, a da DAU lipossómica é de 0.195 mL/h, o que comprova o maior tempo de semivida na circulação sanguínea. A acumulação no tumor é maior para esta formulação do que para a DAU livre, todavia a sua distribuição pelos tecidos saudáveis é menor o que permite reduzir os efeitos secundários associados ao tratamento com o fármaco livre.<sup>116-119</sup>

A encapsulação de DAU em lipossomas evita a degradação deste fármaco ainda na corrente sanguínea, minimizando a ligação a proteínas plasmáticas. Os lipossomas

não são revestidos pelo polímero PEG, nem por qualquer outro com a mesma finalidade, pelo que o escape ao RES não é efetivo.<sup>111,119</sup>

A DAU lipossômica está associada ao aparecimento de mielosupressão, apesar de os efeitos cardiotoxicos não serem tão relevantes como no caso da DAU livre. Esta formulação, denominada de DaunoXome<sup>®</sup>, encontra-se aprovada para tratamento do cancro da mama, sarcoma de Kaposi's e cancro cerebral infantil, embora em Portugal tenha indicação apenas para o sarcoma de Kaposi's. A dose inicial recomendada para evitar mielosupressão é de 40 mg/m<sup>2</sup> e deve ser administrada com intervalos de duas semanas.<sup>116,118,119</sup>

Esta formulação surge no mercado na forma concentrada sendo necessário ser diluída antes da administração. Apenas deve ser utilizada glucose a 5% para a sua diluição. Após a diluição, possui uma estabilidade de vinte e quatro horas, a uma temperatura entre os dois e os oito graus celsius. Ao longo de toda a sua manipulação são obrigatórios procedimentos de proteção da luz.<sup>119,120</sup>

### **5.3. Citarabina**

A citarabina intercala-se no ADN e impede a sua replicação. Este fármaco possui uma estrutura análoga às pirimidinas dos ácidos nucleicos e, por isso, durante a sua replicação é introduzida na nova cadeia impedindo a progressão da síntese. Neste sentido, ocorre uma paragem na divisão celular.<sup>121</sup>

Este fármaco surge, atualmente, no mercado encapsulado em lipossomas denominando-se DepoCyt<sup>®</sup>. Esta formulação encontra-se aprovada pela EMA para tratamento da meningite neoplásica, a qual pode ser consequência de vários tumores sólidos como o da mama e o do pulmão. A sua administração é realizada diretamente no fluido que rodeia a espinal medula e o cérebro, ou seja, a via é intratecal. Por ser uma formulação lipossômica, a libertação do fármaco é lenta e, por isso, a sua ação é prolongada. Devido a essa razão, a qualidade de vida do doente será superior pois esta formulação permite diminuir o número de injeções necessárias, quando comparada com a citarabina convencional.<sup>121,122</sup>

### **5.4. Paclitaxel**

Este fármaco estabelece ligação com os microtúbulos da célula e estabiliza-os fazendo com que a célula não seja capaz de os organizar corretamente. Ocorre, então, a paragem da divisão celular e o crescimento tumoral é controlado. Está aprovado para

tratamento do cancro do ovário, da mama e do pulmão. A grande limitação deste fármaco é a sua reduzida solubilidade em muitos solventes. Por esta razão, é necessário a introdução na formulação de um agente surfactante, o Cremophor EL, o qual é responsável pela ocorrência de muitos efeitos secundários no organismo. As tentativas atuais baseiam-se na síntese de formulações sem necessidade de utilização deste composto. Assim, diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de averiguar os benefícios e a credibilidade da utilização de lipossomas para encapsulação deste fármaco.<sup>115,123</sup>

Duas formulações deste fármaco têm sido alvo de investigação. O LEP-EUT e EndoTAG-1 encontram-se, atualmente, na fase de ensaios clínicos com o objetivo de averiguar a sua segurança e eficácia. Foram sintetizadas, essencialmente, para permitir uma diminuição dos efeitos secundários associados ao fármaco na sua forma convencional. A diferença entre estas duas formulações reside nos fosfolípidos utilizados para a síntese dos lipossomas. Os da primeira possuem cardiolipina na sua constituição, enquanto os da segunda apresentam fosfolípidos catiónicos na sua estrutura. Na fase I do ensaio clínico foi demonstrado que LEP-EUT ostenta um índice terapêutico superior ao paclitaxel na sua forma convencional, tendo-se obtido um valor de 325 mg/m<sup>2</sup> relativamente à dose máxima tolerada para esta formulação. O efeito adverso mais evidente foi a neurotoxicidade.<sup>115,124,125</sup>

### **5.5. Vincristina**

Este fármaco tem aplicação em alguns tumores sólidos, tais como os sarcomas. Impede a progressão tumoral devido às suas propriedades de inibição da formação de novos vasos sanguíneos (angiogénese). Contudo, a sua rápida eliminação e neurotoxicidade limitam muito a sua utilização. A encapsulação deste fármaco em lipossomas permite aumentar a sua eficácia na medida em que amplifica o seu tempo de circulação na corrente sanguínea e reduz a taxa de eliminação do mesmo. Na fase II dos ensaios clínicos, foi realizado um estudo onde se concluiu que a dose recomendada para tratamento de tumores sólidos é de 1.5 mg/m<sup>2</sup>. Esta formulação, denominada Marqibo, encontra-se atualmente na fase III dos em ensaios clínicos.<sup>126-128</sup>

### 5.6. Outros fármacos vetorizados por lipossomas

No quadro 5.2, apresentado em seguida, encontram-se resumidos alguns fármacos em ensaios clínicos para vetorização por lipossomas com aplicação na terapêutica de tumores sólidos.

**Quadro 5.2** – Exemplos de fármacos anticancerígenos que se encontram em ensaios clínicos para vetorização por lipossomas [adaptada de (115) e (129)].

Nome do produto	Composto ativo	Via de administração	Ensaio clínico	Indicação (Câncer)
LE-SN38	SN-38	Intravenosa	Fase I/II	Colorectal metastásico
Aroplatin	Análogo da cisplatina	Intrapleural	Fase II	Colorectal metastásico
SPI-077	Cisplatina	Intravenosa	Fase I/II	Cabeça, pescoço e pulmão
Lipoplatin	Cisplatina	Intravenosa	Fase III	Gástrico, cabeça e pescoço e pulmão
S-CDKD602	Análogo da camptotecina	Intravenosa	Fase I/II	Útero
INX-0076	Topotecano	Intravenosa	Fase I	Tumores sólidos avançados
INX-0125	Vinorelbina	Intravenosa	Fase I	Tumores sólidos avançados
NL CPT-11	Irinotecano	Intravenosa	Fase I	Glioma

Existem outros fármacos vetorizados por lipossomas para terapêutica oncológica além dos referidos. No entanto, não são mencionados neste trabalho uma vez que a sua aplicação não assenta em tumores sólidos e/ou o tamanho dos lipossomas ultrapassa a escala manométrica. Um exemplo é o DepoDur<sup>®</sup>, o qual consiste na encapsulação de morfina em lipossomas multilamelares. Embora não diretamente relacionado com a

terapêutica oncológica, este pode ser utilizado como medicação complementar para alívio do sofrimento do doente.<sup>130</sup>

### 5.7. Trabalho de campo

Durante o meu estágio curricular em farmácia hospital, realizado no CHSJ, investiguei a possibilidade de realizar um pequeno questionário aos doentes oncológicos a realizar quimioterapia. No entanto, por questões de ordem ética e burocrática, tal não foi possível. Solicitei, então, auxílio à minha orientadora de estágio para efetuar algumas perguntas a um profissional de saúde da área de oncologia médica. Deram-me a possibilidade de falar com uma enfermeira. O meu principal objetivo era recolher dados acerca da utilização do Caelyx<sup>®</sup> e Myocet<sup>®</sup> no hospital. Esta entrevista foi realizada no dia 7 de Abril de 2014.

A enfermeira relatou que os doentes tratados com a doxorubicina lipossómica peguilada (Caelyx<sup>®</sup>) sofrem muito menos alopecia do que aqueles que realizam ciclos de quimioterapia com a DOX convencional. Embora este efeito secundário também ocorra nesses doentes, a sua intensidade é muito menor. Por outro lado, mencionou que os doentes a fazer Caelyx<sup>®</sup> apresentam menores efeitos cardiotoxicos do que aqueles que seguem tratamento com a DOX convencional. Referiu que, no entanto, a DOX lipossómica peguilada provoca um maior número de reações alérgicas nos doentes quando comparada com a convencional. A enfermeira indicou que, normalmente, o Caelyx<sup>®</sup> era utilizado numa situação em que o doente já manifestou efeitos cardiotoxicos provocados pela DOX convencional ou quando a doença se encontra numa fase mais avançada. No CHSJ, o Caelyx<sup>®</sup> é, habitualmente, administrado em doentes com cancro da mama metastizado.

A enfermeira indicou-me que são necessários alguns cuidados na altura de administração desta formulação ao doente, entre os quais destacou a necessidade de preencher o sistema com glucose a 5% já que esta formulação não é compatível com soro fisiológico. Referiu que os doentes apresentam queixas de que a DOX lipossómica é muito emética. Além disto, indicou a importância de alertar os doentes para a questão da cor da urina. Como os dois fármacos são vesicantes e, por terem uma cor alaranjada, podem surgir na urina aspetos desta tonalidade. Relatou-me que, no momento da entrevista, existiam quatro doentes a fazer tratamento com Caelyx<sup>®</sup>, dois com neoplasias hematológicas e os outros dois com cancro da mama. A enfermeira admitiu

que esta formulação só não era mais utilizada devido ao seu elevado custo e até me transmitiu uma estimativa de valores:

- 50 mg de DOX convencional – 7€
- 20 mg de Caelyx<sup>®</sup> - 475,8€
- 50 mg de Myocet<sup>®</sup> - 494€

Devido a esta grande diferença, a enfermeira referiu que era necessário os médicos pedirem uma autorização especial para um doente iniciar tratamento com a DOX lipossómica. Durante toda a entrevista, a enfermeira mostrou-se sempre muito prestável. Os profissionais de saúde desta unidade eram todos muito atenciosos com os doentes e tinham um arquivo próprio com informações acerca de cada fármaco, o qual continha informações como os principais cuidados a ter e as características de muitos fármacos. Portanto, com esta entrevista, conclui-se que esta terapêutica revela ser bastante eficaz já que permite aumentar a qualidade de vida dos doentes, reduzindo os efeitos secundários adjacentes ao tratamento. Além disso, conclui-se igualmente que a sua utilização seria muito mais generalizada, não fossem os seus elevados custos.

Além desta entrevista, falei ainda com dois médicos oncologistas no hospital de Portimão. Ambos se mostraram conscientes em relação à eficácia do Caelyx<sup>®</sup>. Em entrevistas separadas, ambos assumiram que este fármaco era utilizado para casos de cancro da mama metastático, para cancro do ovário e sarcoma de Kaposi's. Um dos médicos referiu que o Myocet<sup>®</sup> tem revelado efeitos terapêuticos bastante promissores e que é já uma terapêutica bastante frequente. O mesmo médico relatou que a maioria dos doentes que se encontram a realizar quimioterapia com a DOX lipossómica peguilada manifesta edema, rubor e eritema nas mãos e nos pés (o chamado síndrome palmo-plantar). Expôs ser este um dos grandes problemas associados a esta terapêutica. Também referiu que uma das grandes vantagens da utilização desta formulação lipossómica consiste na diminuição dos efeitos cardiotóxicos, razão pela qual é uma terapêutica bastante apelativa. Relatou que este é um dos grandes problemas associados às antraciclina, a sua cardiotoxicidade. Mencionou que este efeito faz com que, muitas vezes, esta terapêutica convencional seja inadequada para tratamento. E mostrou que, tanto a DOX lipossómica peguilada como a não peguilada, comportam uma boa

alternativa nesse ponto. Por fim, o outro médico referenciou a questão dos custos associados a utilização destes dois fármacos.

Esta tarefa permitiu concluir que a utilização da DOX lipossômica já se encontra generalizada e que, realmente, parece reduzir os efeitos secundários associados à DOX convencional, de acordo com o mencionado na literatura. Além disto, a sua eficácia parece ser bem reconhecida, bem como as vantagens da sua utilização. No entanto, devido a razões de ordem económica, as terapêuticas realizadas com DOX lipossômica estão essencialmente restritas a casos mais graves e terminais desta área da medicina.

## **6. Conclusão**

O cancro é uma patologia devastadora e, ao longo dos anos, tem sido responsável por um elevado número de mortes em todo o mundo. Diversas investigações são, por isso, direcionadas para esta vertente da medicina com o intuito de aumentar as opções terapêuticas, tornando-as mais eficazes e menos agressivas para o doente.

Atualmente, a nanomedicina constitui uma excelente ferramenta para diversas áreas da medicina, havendo a grande perspectiva de se tornar um aliado ainda maior, devido, sobretudo, às suas enormes vantagens. A vetorização de fármacos é uma estratégia bastante promissora da nanomedicina sendo que tem já contribuído para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento, as quais se revelam muito mais eficazes. Na área da oncologia, a aplicação da nanovetorização tem inúmeras vantagens. A possibilidade de direcionamento para o tumor, a facilidade de ultrapassar a barreira endotelial e atingir as células tumorais, o transporte simultâneo de fármacos diferentes para atuarem em vias fisiológicas distintas do tumor, a possibilidade de controlar a libertação do fármaco, constituem recursos oferecidos pela nanomedicina nesta área. A conjugação desta terapêutica personalizada com um diagnóstico precoce e muito mais rigoroso possibilita a melhoria da qualidade de vida da população, diminuindo os efeitos secundários perante um tratamento tão devastador quer do ponto de vista físico como psicológico.

O direcionamento de fármacos para o tecido tumoral é praticável devido ao seu tamanho e à possibilidade de adaptação da superfície dos nanovetores. Por serem sintetizados à escala manométrica, estes são compatíveis com muitos dos mecanismos que ocorrem no organismo humano. A região tumoral usufrui de características próprias

que possibilitam a utilização de estruturas nanométricas como é o caso do EPR. Com fármacos convencionais não é possível tirar partido deste efeito e, por isso, todos os tecidos do organismo são afetados.

Os lipossomas constituem uma ferramenta bastante benéfica para a terapêutica oncológica. A sua utilização proporciona um aumento da eficácia terapêutica bem como uma redução dos efeitos secundários, permitindo salvaguardar os tecidos saudáveis. Além disto, permitem a encapsulação de diferentes fármacos, em simultâneo, para que possam atuar em diferentes mecanismos do tumor e, assim, combatê-lo mais eficazmente. A diversidade de estruturas e composição dos lipossomas permite o transporte de uma grande diversidade de fármacos com características muito variadas. Diversas formulações estão disponíveis no mercado, para uso clínico, em muitas áreas. A nível da terapêutica oncológica, a DOX lipossômica é, sem dúvida, aquela que tem vindo a ser mais utilizada. As suas vantagens são nitidamente admitidas pelos clínicos e os doentes beneficiam, regra geral, da sua administração. No entanto, muitos outros fármacos vetorizados por lipossomas estão a ser alvo de ensaios e, outros tantos, já se encontram aprovados para a terapêutica oncológica.

A nanomedicina, nomeadamente a vetorização de fármacos, é uma área da tecnologia que muito ainda tem para oferecer à humanidade no futuro. Há ainda muito para descobrir e investigar neste campo.

## 7. Bibliografia

1. Shapira A, Livney YD, Broxterman HJ, Assaraf YG. **Nanomedicine for targeted cancer therapy: towards the overcoming of drug resistance.** *Drug Resist Updat.* 2011; 14 (3): 150–63.
2. Bharali DJ, Mousa SA. **Emerging nanomedicines for early cancer detection and improved treatment: current perspective and future promise.** *Pharmacol Ther.* 2010; 128 (2): 324–35.
3. Bazak R, Hourri M, El Achy S, Kamel S, Refaat T. **Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature.** *J Cancer Res Clin Oncol.* 2014. DOI: 10.1007/s00432-014-1767-3
4. Zhao Y, Alakhova DY, Kabanov AV. **Can nanomedicines kill cancer stem cells?** *Adv Drug Deliv Rev.* 2013; 65 (13-14): 1763–83.
5. Sun Q, Radosz M, Shen Y. **Challenges in design of translational nanocarriers.** *J Control Release.* 2012; 164 (2): 156–69.
6. Veisheh O, Kievit FM, Ellenbogen RG, Zhang M. **Cancer cell invasion: treatment and monitoring opportunities in nanomedicine.** *Adv Drug Deliv Rev.* 2011; 63 (8): 582–96.
7. López-Dávila V, Seifalian AM, Loizidou M. **Organic nanocarriers for cancer drug delivery.** *Curr Opin Pharmacol.* 2012; 12 (4): 414–9.
8. Blanco E, Hsiao A, Ruiz-Esparza GU, Landry MG, Meric-Bernstam F, Ferrari M. **Molecular-targeted nanotherapies in cancer: enabling treatment specificity.** *Mol Oncol.* 2011; 5 (6): 492–503.
9. Globocan 2012: **Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.** *International Agency for Research on Cancer.* [Acedido a: 21 de fevereiro de 2014] Disponível em: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)
10. International Agency for Research on Cancer. **World cancer factsheet.** *Cancer Res UK.* 2014. [Acedido a: 21 de fevereiro de 2014] Disponível em: [http://publications.cancerresearchuk.org/downloads/product/CS\\_REPORT\\_WORLD.pdf](http://publications.cancerresearchuk.org/downloads/product/CS_REPORT_WORLD.pdf)
11. Miranda N, Nogueira P, Silva A, Rosa M, Alves M, Afonso D, et al. **Portugal-Doenças Oncológicas em Números - 2013.** *Direção Geral da Saúde.* 2013. 1-84
12. Coleman MP. **Cancer survival: global surveillance will stimulate health policy and improve equity.** *Lancet.* 2014; 383 (9916): 564–73
13. American Cancer Society. **Global Cancer Facts & Figures.** 2 ed. *Atlanta: American Cancer Society;* 2011.

14. Thun MJ, DeLancey JO, Center MM, Jemal A, Ward EM. **The global burden of cancer: priorities for prevention.** *Carcinogenesis*. 2010; 31 (1): 100–10
15. Pinto Anabela Mota. **Fisiopatologia - Fundamentos e Aplicações.** 2 ed. Lousã: Lidel. 2009. pg 291-315
16. Hanahan D, Weinberg RA, Francisco S. **The Hallmarks of Cancer.** *Cell*. 2000; 100: 57–70
17. Shay JW, Wright WE. **Role of telomeres and telomerase in cancer.** *Semin Cancer Biol*. 2011; 21 (6): 349–53.
18. Artandi SE, DePinho R A. **Telomeres and telomerase in cancer.** *Carcinogenesis*. 2010; 31 (1): 9–18.
19. Kupiec M. **Biology of telomeres: lessons from budding yeast.** *FEMS Microbiol Rev* 2014; 38 (2): 144–71
20. Buseman CM, Wright WE, Shay JW. **Is telomerase a viable target in cancer?** *Mutat Res*. 2012; 730 (1-2): 90–7.
21. Conomos D, Pickett H a, Reddel RR. **Alternative lengthening of telomeres: remodeling the telomere architecture.** *Front Oncol*. 2013; 3 (27)
22. Quintas Alexandre, Freire Ana, Videira Arnaldo. **Bioquímica – Organização Molecular da Vida.** 1ed. Lousã: Lidel; 2008. pg 675, 693-5
23. Heidinger BJ, Blount JD, Boner W, Griffiths K, Metcalfe NB, Monaghan P. **Telomere length in early life predicts lifespan.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109 (5): 1743–8.
24. Hanahan D, Weinberg RA. **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell*. 2011; 144(5): 646–74.
25. Lemmon MA, Schlessinger J. **Cell signaling by receptor tyrosine kinases.** *Cell*. 2010; 141(7): 1117–34.
26. Harrington KJ. **Biology of cancer.** *Medicine*. 2011; 39 (12): 689–92.
27. American Cancer Society. **Oncogenes, Tumor Suppressor Genes, and Cancer.** *Atlanta: American Cancer Society*; 2011. 1-8
28. Suresh S. **Biomechanics and biophysics of cancer cells.** *Acta Mater*. 2007; 55(12): 3989–4014.
29. Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A, et al. **Tensional homeostasis and the malignant phenotype.** *Cancer Cell*. 2005; 8 (3): 241–54.
30. Freilinger a, Rosner M, Hanneder M, Hengstschläger M. **Ras mediates cell survival by regulating tuberin.** *Oncogene*. 2008; 27 (14): 2072–83.

31. Lee S-H, Shen G-N, Jung YS, Lee S-J, Chung J-Y, Kim H-S, et al. **Antitumor effect of novel small chemical inhibitors of Snail-p53 binding in K-Ras-mutated cancer cells.** *Oncogene*. 2010; 29 (32): 4576–87
32. Lee S, Lee S, Jung YS, Xu Y, Kang HS, Ha N, et al. **Blocking of p53-Snail Binding Promoted by Oncogenic K- Ras , Recovers p53 Expression.** *Neoplasia*. 2009; 11(1): 22–31.
33. Martinez JD, Parker MT, Fultz KE, Ignatenko NA, Gerner EW. Molecular Biology of Cancer (Capítulo 1). **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**. 6 ed. *John Wiley & Sons, Inc.* 2003; Vol 5. pg 21-32
34. Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, et al. **Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling.** *Cell*. 2009. 139 (5): 891–906.
35. Lo CM, Wang HB, Dembo M, Wang YL. **Cell movement is guided by the rigidity of the substrate.** *Biophys J*. 2000; 79 (1): 144–52.
36. Bhadriraju K, Hansen LK. **Extracellular Matrix- and Cytoskeleton-Dependent Changes in Cell Shape and Stiffness.** *Exp Cell Res*. 2002; 278 (1): 92–100.
37. Ingber DE. **Can cancer be reversed by engineering the tumor microenvironment?** *Semin Cancer Biol*. 2008; 18 (5): 356–64.
38. Kumar S, Das A, Sen S. **Extracellular matrix density promotes EMT by weakening cell-cell adhesions.** *Mol Biosyst*. 2014; 10 (4): 838–50.
39. Ingber DE. **Cancer as a disease of epithelial-mesenchymal interactions and extracellular matrix regulation.** *Differentiation*. 2002; 70(9-10): 547–60
40. Azevedo C. **Biologia Celular e Molecular**. 4 ed. Lousã. Lidel. 2005. pg 553-9
41. Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJL, Ezzati M. **Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors.** *Lancet*. 2005; 366 (9499): 1784–93
42. Carpenter DO, Bushkin-Bedient S. **Exposure to chemicals and radiation during childhood and risk for cancer later in life.** *J Adolesc Health*. 2013; 52 (5): 21–9.
43. Boffetta P, Couto E, Wichmann J, Ferrari P, Trichopoulos D, Bueno-de-Mesquita HB, et al. **Fruit and vegetable intake and overall cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC).** *J Natl Cancer Inst*. 2010; 102 (8): 529–37.
44. Merck Sharp & Dohme. **Manual Merck de informação médica.** Edição ampliada e actualizada. Barcelona. *Oceano*. 2008. pg 1235-1254
45. Fundación Española de Farmacia Hospitalaria. **Farmacia Hospitalaria**. 3 ed. *OCEANO*. 2002. pg 1171-8, 1187, 1194-6

46. Mollaoğlu M, Erdoğan G. **Effect on symptom control of structured information given to patients receiving chemotherapy.** *Eur J Oncol Nurs.* 2014; 18 (1): 78–84.
47. Sharma R, Tobin P, Clarke SJ. **Management of chemotherapy-induced nausea, vomiting, oral mucositis, and diarrhoea.** *Lancet Oncol.* 2005; 6 (2): 93–102.
48. Helena M, Alves M, Freitas O. **Sofrimento do doente oncológico em situação paliativa.** *Revista de Enfermagem.* 2012; 115–24.
49. Dresser R. **Bioethics And Cancer: When the Professional Becomes Personal.** *Hasting Center Report,* 2011. 1-5
50. Sinha R, Kim GJ, Nie S, Shin DM. **Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery.** *Mol Cancer Ther.* 2006; 5 (8): 1909–17.
51. Boisseau P, Loubaton B. **Nanomedicine, nanotechnology in medicine.** *Comptes Rendus Phys.* 2011; 12 (7): 620–36.
52. European Technology Platform. **Nanomedicine – Nanotechnology for Health.** 2006. Bélgica: *European Technology Platform.* 1-46
53. Chan VSW. **Nanomedicine: An unresolved regulatory issue.** *Regul Toxicol Pharmacol.* 2006; 46 (3): 218–24.
54. European Medical Research Councils. **Nanomedicine.** Alemanha: *European Science Foundation.* 2005. 1-52
55. European Technology Platform on NanoMedicine. **Vision paper And Basis for a Strategic Research Agenda For NanoMedicine.** Belgica: *European Technology Platform on NanoMedicine.* 2005. 1-40
56. Springer. **Handbook of Nanotechnology.** 3 ed. Londres: *Editor Bhushan.* 2010. pg 1-10
57. Taurin S, Nehoff H, Greish K. **Anticancer nanomedicine and tumor vascular permeability; Where is the missing link?** *J Control Release.* 2012; 164 (3): 265–75.
58. Livney YD, Assaraf YG. **Rationally designed nanovehicles to overcome cancer chemoresistance.** *Adv Drug Deliv Rev.* 2014; 65 (13-14): 1716–30.
59. Zhang X-Q, Xu X, Bertrand N, Pridgen E, Swami A, Farokhzad OC. **Interactions of nanomaterials and biological systems: Implications to personalized nanomedicine.** *Adv Drug Deliv Rev.* 2012; 64 (13): 1363–84.
60. Svenson S. **What nanomedicine in the clinic right now really forms nanoparticles?** *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2014; 6 (2): 125–35.

61. Murday JS, Siegel RW, Stein J, Wright JF. **Translational nanomedicine: status assessment and opportunities.** *Nanomedicine.* 2009; 5 (3): 251–73.
62. Danhier F, Feron O, Pr at V. **To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery.** *J Control Release.* 2010; 148 (2): 135–46.
63. Jain K. **The Handbook of Nanomedicine.** Basel: Humana Press. 2008. pp 1-4, 26, 32-34, 119, 145-149
64. Dinarvand R, Sepehri N, Manoochehri S, Rouhani H, Atyabi F. **Poly lactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents.** *Int J Nanomedicine.* 2011; p. 877–95.
65. Veis h O, Kievit FM, Ellenbogen RG, Zhang M. **Cancer cell invasion: treatment and monitoring opportunities in nanomedicine.** *Adv Drug Deliv Rev.* 2011; 63(8): 582–96.
66. Webster T. **Nanomedicine – Technologies and applications.** New Delhi: Woodhead Publishing. 2012. pp 13, 251 [Acedido a: 8 de Agosto de 2014] Dispon vel em: <http://books.google.pt/books?id=iYFwAgAAQBAJ&pg=PA13&dq=Nanomedicine+%E2%80%93+technologies+and+applications&hl=pt-PT&sa=X&ei=sNgMVKeFD4vG7AauuIAI&ved=0CCAQ6AEwAA#v=onepage&q=Nanomedicine%20%E2%80%93%20technologies%20and%20applications&f=false>
67. Mody V V, Nounou MI, Bikram M. **Novel nanomedicine-based MRI contrast agents for gynecological malignancies.** *Adv Drug Deliv Rev.* 2009; 61 (10): 795–807.
68. Jia F, Liu X, Li L, Mallapragada S, Narasimhan B, Wang Q. **Multifunctional nanoparticles for targeted delivery of immune activating and cancer therapeutic agents.** *J Control Release.* 2013; 172 (3): 1020–34.
69. Kenmotsu H, Yasunaga M, Goto K, Nagano T, Kuroda J, Koga Y, et al. **The antitumor activity of NK012, an SN-38-incorporating micelle, in combination with bevacizumab against lung cancer xenografts.** *Cancer.* 2010; 116 (19): 4597–604.
70. Nazir S, Hussain T, Ayub A, Rashid U, MacRobert AJ. **Nanomaterials in combating cancer: therapeutic applications and developments.** *Nanomedicine.* 2014; 10 (1): 19–34.
71. Onitsuka K, Fujimoto M, Kitajima H, Ohshiro N, Takei F, Takahashi S. **Convergent synthesis of platinum-acetylde dendrimers.** *Chemistry.* 2004; 10 (24): 6433–46.
72. Khandare JJ, Jayant S, Singh A, Chandna P, Wang Y, Vorsa N, et al. **Dendrimer versus linear conjugate: Influence of polymeric architecture on**

- the delivery and anticancer effect of paclitaxel.** *Bioconjug Chem.* 2006; 17 (6): 1464–72.
73. Lembo D, Cavalli R. **Nanoparticulate delivery systems for antiviral drugs.** *Antivir Chem Chemother.* 2010; 21 (2): 53–70.
74. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Pr at V. **PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications.** *J Control Release.* 2012; 161 (2): 505–22.
75. National Cancer Institute. **FDA Approval for Paclitaxel Albumin-stabilized Nanoparticle Formulation.** [Acedido a: 10 de Agosto de 2014]. Dispon vel em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-nanoparticle-paclitaxel>
76. Portney NG, Ozkan M. **Nano-oncology: drug delivery, imaging, and sensing.** *Anal Bioanal Chem.* 2006; 384 (3): 620–30.
77. Markman JL, Rekechenetskiy A, Holler E, Ljubimova JY. **Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance.** *Adv Drug Deliv Rev.* 2013; 65(13-14): 1866–79.
78. Greco F, Vicent MJ. **Combination therapy: opportunities and challenges for polymer-drug conjugates as anticancer nanomedicines.** *Adv Drug Deliv Rev.* 2009; 61 (13): 1203–13.
79. Ait-Oudhia S, Mager DE, Straubinger RM. **Application of pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis to the development of liposomal formulations for oncology.** *Pharmaceutics.* 2014; 6 (1): 137–74.
80. Jesorka A, Orwar O. **Liposomes: technologies and analytical applications.** *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif).* 2008; 1: 801–32.
81. Laouini a., Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, Sfar S, Charcosset C, Fessi H. **Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art.** *J Colloid. Sci Biotechnol.* 2012; 1 (2): 147–68.
82. Shashi K, Satinder K, Bharat P. **A complete review on : liposomes.** *Int Res J Pharm.* 2012; 3 (7): 10–6.
83. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, et al. **Liposome: classification, preparation, and applications.** *Nanoscale Res Lett.* 2013; 8 (1): 102.
84. Dua J S, DAKB A C Rana, Bhandari A K. **Liposome : methods of preparation and applications.** *Int J Pharm Stud Res.* 2012; 3 (2): 14–20.
85. Huwyler J, Drewe J, Kr henbuhl S. **Tumor targeting using liposomal antineoplastic drugs.** *Int J Nanomedicine.* 2008; 3 (1): 21–9.
86. Zhao P, Astruc D. **Docetaxel nanotechnology in anticancer therapy.** *Chem Med Chem.* 2012; 7 (6): 952–72.

87. Shin J, Shum P, Grey J, Fujiwara S, Malhotra GS, Gonza A, et al. **Acid-Labile mPEG – Vinyl Ether – 1,2-Dioleoylglycerol Lipids with Tunable pH Sensitivity: Synthesis and Structural Effects on Hydrolysis Rates, DOPE Liposome Release Performance, and Pharmacokinetics.** *Mol Pharm.* 2012; 9 (1): 3266–3276.
88. Sun Q, Radosz M, Shen Y. **Challenges in design of translational nanocarriers.** *J Control Release.* 2012; 164 (2): 156–69.
89. Sawant RR, Torchilin VP. **Challenges in development of targeted liposomal therapeutics.** *Am Assoc Pharm Sci.* 2012; 14 (2): 303–15.
90. Saenz Del Burgo L, Pedraz JL, Orive G. **Advanced nanovehicles for cancer management.** *Drug Discov Today.* 2014. 00 (00): 1-12
91. Allen TM, Cullis PR. **Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications.** *Adv Drug Deliv Rev.* 2013; 65 (1): 36–48.
92. Kunjachan S, Błauż A, Möckel D, Theek B, Kiessling F, Etrych T, et al. **Overcoming cellular multidrug resistance using classical nanomedicine formulations.** *Eur J Pharm Sci.* 2012; 45 (4): 421–8.
93. Elsabahy M, Li A, Zhang F, Sultan D, Liu Y, Wooley KL. **Differential immunotoxicities of poly(ethylene glycol)- vs. poly(carboxybetaine)-coated nanoparticles.** *J Control Release.* 2013; 172 (3): 641–52.
94. Cao Z, Jiang S. **Super-hydrophilic zwitterionic poly(carboxybetaine) and amphiphilic non-ionic poly(ethylene glycol) for stealth nanoparticles.** *Nano Today.* 2012; 7 (5): 404–13.
95. Cao Z, Zhang L, Jiang S. **Superhydrophilic zwitterionic polymers stabilize liposomes.** *Langmuir.* 2012; 28 (31): 11625–32.
96. Zawada ZH. **A Single-step method of liposome preparation.** *Cell Mol Biol Lett.* 2004; 9 (1): 603–15.
97. Patil YP, Jadhav S. **Novel methods for liposome preparation.** *Chem Phys Lipids.* 2014 177: 8–18.
98. Horta BAC, Vries AH De, Hu PH. **Simulating the Transition between Gel and Liquid-Crystal Phases of Lipid Bilayers : Dependence of the Transition Temperature on the Hydration Level.** *J Chem Theory Comput.* 2010; 6 : 2488–500.
99. Wagner A, Vorauer-Uhl K. **Liposome technology for industrial purposes.** *J Drug Deliv.* 2011; 2011: 1-9.
100. Stirland DL, Nichols JW, Miura S, Bae YH. **Mind the gap: a survey of how cancer drug carriers are susceptible to the gap between research and practice.** *J Control Release.* 2013; 172 (3): 1045–64.

101. Bailly C. **Contemporary challenges in the design of topoisomerase II inhibitors for cancer chemotherapy.** *Chem Rev.* 2012; 112 (7): 3611–40.
102. Goel PN, Gude RP. **Delineating the anti-metastatic potential of pentoxifylline in combination with liposomal doxorubicin against breast cancer cells.** *Biomed Pharmacother.* 2014; 68 (2): 191–200.
103. Barenholz Y. **Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned.** *J Control Release.* 2012; 160 (2): 117–34
104. Lammers T. **Improving the efficacy of combined modality anticancer therapy using HPMA copolymer-based nanomedicine formulations.** *Adv Drug Deliv Rev.* 2010; 62 (2): 203–30.
105. De R. **O Carvedilol como protector da cardiotoxicidade induzida pelas Antraciclinas.** *Rev Port Cardiol.* 2008; 27 (10): 1277–96.
106. Düzgünes N, editor. **Methods in Enzymology – Liposomes Parte E.** USA: Elsevier. 2005. [Acedido a: 10 de agosto de 2014]. pg. 71-76
107. Boers-Sonderen MJ, Van Herpen CML, Van der Graaf WT a, Desar IME, Van der Logt MGWA-, Beer YM, et al. **Correlation of toxicity and efficacy with pharmacokinetics (PK) of pegylated liposomal doxorubicin (PLD) (Caelyx®).** *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014; 74 (3): 457–63.
108. Gabizon A, Shmeeda H, Grenader T. **Pharmacological basis of pegylated liposomal doxorubicin: impact on cancer therapy.** *Eur J Pharm Sci.* 2012; 45 (4): 388–98.
109. Sereno M, Brunello A, Chiappori A, Barriuso J, Casado E, Belda C, et al. **Cardiac toxicity: old and new issues in anti-cancer drugs.** *Clin Transl Oncol.* 2008; 10 (1): 35–46.
110. Wilkinson K. **Liposomal doxorubicin.** *Clin J Oncol Nurs.* 2002; 6 (1): 59–61
111. EMA. **Resumo das características do medicamento - Doxorubicina lipossômica.** *EMA.* 2010; 1–48.
112. Chanan-Khan A. **Complement activation following first exposure to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil®): possible role in hypersensitivity reactions.** *Ann Oncol.* 2003; 14 (9): 1430–7.
113. Maksimenko A, Dosio F, Mougin J, Ferrero A, Wack S, Reddy LH, et al. **A unique squalenoylated and nonpegylated doxorubicin nanomedicine with systemic long-circulating properties and anticancer activity.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111 (2): 217–26.
114. Kopecka J, Campia I, Olivero P, Pescarmona G, Ghigo D, Bosia A, et al. **LDL-masked liposomal-doxorubicin reverses drug resistance in human cancer cells.** *J Control Release.* 2011; 149 (2): 196–205

115. Chang H-I, Yeh M-K. **Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy.** *Int J Nanomedicine.* 2012; 7: 49–60.
116. McTiernan A, Whelan J, Leahy M, Woll PJ. **A Phase II Nonrandomised Open-Label Study of Liposomal Daunorubicin (DaunoXome) in Advanced Soft Tissue Sarcoma.** *Sarcoma.* 2006; 2006 (1): 1-6.
117. Bendle M, Pealing J, Papanastasopoulos P, Bower M. **Liposomal anthracycline chemotherapy and the risk of second malignancies in patients with Kaposi's sarcoma (KS).** *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014; 74 (3): 611–5
118. Petre C E, Dittmer D P. **Liposomal daunorubicin as treatment for Kaposi ' s sarcoma.** *Int J Nanomedicine.* 2007; 2 (3): 277–88.
119. Infarmed. **Resumo das características do medicamento – DaunoXome.** *Infarmed.* 2012; 1-9
120. American Pharmacists Association. **Drug Information – Handbook of Oncology.** 9 ed. *Lexicomp.* 2011. pg. 352-55, 419-26
121. EMA. **Resumo das Características do medicamento -DepoCyt.** EMA. 2011; 44 (0): 4–6.
122. Glantz MJ, Jaeckle KA, Chamberlain MC, Phuphanich S, Recht L, Swinnen LJ, et al. **A Randomized Controlled Trial Comparing Intrathecal Sustained-release Cytarabine ( DepoCyt ) to Intrathecal Methotrexate in Patients with Neoplastic Meningitis from Solid Tumors A Randomized Controlled Trial Comparing Intrathecal Sustained- release Cytara.** *Clin Cancer Res.* 1999; 5 (0): 394–3402.
123. Zhang Q, Huang X-E, Gao L-L. **A clinical study on the premedication of paclitaxel liposome in the treatment of solid tumors.** *Biomed Pharmacother.* 2009; 63 (8):603–7
124. Fetterly GJ, Grasela TH, Sherman JW, Dul JL, Grahn A, Lecomte D, et al. **Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling and simulation of neutropenia during phase I development of liposome-entrapped paclitaxel.** *Clin Cancer Res.* 2008; 14 (18): 5856–63.
125. Koudelka S, Turánek J. **Liposomal paclitaxel formulations.** *J Control Release.* 2012; 163 (3): 322–34.
126. Yan Z, Zhu Z, Qian Z, Hu G, Wang H, Liu W, et al. **Pharmacokinetic characteristics of vincristine sulfate liposomes in patients with advanced solid tumors.** *Acta Pharmacol Sin.* 2012; 33 (6): 852–8.
127. Silverman JA, Deitcher SR. **Marqibo® (vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine.** *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013; 71 (3): 555–64.

128. Krishna R, Webb MS, St Onge G, Mayer LD. **Liposomal and nonliposomal drug pharmacokinetics after administration of liposome-encapsulated vincristine and their contribution to drug tissue distribution properties.** *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 298 (3): 1206–12.
129. Lammers T, Kiessling F, Hennink WE, Storm G. **Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress.** *J Control Release.* 2012; 161 (2): 175–87.
130. Alam M, Hartrick CT. **Extended-release epidural morphine (DepoDur): an old drug with a new profile.** *Pain Pract.* 2005; 5 (4): 349–53.