

Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Química e Farmácia
Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas



A aplicação dos dendrímeros na terapia anticancerígena

Ana Rita Guerreiro Borralho

**Trabalho efetuado sob a orientação da:
Professora Doutora Ana Margarida Grenha**

Faro, Setembro de 2014

Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Química e Farmácia
Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas



A aplicação dos dendrimeros na terapia anticancerígena

Orientando:

Ana Rita Guerreiro Borralho

Orientadora:

Professora Doutora Ana Margarida Grenha

Faro, Setembro de 2014

A aplicação dos dendrímeros na terapia anticancerígena

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 Ana Rita Borralho.

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

À minha orientadora, a Professora Dr.^a Ana Margarida Grenha, por desde logo se ter mostrado disponível para me orientar na elaboração desta monografia e por me ter sempre apoiado a diversos níveis nos meses que se seguiram, desde do esclarecimento de dúvidas até à estruturação do trabalho.

À Professora Isabel Ramalinho pelo trabalho incansável em coordenar os nossos estágios, por todas as sessões de esclarecimento que nos deu, a fim de minimizarmos os erros nas nossas monografias, e por sempre insistir connosco para não adiarmos o início da elaboração da mesma.

A todos os docentes da Universidade do Algarve que contribuíram para a minha aprendizagem e para me tornar uma profissional melhor ao longo dos cinco anos do curso.

Às minhas orientadoras de estágio, Joana Cravo e Ana Paula Carrondo, que me auxiliaram a aplicar na prática o conhecimento teórico transmitido pelos docentes.

Aos meus pais, ao meu namorado e aos meus amigos mais próximos por me terem acompanhado e ajudado a ultrapassar os desafios que surgiram nestes cinco anos de aprendizagem e experiências memoráveis.

Índice de figuras	v
Índice de quadros.....	vi
Índice de gráficos.....	vi
Lista de siglas e abreviaturas	vii
Resumo	ix
Abstract.....	x
1. Introdução.....	1
2. Metodologia	2
3. Fisiopatologia oncológica	3
3.1 Etiologia tumoral	4
3.1.1 Fatores ambientais	4
3.1.2 Fatores geográficos.....	6
3.1.3 Fatores alimentares	6
3.1.4 Fatores genéticos	7
3.2 Carcinogénese	7
3.3 Crescimento tumoral.....	8
3.4 Metastização	9
4. Defesas corporais contra o cancro.....	10
5. Prevenção e tratamento dos tumores.....	11
5.1 Prevenção.....	11
5.2 Terapêutica anticancerígena convencional	12
5.2.1 Cirurgia.....	13
5.2.2 Radioterapia.....	13
5.2.3 Quimioterapia	13
5.2.4 Hormonoterapia	15
6. A nanotecnologia no âmbito da terapia antineoplásica.....	15
7. Síntese dos dendrímeros e as suas propriedades	17
7.1 Síntese divergente	20
7.2 Síntese convergente	21
7.3 Outros métodos de síntese	22
8. Aplicações gerais dos dendrímeros na área farmacológica e médica	22
8.1 Dendrímeros como transportadores de fármacos.....	22

8.1.1	Encapsulamento do fármaco.....	23
8.1.2	Conjugação dendrímero-fármaco	24
9.	Biodistribuição dos dendrímeros.....	25
10.	Toxicidade associada aos dendrímeros.....	26
10.1	Efeitos tóxicos no sistema biológico	26
10.1.1	Toxicidade hemolítica	28
10.1.2	Imunogenicidade	29
10.1.3	Rutura da membrana celular.....	29
10.1.4	Libertação de citocinas e quimiocinas.....	31
10.2	Soluções para minimizar a toxicidade	32
10.2.1	Utilização de dendrímeros biocompatíveis.....	33
10.2.2	Alteração da superfície dos dendrímeros.....	36
10.2.3	Alteração do número de gerações.....	42
11.	Libertação do fármaco no local-alvo	42
11.1	Vetorização passiva	43
11.2	Vetorização ativa	45
11.2.1	Vetorização às moléculas reguladoras da angiogénese	47
11.2.2	Vetorização ao recetor epidérmico humano (HER)	50
11.2.3	Vetorização aos recetores da transferrina.....	51
11.2.4	Vetorização aos recetores do folato.....	52
11.2.5	Vetorização ao antígeno de membrana específico da próstata.....	54
11.2.6	Vetorização às lectinas	55
12.	Dendrímeros como transportadores de fármacos quimioterápicos.....	56
12.1	Metotrexato	56
12.2	Doxorrubicina.....	57
12.3	Camptotecinas	58
12.4	5-Fluorouracilo.....	58
12.5	Paclitaxel	59
12.6	Cisplatina.....	59
13.	Conclusão	60
14.	Bibliografia.....	62
15.	Anexos	68

Índice de figuras

Figura 3.1 – Desenvolvimento inicial da massa tumoral.....	9
Figura 6.1 – Escala demonstrativa do tamanho das nanoestruturas comparativamente ao de outros objetos vulgarmente conhecidos.....	16
Figura 6.2 – Ilustrações representativas dos nanossistemas utilizados na terapia anticancerígena. A) nanopartículas poliméricas; B) micelas poliméricas; C) dendrímeros; D) lipossomas; E) nanopartículas virais; F) nanotubos de carbono.....	17
Figura 7.1 - Estrutura geral dos dendrímeros.....	18
Figura 7.2 – Ilustração representativa da evolução de um dendrímero a partir do núcleo central até à geração 4.0G, bem como do aumento linear do seu diâmetro.....	19
Figura 7.3 - Síntese divergente de dendrímeros PAMAM.....	20
Figura 7.4 - Síntese convergente de dendrímeros poli(arileter).....	21
Figura 10.1 - Esquema relativo ao processo de rutura da membrana celular.....	30
Figura 10.2 – Visualização por Microscopia de força atómica da bicamada lipídica, após a interação com os dendrímeros.....	31
Figura 10.3 - Estratégias para minimizar a toxicidade associada aos dendrímeros.....	32
Figura 10.4 - Dendrímero conjugado ao PEG e ao fármaco.....	37
Figura 11.1- Libertação do fármaco controlada.....	43
Figura 11.2 – Imagem representativa de um dendrímero sensível ao pH e do respetivo mecanismo de libertação do fármaco.....	45
Figura 11.3 – Imagiologia fluorescente representando ratos 4T1 portadores de tumor tratados com dendrímeros funcionalizados com VEGF comparativamente ao respetivo grupo controlo.....	49
Figura 11.4 – Imagens representativas das secções de tumores de ratinhos injetados com dendrímeros funcionalizados com anti-HER2 e com uma solução salina.....	51
Figura 11.5 – Análise por microscopia confocal e citometria de fluxo de amostras de ratinhos injetados com dendrímeros vetorizados aos recetores do ácido fólico comparativamente ao respetivo grupo controlo.....	53
Figura 11.6 - Vetorização do fármaco ao local-alvo tirando partido da interação lectina-hidrato de carbono.....	55

Figura 12.1 – Representação da atividade antitumoral das formulações de doxorubicina comparativamente ao grupo controlo, bem como da cardiotoxicidade de ambas as formulações comparativamente ao fármaco na forma livre.....58

Índice de quadros

Quadro 10.1 – Padrões generalizados representando a toxicidade *in vitro*, a toxicidade *in vivo* e a imunogenicidade dos dendrímeros em função da funcionalidade à sua superfície.....27

Índice de gráficos

Gráfico 5.1 – Evolução do número de células tumorais ao longo de ciclos sucessivos de quimioterapia, conforme o conceito de eliminação logarítmica, o qual parece seguir uma cinética gompertziana.....14

Gráfico 10.1 – Hemólise induzida pela incubação dos glóbulos vermelhos com os dendrímeros PPI 2.0G, PPI 2.0G acoplado à maltose, PPI 4.0G e PPI 4.0G acoplado à maltose a concentrações de 3 mg/mL e 6 mg/mL.....38

Gráfico 10.2 – Avaliação da viabilidade celular das células Caco-2, expondo-as a diferentes concentrações de dendrímeros PAMAM catiónicos (G2, G3 e G4), aniónicos (G2.5 e G3.5) e ao controlo.....39

Gráfico 11.1 – Interação dose-dependente dos dendrímeros G5-FI3-GLA6 e dos respetivos dendrímeros não funcionalizados G5-FI3 para o antigénio tumoral PSMA presente à superfície das células LNCaP. No gráfico também é possível observar a interação entre os dendrímeros G5-FI3-GLA6 e as células LNCaP na presença de CLA na forma livre, verificando-se uma diminuição da fluorescência devido à competição entre os dendrímeros funcionalizados e o ligando natural.....54

Gráfico 12.1 – Evolução do volume tumoral relativo ao longo dos dias após a administração intraperitoneal do PBS (●), da cisplatina na forma livre (○), dos dendrímeros 6.5G conjugados à cisplatina (▼, 6 mg/kg) e dos dendrímeros 6.5G conjugados à cisplatina (Δ, 8 mg/kg) em ratinhos xenotransplantados com células tumorais A2780 do ovário humano.....60

- 5-ASA – Ácido 5-amino-salicílico
- 5-FU – 5-fluorouracilo
- 6-TAMRA – 6-carboxi-tetrametilrodamina
- ADN – Ácido desoxirribonucleico
- ALT – Alanina transaminase
- C.m.c – Concentração micelar crítica
- DHFR – Dihidrofolato reductase
- DOX – Doxorrubicina
- EBV – Vírus Epstein-Barr
- EGFR – Fator de crescimento epidérmico
- FACS – Separação de células ativadas por fluorescência
- FPS – Fator de proteção solar
- GLA – Ureia-glutamato
- HBV – Vírus da hepatite B
- HER2 – Recetor epidérmico humano do tipo 2
- HPV – Papilomavírus humano
- INEB – Instituto Nacional de Engenharia Biomédica
- LDH – Lactato desidrogenase
- MEC – Matriz extracelular
- MTX – Metotrexato
- PAMAM – Poliamidoamina
- PBS – Solução salina
- PEG – Polietilenoglicol
- PEO – Óxido de polietileno
- PLL – Poli(L-Lisina)
- PPI – Polipropilenoimina

PSMA – Antígeno de membrana específico da próstata

RFC – Transportador de folato reduzido

RGD – Péptido arginina-glicina-aspartato

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

VIH – Vírus da imunodeficiência humana

As doenças oncológicas afetam milhões de pessoas em todo o mundo e caracterizam-se por serem doenças cujos números respeitantes às taxas de mortalidade são deveras desanimadores. Estes fatores associados a todo o sofrimento psicológico e físico que os doentes oncológicos enfrentam fazem com que este grupo de doenças seja um dos mais temidos pela população mundial. De forma a aumentar as taxas de cura e minimizar os graves efeitos adversos induzidos pelos tratamentos anticancerígenos convencionais, vários investigadores têm estudado tratamentos alternativos, mais seletivos, que permitem colmatar as limitações dos utilizados atualmente. Uma área que tem ganho muito destaque nos últimos anos é a nanotecnologia, onde se englobam diversos sistemas nanoparticulados, como os dendrímeros, que apresentam um grande potencial como transportadores de fármacos, nomeadamente dos fármacos anticancerígenos.

Os dendrímeros são sistemas nanoparticulados com uma estrutura muito ramificada, semelhante a uma árvore. A sua arquitetura particular permite transportar os fármacos, tanto através do encapsulamento como da conjugação dos mesmos. A aplicação destes nanossistemas na terapia anticancerígena apresenta como vantagens a possibilidade de: 1) aumentar o tempo de semivida do fármaco em circulação; 2) dirigir o fármaco para as células tumorais por vetorização passiva; 3) aumentar a seletividade dos fármacos através da conjugação a anticorpos monoclonais ou a antigénios tumorais; 4) ultrapassar o mecanismo de resistência induzido pela glicoproteína-P. Além destas vantagens, os dendrímeros apresentam algumas características favoráveis relativamente a outros nanossistemas, como os formados por polímeros lineares, devido ao facto de apresentarem uma multivalência controlada, que permite a ligação a fármacos, grupos de vetorização ou grupos solubilizantes, proporcionando assim um comportamento farmacocinético reproduzível.

Desta forma, esta monografia pretende elaborar uma revisão, dando a conhecer as mais-valias e limitações da introdução dos dendrímeros na prática clínica do tratamento anticancerígeno, a fim de avaliar a potencialidade da utilização desta promissora tecnologia na área da oncologia.

Palavras-chave: nanotecnologia; dendrímeros; tratamento anticancerígeno; vetorização; seletividade.

Abstract

The oncological diseases affect millions of people worldwide and are characterized by being disease whose numbers relating to rates of mortality are not yet encouraging. These factors associated with all psychological and physical suffering that cancer patients face, make with that this group of diseases is one of the most feared by the world population. In order to increase cure rates and minimize the serious adverse effects induced by conventional anticancer treatments, several researchers have studied alternative treatments, more selective, that allow bridging the limitations of used currently. One area that has gained much prominence in recent years is nanotechnology, where they are encompassed various nanoparticulate systems such as dendrimers, which have a great potential as drug carriers, including anticancer drugs.

The dendrimers are nanoparticulate systems with a highly branched structure, similar to a tree. Yours particular architecture allows carrying anticancer drugs, both through the encapsulation as the conjugation of the same. The application these nanosystems in anticancer therapy have advantages such as the ability to 1) increase the half-life of circulating drug; 2) direct the drug to the tumor cells by passive vectoring; 3) increase the selectivity of drugs through conjugation to monoclonal antibodies or tumor antigens; 4) overcoming the resistance mechanism induced by P-glycoprotein. Besides these advantages, the dendrimers, still have others favorable characteristics over others nanosystems, such as linear polymers, because they present a controlled multivalency, which allows binding to drugs, groups of solubilizing or groups of vectoring, providing thus a reproducible pharmacokinetic behavior.

Thus, this monograph aims to elaborate a revision, making known the gains and limitations of the introduction of dendrimers in clinical practice of anticancer treatment, in order to evaluate the potential use of this promising technology in oncology.

Keywords: nanotechnology; dendrimers; anticancer therapy; vectorization; selectivity.

1. Introdução

O cancro é uma doença que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, estimando-se que, em Portugal, morram cerca de 42 mil pessoas por ano devido a doenças oncológicas.¹ Estes números aliados ao facto de ainda não existir um tratamento realmente eficaz para a maioria dos tumores metastáticos inoperáveis, fazem com que o cancro seja uma das doenças mais temidas em todo o mundo.²

O cancro, também designado por neoplasia ou tumor maligno, é um termo utilizado para retratar a proliferação rápida e descontrolada das células, cujo crescimento não é adequadamente controlado pelos mecanismos reguladores existentes nos tecidos saudáveis. As neoplasias são, ainda, caracterizadas pela capacidade de propagação das células anormais para tecidos adjacentes, levando à formação de metástases.^{3,4}

Na atualidade, a terapia anticancerígena envolve essencialmente processos de administração invasivos, tais como a aplicação de cateteres para a administração da quimioterapia. Para além da quimioterapia, também é usual recorrer à cirurgia e radioterapia a fim de tratar o cancro. O objetivo da quimioterapia e radioterapia é a eliminação das células neoplásicas, recorrendo a fármacos citotóxicos ou à radiação ionizante, respetivamente, que irão atuar principalmente nas células que se multiplicam mais rapidamente, já que esta é uma característica das células tumorais em relação às células saudáveis. A heterogeneidade tumoral é a principal barreira para um diagnóstico e terapêutica eficazes. A eficácia do tratamento está diretamente relacionada com a capacidade do fármaco destruir as células cancerígenas sem afetar as células saudáveis, e é esta seletividade que irá influenciar a qualidade e a esperança de vida do doente. No entanto, os fármacos utilizados em quimioterapia são ainda pouco seletivos, sendo este um dos grandes problemas associado à terapêutica, pelo que a sua administração sistémica leva frequentemente a efeitos adversos noutros tecidos, tais como neurotoxicidade, cardiomiopatia ou mielossupressão, por vezes tão intensos que o doente tem que interromper o tratamento antes da erradicação do tumor.⁵⁻⁷ Além do mais, em virtude da reduzida biodisponibilidade e especificidade dos fármacos citotóxicos, é habitual utilizarem-se elevadas concentrações destes fármacos de forma a garantir que alcancem a massa tumoral, o que contribui para o surgimento de efeitos adversos.⁸

Um aumento da especificidade dos fármacos citotóxicos para o tumor permitiria melhorar a eficácia da terapêutica e minimizar os efeitos secundários graves que os doentes oncológicos frequentemente enfrentam. A nanotecnologia tem potencial para colmatar essa falta de especificidade, recorrendo a sistemas transportadores de fármacos, onde se incluem particularmente os lipossomas, as nanopartículas poliméricas e os dendrímeros, entre outros sistemas. Em Portugal, a nanotecnologia encontra-se em expansão, tendo sido já realizados pelo menos cinco pedidos de patente relativos a sistemas nanoparticulados, incluindo na Universidade de Coimbra, Universidade de Lisboa e Universidade do Algarve. Além disso, o Instituto Nacional de Engenharia Biomédica (INEB) encontra-se a desenvolver estruturas dendríticas para aplicação na terapia génica em órgãos do sistema nervoso. Contudo, a aplicação destes sistemas pode ser extrapolada para outras áreas, como a oncologia. Esta monografia centra-se nos dendrímeros, visto que estes se distinguem pelas suas características singulares, entre as quais a estrutura bem definida, a multivalência controlada e a alta funcionalidade, permitindo-lhes assim o transporte simultâneo de diversos fármacos.⁶⁻⁸ Este sistema nanoparticulado pode acoplar anticorpos monoclonais que permitem um direcionamento para o local-alvo, para o que é necessário cumprir critérios básicos: 1) o antígeno tumoral deve ter um papel importante na progressão da doença; 2) deve ser estável na superfície das células cancerígenas; 3) deve ser expresso em grande percentagem nas células tumorais e 4) deve, preferencialmente, ser expresso numa grande diversidade de tumores.^{5,6}

Deste modo, esta monografia tem como principais objetivos proporcionar uma visão geral e introdutória sobre o cancro, centrando-se depois na abordagem dos aspetos relacionados com a introdução dos dendrímeros na prática clínica do tratamento anticancerígeno, incluindo o que se refere à toxicidade destes materiais e às estratégias para minimizar a existência da mesma. Além disso, serão também exploradas as diferentes abordagens já descritas na literatura para uma vetorização seletiva dos fármacos, tendo por base os dendrímeros como sistemas transportadores dos mesmos.

2. Metodologia

No sentido de desenvolver a monografia com base nos objetivos delineados, foram utilizadas diversas fontes bibliográficas. Primeiramente, a recolha de informação iniciou-se através da pesquisa em diversas bases de dados, tais como o PubMed, a B-

On e a Web of Knowledge, utilizando os termos “dendrimer and cancer therapy”, “dendrimer and drug delivery”, “application of nanotechnology in cancer therapy” e “nanoparticles in cancer treatment”. A partir desta primeira recolha foi possível aceder a diversos artigos científicos quer de revisão, quer originais, bem como a algumas monografias. Também foram utilizados *websites* para a recolha de informação, tais como o da World Health Organization e o da Liga Portuguesa Contra o Cancro. Por fim, também se realizou pesquisa em livros, a qual teve lugar na Biblioteca Central de Gambelas, na Biblioteca Municipal de Lagoa, na Biblioteca da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa e no Serviço de Gestão Técnico-Farmacêutica do Hospital de Santa Maria.

3. Fisiopatologia oncológica

O cancro caracteriza-se por uma multiplicação descontrolada de um número exagerado de células, bem como por uma redução da eliminação das mesmas através do processo de morte programada, designado por apoptose. As células constituintes de um tecido saudável apresentam uma proliferação controlada por diferentes mecanismos reguladores característicos das próprias células. Contudo, as células neoplásicas conseguem escapar aos diversos mecanismos de controlo, tornando-se portanto células autónomas e “imortais”. Estas células podem desenvolver-se a partir de qualquer tecido em qualquer órgão do organismo. Outra característica própria das células tumorais é a sua capacidade de se disseminar pelo organismo, induzindo novos tumores secundários, conhecidos por metástases.^{4,9}

As neoplasias surgem, geralmente, após os 55 anos de idade, sendo a principal causa de morte em mulheres entre os 40 e os 79 anos e em homens entre os 60 e os 79 anos de idade. Estima-se que o risco de desenvolver uma dada neoplasia duplica a cada 5 anos após os 25 anos de idade e que, aos 85 anos de idade, a incidência se aproxime dos 2500 casos por 100000 pessoas, o que pode ser explicado por uma exposição mais prolongada a diversos carcinogénios e a um sistema imunitário mais debilitado. No entanto, alguns tumores são particularmente mais comuns em crianças com idade inferior a 15 anos, como o tumor de Wilms, o retinoblastoma e o neuroblastoma.^{2,9,10}

3.1 Etiologia tumoral

O cancro é uma doença com uma componente multifatorial, o que significa que diversos fatores podem conferir uma maior suscetibilidade para um determinado indivíduo ou para a população desenvolver a patologia.¹⁰

3.1.1 Fatores ambientais

Os fatores ambientais influenciam significativamente o desenvolvimento de certos tumores através de duas formas distintas, nomeadamente por indução de mutações nos genes responsáveis pela regulação do ciclo celular ou pela criação de condições favoráveis ao crescimento das células tumorais.^{4,10}

3.1.1.1 Substâncias químicas carcinogénias

A exposição a uma determinada substância química carcinogénia tem, usualmente, de ocorrer por um período prolongado para permitir o desenvolvimento do tumor, e, por isso, as neoplasias apenas costumam surgir em indivíduos com uma idade mais avançada.⁴

Os carcinogénios químicos indutores de mutações no material genético, também designados por genotóxicos, têm uma elevada reatividade química ou então dão origem a metabolitos reativos, podendo provocar graves lesões macrogenéticas. As aflotoxinas, as mustardas, as aminas aromáticas, o amianto e os hidrocarbonetos policíclicos (presentes no fumo do tabaco) são alguns exemplos de carcinogénios químicos. Por outro lado, existem alguns químicos que não atuam diretamente a nível do material genético, como é o caso dos herbicidas e dos pesticidas, cujo mecanismo de ação aparenta estar relacionado com a morte celular tóxica associada a hiperplasia regenerativa.^{4,10}

3.1.1.2 Agentes físicos

A ação de alguns agentes físicos, como as radiações ionizantes, as radiações ultravioleta ou o asbesco, podem provocar danos diretos no ácido desoxirribonucleico (ADN) ou suprimir as defesas antitumorais do organismo, induzindo o aparecimento de determinadas neoplasias. A toxicidade associada aos agentes físicos parece estar relacionada com a produção de radicais livres de oxigénio.⁴

A radiação ultravioleta, particularmente a UVB, proveniente da luz solar pode provocar cancro da pele. A suscetibilidade para desenvolver cancro da pele depende de muitos fatores, entre os quais a capacidade de bronzear sem queimar, a idade do indivíduo na altura da exposição, a etnia, a cor da pele, o estilo de vida e a suscetibilidade genética individual. Neste contexto, este risco é mais acentuado em indivíduos de pele clara que residem em locais cuja intensidade das radiações ultravioleta é elevada, como acontece na Austrália e na Nova Zelândia. O principal mecanismo pelo qual as radiações ultravioleta induzem a carcinogénese é através da lesão no ADN por formação de dímeros de pirimidina.^{2,10}

As radiações ionizantes, como as radiações eletromagnéticas e as particuladas, têm a capacidade de causar neoplasias através da indução de mutações no material genético resultantes do efeito direto da energia radiante ou do efeito indireto mediado pela formação de radicais livres da água ou do oxigénio. As radiações particuladas, como as partículas α , apresentam uma maior capacidade indutora da carcinogénese comparativamente às radiações eletromagnéticas, como os raios X e γ .¹⁰ A exposição às radiações ionizantes pode advir do recurso excessivo a radiografias ou, no caso de trabalhadores das centrais nucleares, do contacto com reatores nucleares, o que contribuiu para o surgimento de uma variedade de tumores, particularmente sarcomas, leucemia, cancro da mama e cancro da tiróide.⁹

3.1.1.3 Agentes biológicos

Os vírus são responsáveis por um em cada setes tumores. Os genomas dos vírus de ADN oncogénicos integram-se no genoma do hospedeiro e os genes virais que são transcritos precocemente no ciclo de vida do vírus têm um papel importante na transformação celular. Os vírus mais perigosos associados à indução da carcinogénese são o papilomavírus humano (HPV) e o vírus da hepatite B (HBV), que são responsáveis por 80% dos cancros causados por vírus.^{4,10} O vírus Epstein-Barr (EBV) também parece estar correlacionado com um risco aumentado para desenvolver cancro da nasofaringe e linfoma de Burkitt.²

Atualmente, já foram identificados cerca de 70 tipos de HPV distintos. Alguns desses tipos, como o HPV 7, são responsáveis pelo surgimento de papilomas escamosos benignos, comumente designados por verrugas, contudo existem outros, como o HPV 16 e 18, que dão origem ao cancro do colo do útero. A carcinogénese ocorre quando, durante a integração, o ADN viral é interrompido, levando à sobreexpressão das

proteínas E6 e E7, que vão atuar a nível dos produtos do gene supressor de tumor, o Rb e p53, inibindo-os, contribuindo assim para a ativação da replicação do ADN celular. Relativamente ao HBV, verifica-se que existe uma associação entre a infeção por este vírus e a incidência de cancro hepático em diversas regiões do mundo.¹⁰ Evidentemente, os programas de vacinação contra estas infeções virais podem ter um impacto significativo na redução da incidência dessas formas de cancro.²

As bactérias também podem ser responsáveis pela indução de tumores, como é o caso da *Helicobacter pylori*. Embora a *H. pylori* não cause repercussões clínicas graves na maioria dos doentes infetados, em 20% a 30% dos indivíduos, a infeção evolui para úlceras gástricas, linfomas gástricos ou para o carcinoma.¹⁰ Em vista disso, existe a necessidade de controlar eficazmente a infeção por *H. pylori*, de forma a diminuir o risco de desenvolver cancro.²

3.1.2 Fatores geográficos

O risco de desenvolver cancro varia consoante o local de residência de cada indivíduo, tendo-se verificado uma diferente distribuição geográfica na frequência de determinados tumores em países distintos. Por exemplo, estudos indicam que, no Japão, a taxa de mortalidade por cancro gástrico é setes vezes superior à mesma taxa nos Estados Unidos. Pelo contrário, a taxa de mortalidade por cancro do cólon é mais reduzida no Japão. Além do mais, ao analisar as taxas de mortalidade de imigrantes japoneses nos Estados Unidos por cancro gástrico e do cólon observam-se valores intermédios entre os nativos do Japão e dos Estados Unidos. Esta variação geográfica depende de um conjunto de diversos fatores, tais como a predisposição genética, a alimentação e o meio ambiente.^{9,10}

3.1.3 Fatores alimentares

As substâncias obtidas a partir da alimentação vão condicionar o risco de desenvolvimento de cancro. Por exemplo, uma dieta rica em gorduras saturadas confere uma maior suscetibilidade para desenvolver cancro do cólon, da mama e da próstata.⁹ O consumo excessivo de álcool também confere um risco superior para o aparecimento de diversos cancros, entre os quais o do fígado, esófago, faringe, cavidade oral, laringe, mama e colo-retal. Pelo menos nos países em desenvolvimento, cerca de 75% dos cancros do esófago, faringe, cavidade oral e laringe são atribuíveis ao consumo de álcool e ao tabagismo, verificando-se um aumento acentuado do risco em indivíduos

alcoólicos com hábitos tabágicos, indiciando a existência de um possível efeito multiplicativo. O consumo regular de carnes vermelhas também tem sido associado a um maior risco de desenvolver cancro do colo-retal.¹¹

3.1.4 Fatores genéticos

Apesar da predisposição genética desempenhar um papel importante no desenvolvimento do cancro, os doentes oncológicos que contêm mutações hereditárias predisponentes ao cancro no seu genoma representam uma porção inferior a 10%.¹⁰ Os indivíduos que contenham, no seu genoma, um cromossoma extra ou alguma anomalia genética apresentam uma maior suscetibilidade para o desenvolvimento de cancros. Por exemplo, a síndrome de Down é uma doença genética caracterizada pela presença de uma cópia extra do cromossoma 21 e os sujeitos afetados pela doença apresentam um risco de desenvolvimento de leucemia aguda 12 a 20 vezes superior.⁹ Porém, é importante salientar que a seleção natural faz com que este tipo de mutações seja raro em virtude da maioria dos portadores morrer antes de procriar, evitando assim a transmissão das mesmas aos descendentes.⁴

3.2 Carcinogénese

A carcinogénese deriva da acumulação de mutações ocorridas em genes responsáveis pela regulação do ciclo celular ao longo de um período médio em adultos de aproximadamente vinte anos, conferindo às células neoplásicas a capacidade de seguirem o seu próprio programa de replicação. Deste modo, a disfunção do ciclo celular resultante das muitas mutações adquiridas é a base molecular da oncogénese.^{2,4}

As mutações responsáveis pelo surgimento da neoplasia ocorrem em diversos genes reguladores, particularmente nos proto-oncogenes, nos genes supressores tumorais, nos genes reguladores da apoptose e nos genes reparadores do ADN. Os proto-oncogenes são genes indutores da divisão celular e, quando mutados, tornam-se constitutivamente ativos, dando origem aos chamados oncogenes. Os oncogenes são considerados geneticamente dominantes, o que significa que geralmente uma única cópia mutada é suficiente para produzir proteínas normais promotoras do crescimento celular em quantidades exageradas, dando origem à carcinogénese. Ao contrário dos proto-oncogenes, a função normal dos genes supressores tumorais consiste na inibição da divisão celular. Porém, as mutações ocorridas nestes genes vão levar à perda dessa função e, por conseguinte, a uma redução das proteínas com atividade reguladora

inibitória, facilitando assim a multiplicação celular. Os genes reguladores da apoptose também podem sofrer mutações, que irão contribuir para a indução da carcinogênese. O gene *bcl-2* é um exemplo de gene anti-apoptose que é sobreexpresso em certas neoplasias, como acontece no caso dos linfomas. Por último, os genes reparadores de ADN são responsáveis por corrigir os erros decorridos durante a replicação normal do ADN. Se estes erros não forem corrigidos adequadamente por proteínas reparadoras, podem levar a uma transformação neoplásica. Portanto, os indivíduos portadores de mutações nestes genes apresentam um risco superior de desenvolver cancro.⁴

3.3 Crescimento tumoral

Um tumor desenvolve-se a partir de uma única célula cancerígena rodeada por tecido saudável (Figura 3.1). Esta célula tumoral irá multiplicar-se a uma velocidade superior à das restantes células, formando-se uma pequena massa tumoral, que irá competir com as células normais pelos nutrientes provenientes da corrente sanguínea. Contudo, embora o tumor se desenvolva a partir de uma célula, nem todas as células do tumor se comportam da mesma forma, existindo células que são quiescentes (não se dividem) e células que morrem espontaneamente por apoptose. Por outro lado, algumas células saudáveis acabam por morrer porque não têm capacidade de competir com as células cancerígenas e, nesse caso, ocorre a destruição dos tecidos normais adjacentes, comprometendo a função do órgão.⁵ Nos tumores sólidos num estadió inicial (1-2 mm³), o oxigénio e os nutrientes alcançam o centro da massa tumoral através de difusão simples.¹² Quando o tumor atinge cerca de 2 mm³, a suplementação de nutrientes fica comprometida para as células que se encontram no interior da massa tumoral, podendo levar à necrose das mesmas. Para o tumor se desenvolver para além desse tamanho, é necessário este induzir a formação de vasos sanguíneos, um processo designado por angiogénese, de modo a que todas as células sejam nutridas. Por outro lado, se a massa tumoral não tiver acesso à circulação, o tumor poderá permanecer desse tamanho durante vários anos. Após a formação de novos vasos sanguíneos, as células tumorais podem-se disseminar para a corrente sanguínea e permanecer em circulação até encontrarem um ambiente propício para se instalarem, e aí essas células originam um foco metastático do tumor primário.^{2,5,9}

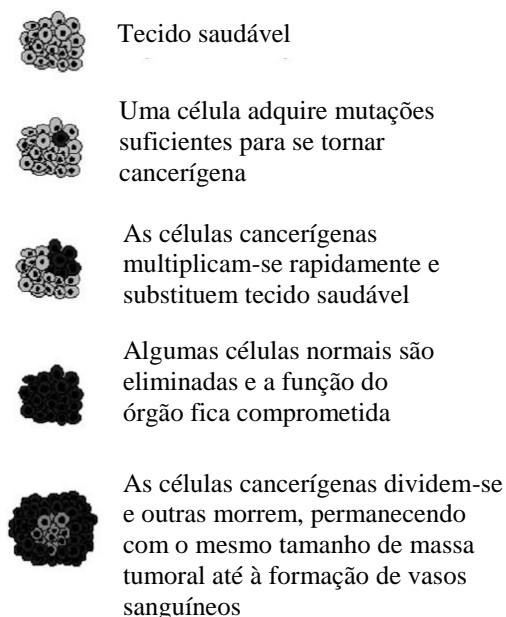


Figura 3.1 - Desenvolvimento inicial da massa tumoral. Adaptado de [5].

3.4 Metastização

O processo de metastização inicia-se quando as células tumorais se separam do tumor primário, movem-se através da matriz extracelular (MEC) e atingem a corrente sanguínea ou o sistema linfático, disseminando-se assim por todo o organismo e dando origem a diversos tumores secundários, designados por metástases.^{2,4}

Embora este processo pareça ser relativamente fácil, existem diversas limitações para a progressão para metastização. Quando as células neoplásicas alcançam a circulação sanguínea, submetem-se a um percurso sinuoso, já que apenas uma em cada dez mil células consegue sobreviver a este trajeto. Estas células podem ser facilmente destruídas na corrente sanguínea devido a diversos fatores, tais como por destruição mecânica, ação citotóxica e apoptótica do óxido nítrico produzido pelas células endoteliais e macrófagos e o contacto com as células do sistema imunitário, como os leucócitos. Portanto, as células neoplásicas, enquanto circulam na corrente sanguínea, têm de evitar a sua deteção pelo sistema imunitário. Por outro lado, as células tumorais libertam substâncias químicas com o objetivo de desencadear a agregação plaquetar e a formação de fibrina, de modo a criarem um mecanismo de defesa ao circularem sob a forma de agregados de células neoplásicas, tendo assim mais hipóteses de sobreviver.^{2,4}

Quando a disseminação das células tumorais ocorre por meio do sistema linfático, o processo de metastização sucede de forma mais facilitada, devido à possibilidade destas células se multiplicarem nos gânglios, tornando-se assim uma fonte

de novos agregados celulares. Os gânglios linfáticos, quando invadidos, aumentam de tamanho e tornam-se palpáveis, sendo designados por adenopatias. Além da disseminação sanguínea e linfática, a formação de metástases também pode ocorrer por via iatrogénica devido à realização de certas intervenções médicas, como é o caso de uma biópsia por punção com agulha de um tumor, que pode levar à disseminação de células anormais em todo o trajeto da agulha.⁴

Sempre que as células sobreviventes encontram um ambiente propício, estas afastam as células endoteliais e alojam-se noutra tecido, um processo designado por *homing*. O que se tem verificado é que a fixação das células nos tecidos secundários é muito específica dependendo do tipo de cancro, o que significa que muitas das neoplasias apresentam um padrão metastático preferencial para certos órgãos. Um dos possíveis exemplos é o caso das células do cancro do cólon que metastizam preferencialmente para o fígado. Os pulmões, também, são um local frequente de instalação de metástases, visto que os seus capilares são os primeiros a receber o sangue venoso proveniente de outros órgãos que possam estar afetados pelo cancro.⁴

4. Defesas corporais contra o cancro

Quando uma célula saudável se converte numa célula cancerígena, o sistema imunitário tem a capacidade de a reconhecer como anormal e, por isso, existe um maior risco de desenvolver cancro em indivíduos cujo sistema imune esteja deprimido, como é o caso de doentes com SIDA, pessoas que consumam fármacos imunossuppressores, idosos ou indivíduos com doenças auto-imunes.⁹

Todas as células normais apresentam, à sua superfície, substâncias reconhecidas e marcadas pelo sistema imunitário, designadas por antigénios. Em circunstâncias normais, o sistema imunitário não reage contra as suas próprias células, no entanto, sempre que uma célula normal se converte numa célula tumoral, surgem novos antigénios, denominados antigénios tumorais, na sua superfície, que são desconhecidos para as células do sistema imune. Portanto, o sistema imunitário vai reconhecer as células tumorais como estranhas, podendo ser capaz de as travar ou destruir antes que se estabeleçam. Contudo, mesmo um sistema imunitário em bom funcionamento, pode não conseguir eliminar estas células e, quando formada a massa tumoral, já é pouco provável que o sistema imunitário tenha capacidade de a destruir.⁹

Certos antígenos tumorais, também denominados marcadores tumorais, podem ser detetados através de análises sanguíneas. A sua quantificação pode indiciar a necessidade de exames mais sensíveis para a deteção de um dado cancro em pessoas que não apresentem quaisquer sintomas da doença, para o controlo da eficácia do tratamento ou para a deteção de uma eventual reincidência. Contudo, é importante salientar que, por vezes, os marcadores tumorais podem estar presentes no sangue de pessoas que não sofrem de cancro. No anexo I, encontra-se um quadro com os principais marcadores tumorais, bem como a respetiva descrição dos mesmos.⁹

5. Prevenção e tratamento dos tumores

5.1 Prevenção

A prevenção oncológica pode evitar cerca de 60% das mortes por cancro e é exequível através de diversas medidas profiláticas, entre as quais a prática regular de exercício físico, o controlo do índice de massa corporal e uma alimentação rica em frutas e legumes verdes.⁴ A prática de atividade física regular leva a uma redução dos níveis de insulina, glicose e triglicéridos e aumenta o colesterol HDL, conferindo um efeito protetor contra a proliferação de lesões do cancro da mama e colo-retal. Os frutos e vegetais são importantes na prevenção do cancro, pois são ricos em potenciais substâncias anticancerígenas, visto que contêm diversos antioxidantes e minerais e são boas fontes de fibra, potássio, licopeno, carotenóides, vitamina C, ácido fólico e outras vitaminas.^{2,4,11} O tabagismo é um fator de risco que predispõe para numerosos cancros, como por exemplo o cancro do pulmão, bexiga, esófago, laringe e lábio. Estima-se que, pelo menos, 16% dos cancros nos países em desenvolvimento, onde o uso do tabaco começou nos últimos 30 anos, estejam diretamente relacionados com hábitos tabágicos e, por isso, é fundamental a cessação tabágica. A utilização do preservativo durante as relações sexuais bem como a vacinação podem também prevenir algumas infeções associadas a certos cancros, como as provocadas pelo papilomavírus, vírus da imunodeficiência humana (VIH) ou vírus da hepatite. De modo a reduzir o risco de desenvolver melanoma, é aconselhável a utilização de protetor solar com um fator de proteção solar (FPS) elevado e evitar a exposição ao sol, particularmente entre as 11 e as 16 horas.^{2,4,9}

Além do mais, a deteção precoce do tumor, mesmo antes do aparecimento dos primeiros sinais ou sintomas, permite tratar o cancro numa fase inicial, quando este

ainda é facilmente curável. O diagnóstico precoce, nalgumas circunstâncias, pode ser facilmente determinado a partir de exames de rotina, como é o caso do cancro do colo do útero, que é facilmente diagnosticado através de um esfregaço citológico. Ainda, a quimioprevenção tem sido uma estratégia com um papel cada vez mais importante na prevenção oncológica e consiste na utilização de compostos naturais, como as vitaminas A, C, E ou outras substâncias com propriedades antioxidantes e ativadoras das enzimas hepáticas de destoxificação, ou sintéticos, como é o caso do tamoxifeno na prevenção do cancro da mama ou a finasterida na prevenção do cancro da próstata, a fim de bloquear, reverter ou prevenir o desenvolvimento do cancro invasivo.^{4,11}

Por último, desde que se tornou evidente que a componente hereditária é importante para a predisposição para o cancro, têm sido formuladas intervenções clínicas para os portadores de mutações pertencentes a famílias afetadas. A cirurgia profilática representa uma abordagem primária à prevenção do cancro para os portadores de mutações em genes associados a uma elevada predisposição para a patologia, sendo este um processo complexo, que requer uma avaliação do benefício-risco, uma vez que este é um procedimento efetuado num indivíduo saudável no dado momento. Um dos exemplos mais conhecidos é a mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, que confere uma probabilidade de desenvolvimento de cancro da mama entre 60 a 80%.¹¹

Sendo assim, teoricamente, uma boa parte dos cancros diagnosticados poderia ser evitável, contudo existem limitações pois nem todas as causas evitáveis foram, ainda, identificadas com clareza.²

5.2 Terapêutica anticancerígena convencional

A terapêutica antitumoral tem como principal objetivo a eliminação das células neoplásicas, evitando lesar as células saudáveis do organismo. Contudo, a falta de seletividade e especificidade do tratamento para as células tumorais tem sido o principal inconveniente da terapêutica, levando a uma elevada incidência de efeitos adversos. Além disso, as hipóteses de recidiva são elevadas a não ser que se destrua a totalidade das células tumorais existentes no organismo humano, estando geralmente estas recidivas associadas a tumores mais agressivos e resistentes à terapêutica anticancerígena. As decisões do tratamento dependem de diversos fatores, entre os quais a probabilidade de cura ou de prolongamento da vida com qualidade de vida quando a recuperação já não é possível, o efeito do tratamento sobre os sintomas, os efeitos

adversos do tratamento e a opinião do doente acerca de todos esses aspetos. Na atualidade, o tratamento antitumoral envolve diferentes metodologias, particularmente a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia e a hormonoterapia.^{4,8,9}

5.2.1 Cirurgia

A cirurgia permite a remoção do tumor de forma rápida e eficaz e, por isso, é considerada a terapêutica mais utilizada, sendo o único método que permite o estudo anátomo-patológico do tumor. Contudo, a remoção cirúrgica força à remoção de muito tecido saudável, conduzindo a uma alteração do funcionamento normal do órgão, e não assegura a eliminação de micrometástases. Portanto, quando o tumor se encontra numa fase avançada e disseminada, a cirurgia já não é a opção mais indicada. Além do mais, alguns tumores encontram-se em locais inacessíveis, como é o caso de tumores localizados em áreas profundas do cérebro ou próximos de estruturas vitais, como o tronco cerebral, e, nesta situação, mesmo que o tumor esteja confinado a um único local, não é possível a realização da cirurgia.^{4,9,13}

5.2.2 Radioterapia

A radioterapia consiste na erradicação do tumor através da irradiação por raios X ou raios Y emitidos a partir de uma fonte de radiação externa (radioterapia externa) ou a partir de implantes intraorgânicos (radioterapia interna ou braquiterapia) e é utilizada, principalmente, em casos de tumores localmente avançados, quando a cirurgia já não é indicada. Contudo, tal como na cirurgia, a radioterapia não é adequada em caso de metastização. A radiação ionizante induz uma diminuição da massa tumoral pois conduz à eliminação das células tumorais por ação direta ou através da indução da apoptose. No entanto, é difícil impedir que a radiação atinja os tecidos circundantes sãos e, por isso, os tecidos com rápida proliferação celular, como os epitélios cutâneo e digestivo, são os mais afetados. Esta terapia é utilizada em certos cancros, tais como o cancro da próstata, da mama, do colo do útero ou da laringe.⁴

5.2.3 Quimioterapia

A quimioterapia compreende a utilização de fármacos citotóxicos, normalmente administrados por via sistémica, que atuam a nível da replicação do ADN, de forma a impedir a divisão celular. Habitualmente, a quimioterapia é empregue em conjunto com outras metodologias como a cirurgia e/ou a radioterapia, e não é de utilização isolada,

sendo a sua principal aplicação a neoplasia metastática. O principal inconveniente da quimioterapia reside no facto dos fármacos citotóxicos não só atuarem nas células tumorais, mas também nas células normais, particularmente nas células com tempo de reprodução mais curto, como as células hematopoéticas, as células do epitélio gastrointestinal ou as células dos folículos pilosos, provocando efeitos adversos graves.^{4,9}

O tipo de cancro irá condicionar quais os fármacos a utilizar na abordagem quimioterápica, bem como as suas respetivas doses. Além do mais, ao longo do tempo as células tumorais sofrem mutações, que as tornam resistentes a determinados fármacos anticancerígenos e, por isso, nem todos os cancros respondem adequadamente à quimioterapia. No caso dos tumores sólidos, a hipoxia é uma característica típica, conduzindo também a uma maior resistência à radioterapia e a alguns fármacos citotóxicos.^{4,9,14} Geralmente, na terapia anticancerígena são administrados, em simultâneo, fármacos com diferentes mecanismos de ação, de forma a prevenir o desenvolvimento de células neoplásicas resistentes.¹⁵

Ao contrário da habitual utilização dos fármacos, em que se administra a dose mínima eficaz, na quimioterapia recorre-se à dose máxima tolerável em intervalos de tempo sucessivos, de modo a que uma fração constante de células tumorais seja eliminada em cada ciclo até se obter a cura (Gráfico 5.1). As doses elevadas são também requeridas devido a diversas células tumorais desenvolverem mecanismos de evasão, como as bombas de efluxo.^{9,15} Por vezes, como as doses administradas são muito intensas, é frequente a realização concomitante de um transplante autólogo da medula óssea de forma a evitar os danos irreversíveis que podem ser causados na mesma.⁹ No anexo II, encontra-se um quadro enumerando as diversas classes de fármacos antineoplásicos, bem com os respetivos mecanismos de ação e efeitos adversos.

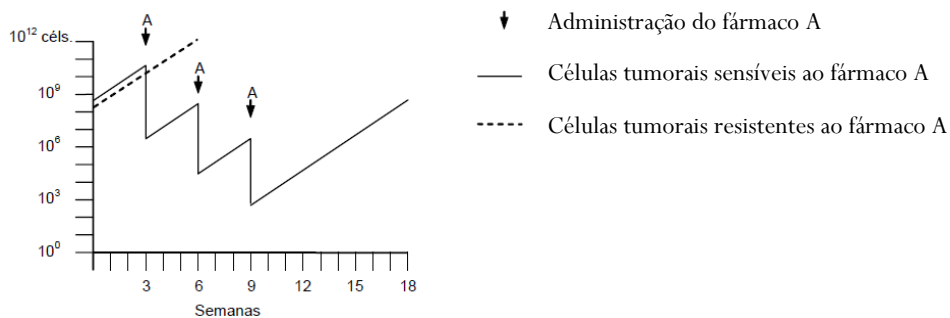


Gráfico 5.1 – Evolução do número de células tumorais ao longo de ciclos sucessivos de quimioterapia, conforme o conceito de eliminação logarítmica, o qual parece seguir uma cinética gompertziana. Adaptado de [16].

5.2.4 Hormonoterapia

A hormonoterapia consiste na privação de certos tumores, como o cancro da mama e da próstata (cancros hormonodependentes), da influência das respetivas hormonas, levando assim a uma redução da massa tumoral. A privação hormonal apenas controla o tumor temporariamente, pois acabam por surgir células hormono-independentes, que permitem o recomeço da proliferação tumoral. No caso do cancro da próstata, a hormonoterapia recorre a fármacos antiandrogénios, estrogénios e antagonistas LH-RH, ao passo que, no cancro da mama, recorre a antiestrogénios. Sendo assim, a hormonoterapia é utilizada como tratamento adjuvante da cirurgia ou radioterapia.⁴

6. A nanotecnologia no âmbito da terapia antineoplásica

Nos últimos tempos, a mortalidade associada a doenças cancerígenas tem diminuído devido uma melhor compreensão da etiologia e da fisiopatologia destas doenças. Apesar dos meios de diagnóstico e do tratamento anticancerígeno se terem tornado melhores e mais eficazes ao longo das últimas quatro décadas, o cancro continua a ser considerado a doença mais letal em todo o mundo.^{2,7} Tendo em conta a severidade da doença e a toxicidade associada aos fármacos anticancerígenos, o grande desafio, de momento, é selecionar os transportadores de fármacos corretos e conjugá-los a ligandos específicos, de forma a dirigir o agente anticancerígeno para o local-alvo.⁷

A nanotecnologia é a área que estuda a criação e a aplicação dos materiais à escala nanométrica (Figura 6.1). Esta emergente vertente científica está a ser introduzida nas mais diversas áreas, como a engenharia de materiais ou eletrónica e computação. No entanto, as maiores expectativas estão na sua aplicação no âmbito da saúde. A nanotecnologia associada à medicina fez surgir a nanomedicina, que se baseia no desenvolvimento de novas terapias e no aperfeiçoamento das terapias já existentes. Com a sua utilização tornou-se possível reaproveitar alguns fármacos anticancerígenos que, devido à sua elevada toxicidade entraram em desuso, mas que conjugados com sistemas transportadores como as nanopartículas podem voltar a ser utilizáveis. Para além disso, a nanomedicina também inclui o progresso nos métodos de diagnóstico, de forma a permitir a deteção das doenças mais precocemente.^{8,17,18}

Para este efeito, os sistemas nanoparticulados e particularmente as nanopartículas têm sido usados para ultrapassar alguns inconvenientes da terapêutica convencional,

entre os quais a biodistribuição e a vetorização inespecíficas, a baixa hidrossolubilidade, a baixa biodisponibilidade oral, a estreita margem terapêutica, a baixa concentração que alcança o alvo terapêutico, a elevada afinidade para as proteínas plasmáticas, o desenvolvimento de resistência a múltiplos fármacos e a rápida eliminação do fármaco da circulação sanguínea. Sendo assim, os nanossistemas podem melhorar o índice terapêutico através 1) da otimização das características estruturais do fármaco, aumentando o seu tempo de circulação e os seus perfis farmacocinético e farmacodinâmico, 2) da libertação seletiva do fármaco nas células tumorais por vetorização passiva através do aumento do efeito de retenção e permeabilidade, 3) da vetorização ativa do fármaco aumentando a sua seletividade através da conjugação a anticorpos ou antigénios tumorais e, ainda, 4) da superação da resistência aos medicamentos induzida pela glicoproteína-P.^{7,19,20} Embora esta nova tecnologia seja promissora comparativamente à quimioterapia convencional, a libertação do fármaco por dissociação do complexo inicial ainda permanece como uma das principais limitações.¹⁹ A baixa biodisponibilidade oral, a instabilidade na corrente sanguínea e a possibilidade de gerarem toxicidade são outras das restrições ainda associadas às nanopartículas.²¹

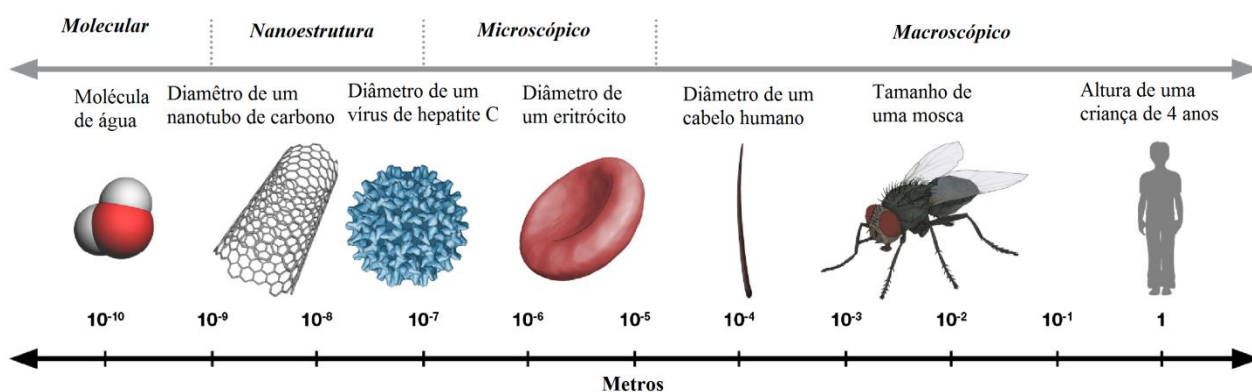


Figura 6.1 – Escala demonstrativa do tamanho das nanoestruturas comparativamente ao de outros objetos vulgarmente conhecidos. Adaptado de [17].

Os tipos de nanossistemas mais comuns a serem estudados com aplicação na terapia antitumoral são os dendrímeros, os lipossomas, as nanopartículas poliméricas, as micelas, as nanopartículas proteicas, as nanopartículas cerâmicas, as nanopartículas virais, as nanopartículas metálicas e, por fim, os nanotubos de carbono (Figura 6.2). Apesar de existir muita investigação nesta área, apenas alguns nanossistemas foram aprovados pelas autoridades regulamentares até agora, nomeadamente um sistema de

doxorrubicina lipossomal (Myocet[®]), um de doxorrubicina lipossomal conjugado com polietilenoglicol (PEG) (Doxil[®]), um de daunorrubicina lipossomal conjugado com PEG (DaunoXome[®]) e, por último, o mais recentemente aprovado sistema de paclitaxel conjugado a nanopartículas de albumina (Abraxane[®]).^{6,19,20}

Os dendrímeros, por apresentarem algumas propriedades singulares como a sua multivalência controlada e a sua monodispersidade, são um dos nanossistemas mais estudados atualmente e serão o foco desta monografia.

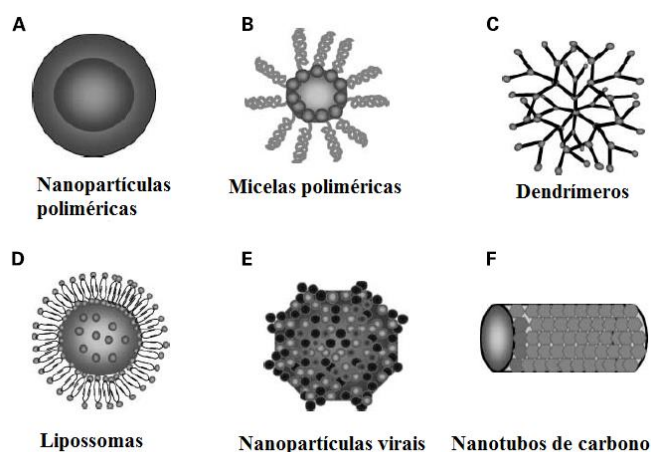


Figura 6.2 – Ilustrações representativas dos nanossistemas utilizados na terapia anticancerígena. A) nanopartículas poliméricas; B) micelas poliméricas; C) dendrímeros; D) lipossomas; E) nanopartículas virais; F) nanotubos de carbono. Adaptado de [21].

7. Síntese dos dendrímeros e as suas propriedades

Os dendrímeros, também designados por “moléculas em cascata”, são macromoléculas poliméricas com uma estrutura semelhante a uma árvore, evidenciando um arranjo altamente ramificado e bem definido, que assume um tamanho à nanoescala.²²⁻²⁴ Os dendrímeros foram propostos pela primeira vez no final da década de 70, contudo, apenas no início dos anos 90, começaram a surgir publicações na literatura em número significativo. Esta demora para o aparecimento de publicações pode ser explicada pelo tempo necessário para o desenvolvimento de métodos de síntese eficientes, pelo elevado custo da sua produção e, também, devido à impossibilidade de adquirir os dendrímeros por meio comercial.²⁵ Em 1978, Vögtle e os seus colaboradores publicaram uma metodologia inovadora em “cascata” que permitia a síntese da arquitetura dendrítica e, a partir desse momento, foi possível sintetizar estas nanomoléculas com maior eficiência, bem como estudá-las para futuras aplicações.²⁶

O termo dendrímero tem origem grega a partir da palavra “dendron”, que significa “árvore/ramificação” devido à sua semelhança a uma árvore, e da palavra

“meros”, que significa “parte”. A estrutura geral do dendrímero possui três componentes fundamentais, nomeadamente o núcleo central com dois ou mais grupos reativos, a camada interior composta por unidades repetidas (gerações), que divergem radialmente a partir do núcleo central, e, por último, a região exterior, que se encontra ligada ao interior da geração mais externa (funcionalidade terminal).²² Os monómeros que se ligam ao núcleo central (0.0G) são denominados por monómeros de primeira geração (1.0G) e os monómeros de segunda geração são os que se ligam a cada um dos monómeros de primeira geração (Figura 7.1).²⁷ Tanto o número de gerações do dendrímero, como a composição química dos seus componentes estruturais são fatores que irão influenciar o tamanho, a forma e a reatividade dos mesmos. Devido ao facto de ser possível controlar esses mesmos fatores durante a síntese dos dendrímeros, estes são considerados como uma das formas nanoparticuladas mais versáteis e personalizáveis.¹⁷

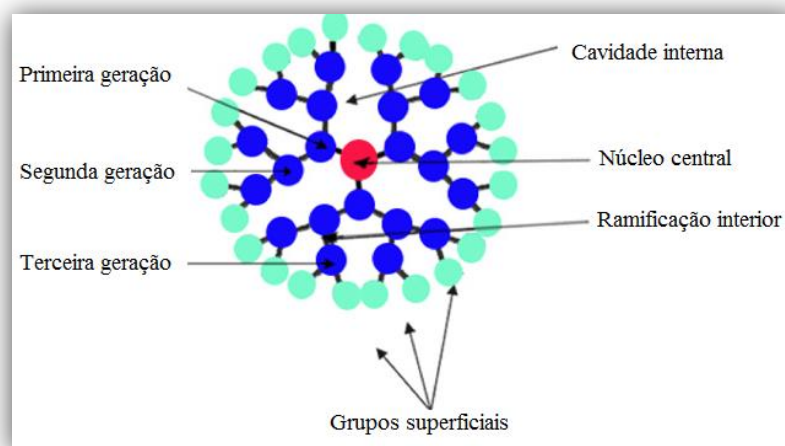


Figura 7.1 - Estrutura geral dos dendrímeros. Adaptado de [22].

O tamanho do dendrímero é relevante na forma tridimensional verificando-se que, geralmente, os dendrímeros de baixa geração apresentam uma estrutura mais aberta, enquanto os que apresentam uma alta geração tornam-se mais densos e com uma estrutura mais globular.²⁵ À medida que a dimensão do dendrímero aumenta uma geração, o seu peso molecular duplica em tamanho (Figura 7.2).²⁸ Além disso, o tamanho dos dendrímeros é muito semelhante ao das estruturas biológicas existentes no ser humano, permitindo assim uma interação única com os sistemas biológicos a um nível molecular.²⁹ Por exemplo, os dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) 5.0G apresentam um tamanho e forma aproximadamente equivalente ao da hemoglobina, cerca de 5.5 nm de diâmetro.²⁵

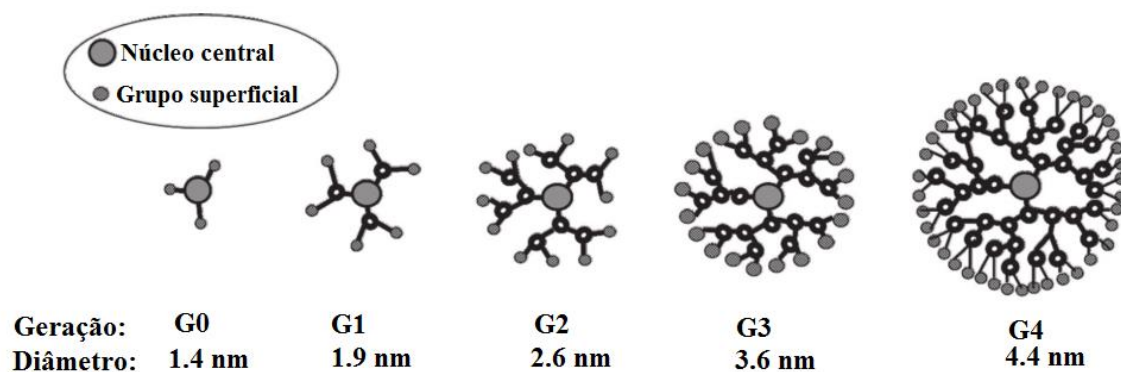


Figura 7.2 – Ilustração representativa da evolução de um dendrímero a partir do núcleo central até à geração 4.0G, bem como do aumento linear do seu diâmetro. Adaptado de [30].

Relativamente às suas propriedades, os dendrímeros apresentam uma arquitetura tridimensional que os torna convenientes para a libertação de fármacos num local-alvo específico devido às suas características únicas, tais como a sua elevada capacidade de funcionalização e baixa polidispersidade. O facto de possuírem uma superfície facilmente modificável também é uma propriedade relevante destes, tornando-os polivalentes e permitindo assim a conjugação do dendrímero tanto com ligandos como com os fármacos.⁸

Comparando as características dos dendrímeros com as dos polímeros lineares, verifica-se que os primeiros apresentam algumas vantagens relativamente aos últimos, tais como a multivalência controlada dos dendrímeros, que permite a ligação a fármacos, grupos de vetorização do fármaco ou grupos solubilizantes, proporcionando assim um comportamento farmacocinético reproduzível.³¹ Por outro lado, os polímeros tradicionais apresentam uma elevada polidispersidade, que lhes confere diversas limitações a nível farmacocinético.³²

Além disso, estes sistemas permitem aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade de fármacos pouco hidrossolúveis, devido à sua estrutura ter a capacidade de possuir um núcleo central hidrofóbico e uma superfície hidrofílica. A solubilidade conferida pelo dendrímero é afetada por diversos fatores, como o número de gerações, o pH, o núcleo, a temperatura, arquitetura polimérica e os grupos funcionais. Os fármacos podem permanecer na cavidade intramolecular vazia ou serem conjugados aos grupos superficiais do dendrímero para posterior libertação controlada.²²⁻²⁴

Quanto ao processo de síntese, várias classes de dendrímeros têm sido sintetizadas, havendo alterações significativas entre elas quanto aos materiais que integram o núcleo, às unidades de ramificação e aos grupos superficiais.²⁵ Geralmente, a

síntese dos dendrímeros implica a repetição de uma sequência de reações compostas por dois passos, que correspondem ao passo de crescimento da geração e ao passo de ativação. Estas reações devem ser completas e com elevados rendimentos, de modo a obter dendrímeros sem defeitos estruturais. Estas nanomoléculas podem ser sintetizadas através de duas estratégias distintas, nomeadamente por síntese divergente, desenvolvida por Tomalia *et al.* e Newkome *et al.*, ou síntese convergente, desenvolvida por Hawker e Fréchet.³¹ A principal diferença de ambas estratégias restringe-se à direção em que ocorre o processo de síntese.²⁷

7.1 Síntese divergente

A síntese divergente baseia-se na adição sucessiva de monómeros repetidos que prosseguem radialmente para o exterior, iniciando-se a partir do núcleo central, sendo este que irá determinar o número de pontos de ramificação (Figura 7.3).³¹ À medida que são adicionados mais monómeros, há um aumento do peso molecular e dos grupos funcionais presentes à superfície do dendrímero.²³

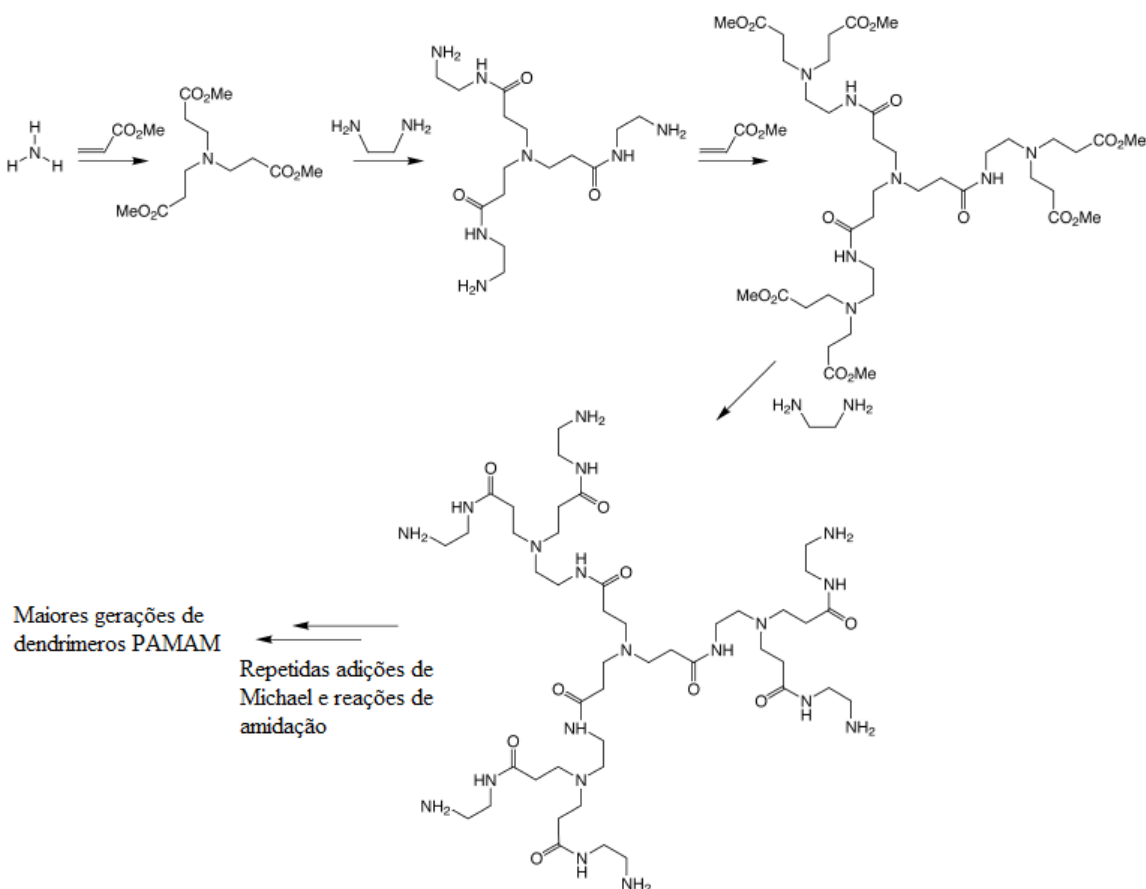


Figura 7.3 - Síntese divergente de dendrímeros PAMAM. Adaptado de [31].

7.2 Síntese convergente

Ao contrário da síntese divergente, os dendrímeros também podem ser sintetizados iniciando-se a partir da superfície de acordo com uma abordagem convergente. Neste caso, o crescimento da nanomolécula inicia-se a partir das extremidades da cadeia, sintetizando-se primeiramente os diversos pontos de ramificação que irão constituir os dendrímeros e, por último, essas ramificações são unidas a um núcleo central (Figura 7.4).^{23,31}

Comparando ambos os métodos, verifica-se que a abordagem convergente permite um maior controlo da arquitetura dendrítica final.³¹ Esta estratégia de síntese apresenta um menor risco de defeitos na estrutura final, tal como por exemplo a existência de uma ramificação incompleta, um defeito que frequentemente ocorre durante a síntese divergente.²³ Em contrapartida, verificou-se que a abordagem divergente é mais adequada para a produção de dendrímeros em larga escala. Contudo, ambas as abordagens de síntese envolvem processos graduais que são fastidiosos e demorados. Além do tempo consumido na produção, estes modelos de síntese são muito dispendiosos. Todavia, as mais-valias conferidas pelas características estruturais e pelas propriedades invulgares próprias dos dendrímeros justificam o elevado custo da sua produção.³¹

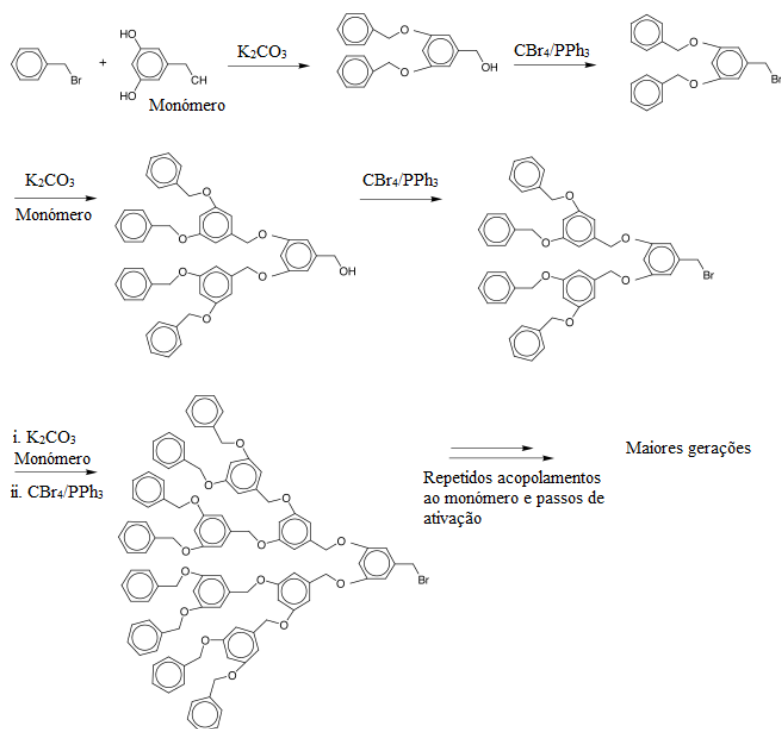


Figura 7.4 - Síntese convergente de dendrímeros poli(arileter). Adaptado de [31].

7.3 Outros métodos de síntese

Como consequência, têm sido explorados outros métodos mais rápidos para sintetizar os dendrímeros. Um dos métodos de síntese que tem sido investigado é a abordagem convergente de dupla fase, em que primeiramente é preparado um “hipernúcleo” composto por um grande número de grupos funcionais reativos à superfície, seguido pela ligação às ramificações dendríticas convergentes. Esta técnica permite produzir os dendrímeros maiores em menor tempo e com maior facilidade. Um outro método de síntese, a estratégia de acoplamento ortogonal, baseia-se na utilização de dois monómeros distintos para eliminar os passos de proteção ou ativação. Graças a esta técnica, o número de passos de síntese é encurtado para metade.³¹

8. Aplicações gerais dos dendrímeros na área farmacológica e médica

A aplicação dos dendrímeros na área médico-farmacêutica tornou-se rapidamente numa das utilizações mais atrativas destas nanopartículas.³¹

8.1 Dendrímeros como transportadores de fármacos

A estrutura bem definida, a forma globular compacta, o tamanho análogo ao dos constituintes biológicos e a elevada capacidade de funcionalização característica dos dendrímeros faz com que sejam considerados o único grupo de nanopartículas altamente adaptado para aplicação como transportadores de fármacos.^{18,27,28} Neste momento, já é consensual que os transportadores de fármacos apresentam algumas vantagens sobre os fármacos administrados na forma livre, entre os quais o aumento do tempo de semivida, a diminuição da resistência e o controlo da libertação dos fármacos.³³ Além do mais, é possível o transporte de múltiplos fármacos numa mesma nanomolécula, permitindo assim estratégias de tratamento sinérgicas. Uma das áreas em que esta estratégia mais se tem aproveitado é a da terapêutica anticancerígena.^{18,27,28} Para além da sua aplicação na área da oncologia, os dendrímeros podem ser utilizados noutras áreas da medicina, como é o caso do microbicida baseado num dendrímero de poli(L-Lisina) (PLL), designado por VivaGel[®], que é aplicado topicamente para a prevenção do VIH e herpes genital. Esta formulação ainda não foi aprovada para comercialização, contudo já se encontra em ensaios clínicos em humanos.^{34,35} Os dendrímeros podem ser utilizados na libertação controlada de fármacos através de duas formas distintas, dependendo do seu

método de preparação, nomeadamente o fármaco ser aprisionado no interior da arquitetura dendrítica (encapsulado) ou o fármaco pode ser ligado covalentemente à superfície do dendrímero (conjugado).^{8,31}

8.1.1 Encapsulamento do fármaco

A possibilidade de encapsular moléculas hospedeiras no interior da estrutura dendrítica proporciona o potencial destes nanossistemas interagirem com fármacos lábeis ou com baixa hidrossolubilidade. Portanto, o encapsulamento pode facultar uma forma de controlar a libertação do fármaco, bem como permitir o aumento da sua solubilidade.²⁵ Duncan e Malik encapsularam a cisplatina no interior de uma estrutura dendrítica e observaram um aumento da atividade antitumoral e níveis inferiores de toxicidade.¹⁵

Uma das estratégias para encapsular o fármaco no interior dos dendrímeros é o encapsulamento físico. Meijer *et al.* verificaram que, durante o processo de síntese, as moléculas hospedeiras podem ser fisicamente retidas na “cavidade” interna das caixas dendríticas de maiores gerações quando um derivado de aminoácido é utilizado para revestir cada grupo terminal do dendrímero. O derivado de aminoácido utilizado corresponde a uma molécula volumosa sujeita a pontes de hidrogénio e, por isso, as moléculas aprisionadas não conseguem difundir para fora do invólucro em direção à solução circundante. Em seguida, a libertação da molécula pode ser alcançada por meio da eliminação do revestimento, submetendo o dendrímero a condições hidrolíticas adequadas.^{25,31}

A segunda estratégia existente para encapsular a molécula hospedeira no interior do dendrímero baseia-se na interação através de ligações não covalentes, tais como as pontes de hidrogénio, entre a arquitetura dendrítica e o fármaco.³¹

Por último, a terceira estratégia é a mais fácil de executar e consiste na utilização de interações hidrofóbicas entre a estrutura dendrítica e a molécula hospedeira. Newkome *et al.* prepararam nanossistemas dendríticos com um interior hidrofóbico e uma superfície hidrofílica, cujo comportamento era semelhante a micelas unimoleculares com a capacidade de solubilizar fármacos hidrofóbicos em meios aquosos, sendo por isso designados por micelas dendríticas.³¹

Quanto ao método de encapsulamento físico, este não parece ser muito viável devido à sua capacidade muito limitada e às condições extremamente rigorosas necessárias para remover o revestimento e libertar o seu conteúdo. Pelo contrário, as

estratégias que envolvem interações não covalentes, como pontes de hidrogénio ou interações eletrostáticas, para o encapsulamento do fármaco parecem ser métodos mais facilmente praticáveis e mais simples. As micelas dendríticas apresentam algumas vantagens comparativamente às micelas unimoleculares convencionais. Estas últimas apresentam problemas de estabilidade pois são agregados de blocos anfifílicos em solventes acima da concentração micelar crítica (c.m.c). Contudo, quando a concentração desce abaixo da c.m.c., a micela torna-se termodinamicamente instável. Este processo rapidamente aconteceria no organismo humano, destruindo a estrutura da micela e libertando o fármaco em locais inapropriados. Por outro lado, as micelas dendríticas são constituídas por segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos que se encontram covalentemente ligados e, por isso, são independentes da concentração e apresentam uma estrutura mais estática e estável.^{25,31} O PEG tem sido utilizado na formação de micelas dendríticas, pois quando conjugado com a superfície de um dendrímero fornece um invólucro hidrofílico em torno de um núcleo hidrofóbico. Além do mais, a utilização do PEG é extremamente atrativa devido a conferir diversas mais-valias tais como o aumento da solubilidade e biocompatibilidade.²⁵

8.1.2 Conjugação dendrímero-fármaco

A conjugação entre o dendrímero e o fármaco, por meio de ligações covalentes, é possível graças à elevada capacidade de funcionalização presente à superfície da estrutura dendrítica, permitindo assim um maior controlo sobre a libertação do fármaco comparativamente ao que se observa em interações eletrostáticas. Este sistema nanoparticulado tem a capacidade de transportar diversas moléculas de fármaco, dependendo do número de gerações, das condições de acoplamento e da natureza das ligações envolvidas.^{25,31,36} Deste modo, o número de moléculas incorporadas à superfície é dependente da arquitetura dendrítica, correspondendo o aumento da geração do dendrímero, a uma duplicação do número de grupos superficiais disponíveis para interagir com os fármacos. Contudo, é de salientar que nem todos os grupos superficiais podem estar disponíveis para sofrer interações, como ocorre em caso de impedimento estérico.²⁵

9. Biodistribuição dos dendrímeros

Alguns estudos *in vivo* têm sido realizados para avaliar a biodistribuição dos dendrímeros administrados por via parentérica. Nestes ensaios administra-se um dendrímero marcado com um composto radioativo e analisa-se a distribuição do complexo. Kukowska-Latallo *et al.* analisaram *in vivo* a biodistribuição e eliminação de dendrímeros 5.0G acoplados ao ácido fólico e ao marcador radioativo de trítio [^3H] (G5- ^3H -FA). Os dendrímeros foram testados em ratinhos xenotransplantados com o tumor KB humano, cujas células tumorais expressam elevadas quantidades do recetor do ácido fólico. De forma a minimizar os níveis de ácido fólico na corrente sanguínea, os ratinhos foram alimentados com uma dieta desprovida de ácido fólico. Foram, então, sintetizados dois dendrímeros distintos marcados radioativamente: um acoplado ao ácido fólico e outro não vetorizado (controlo). Após a administração dos dendrímeros, os ratinhos foram examinados periodicamente (5 minutos a 7 dias). Os resultados indicaram que, nos primeiros quatro dias, a *clearance* dos dendrímeros G5- ^3H -FA foi menor comparativamente ao dendrímeros não vetorizados, o que pode significar que os dendrímeros G5- ^3H -FA foram internalizados pelos tecidos que expressavam o recetor do ácido fólico. O rim, para além de ser o principal órgão responsável pela eliminação destes dendrímeros, também expressa elevadas quantidades do recetor do folato. Os níveis dos dendrímeros não vetorizados (G5- ^3H) no rim diminuíram rapidamente e mantiveram-se em níveis moderados nos dias seguintes. Pelo contrário, os níveis dos dendrímeros G5- ^3H -FA aumentaram ligeiramente nas primeiras 24 horas, presumivelmente devido à presença dos recetores do ácido fólico nos túbulos renais. Nos dias que se seguiram, observaram uma diminuição dos níveis, à semelhança de outros compostos que são eliminados por via renal.³⁷

A biodistribuição foi, ainda, avaliada por outros estudos, cujas conclusões indicaram que os dendrímeros de geração mais pequena (3.0G-4.0G) são rapidamente eliminados por via renal, os de 5.0G são excretados por ambas as vias renal e biliar e os dendrímeros com um número de gerações superior (6.0G-9.0G) são eliminados apenas através do fígado e, portanto é possível ajustar o modo de excreção de um dendrímero em função do número de gerações que o constitui.^{34,38} Os rins filtram partículas com dimensões inferiores a 10 nm, enquanto o fígado é responsável por capturar partículas com um tamanho superior a 100 nm, o que aponta para que o tamanho ideal das nanopartículas seja entre 10 e 100 nm, confirmando assim que o tamanho do

dendrímero influencia de forma acentuada a excreção renal e biliar do mesmo.^{22,28} Uma abordagem alternativa para diminuir a excreção renal, seria conjugar a nanopartícula ao óxido de polietileno (PEO), conferindo assim um maior peso molecular ao conjugado. Os dendrímeros com grupos superficiais com carga (aniônicos e catiónicos) e os dendrímeros hidrofóbicos são rapidamente removidos da circulação sanguínea, sobretudo através de via biliar. Por outro lado, os dendrímeros com superfície hidrofílica e os dendrímeros com um número de gerações superior permanecem em circulação durante períodos mais prolongados.^{6,23,24}

Um outro estudo realizado em ratos Wistar analisou a biodistribuição *in vivo* de dendrímeros PAMAM marcados com I¹²⁵, indicando que os dendrímeros aniônicos permanecem em circulação durante mais tempo do que os catiónicos e que a velocidade de eliminação do dendrímero está dependente da sua geração.³⁹

Deve-se ter em atenção que um período de circulação curto pode diminuir a eficiência de libertação do fármaco no local-alvo e, portanto, existe a possibilidade de contornar a situação adicionando um polímero hidrofílico à superfície do dendrímero, tal como o PEG. Contudo, é importante salientar que a modificação da superfície do dendrímero utilizando um ligando radioativo ou um fármaco pode alterar significativamente a distribuição do transportador.^{6,23}

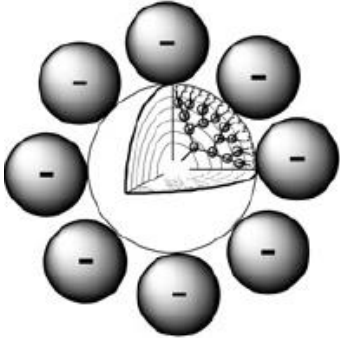
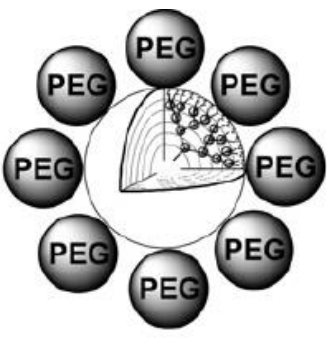
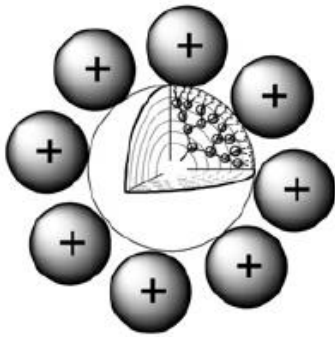
Sendo assim, a biodistribuição é um fator importante a ter em conta, devendo os conjugados dendríticos permanecer em circulação sanguínea o período de tempo suficiente para alcançar a eficácia terapêutica e permitir a acumulação nos locais-alvo. Por outro lado, as nanopartículas devem ser facilmente eliminadas do organismo humano, de modo a evitar os efeitos tóxicos associados a uma acumulação prolongada.³¹

10. Toxicidade associada aos dendrímeros

10.1 Efeitos tóxicos no sistema biológico

Embora exista um elevado otimismo quanto à utilização destes sistemas é muito importante avaliar a toxicidade associada aos dendrímeros de modo a determinar a sua viabilidade relativamente à sua administração no organismo humano. Os dendrímeros, como já foi referido anteriormente, apresentam uma dimensão nanométrica (1-100 nm) e, portanto, têm a capacidade de interagir com alguns elementos celulares, tais como a membrana plasmática, os organelos celulares, como por exemplo o núcleo e as

proteínas, já que estes constituintes celulares também se encontram na escala nanométrica. Os dendrímeros também podem complexar com alguns iões metálicos, como os iões ferro e zinco, podendo levar a repercussões ao nível da bioatividade da hemoglobina e da catálase renal, respetivamente. Contudo, o principal fator determinante para a indução da citotoxicidade induzida por dendrímeros é a sua carga superficial. De acordo com alguns estudos *in vitro*, tem se verificado que os dendrímeros que têm à sua superfície grupos catiónicos são mais citotóxicos comparativamente aos dendrímeros aniónicos ou aos dendrímeros que contenham PEG, pois os primeiros são responsáveis por causar a destabilização da membrana celular, o que, por conseguinte, leva à lise celular (Quadro 10.1). As cadeias de PEG são biocompatíveis, permitindo assim melhorar não só a hidrossolubilidade, como também diminuir a toxicidade.^{22,31,32} Além do mais, os dendrímeros com um menor número de gerações apresentam uma maior biocompatibilidade em comparação aos de gerações superiores. Por exemplo, no caso dos dendrímeros PAMAM, verifica-se um maior nível de biocompatibilidade para os dendrímeros 1.0G a 5.0G.³⁸

Dendrímero aniónico	Dendrímero conjugado ao PEG	Dendrímero catiónico
		
Toxicidade <i>in vitro</i> : - Toxicidade <i>in vivo</i> : - Imunogenicidade: -	Toxicidade <i>in vitro</i> : - Toxicidade <i>in vivo</i> : - Imunogenicidade: -	Toxicidade <i>in vitro</i> : + Toxicidade <i>in vivo</i> : + Imunogenicidade: +/-

Quadro 10.1 – Padrões generalizados representando a toxicidade *in vitro*, a toxicidade *in vivo* e a imunogenicidade dos dendrímeros em função da funcionalidade à sua superfície. Os dendrímeros com carga aniónica ou neutra à superfície exibem uma menor toxicidade e uma maior biocompatibilidade, onde (-) significa que o dendrímero apresenta em menor evidência uma dada característica. Por outro lado, os dendrímeros catiónicos apresentam uma maior toxicidade e imunogenicidade, sendo essas características representadas por (+). Adaptado de [38].

Muitos dos estudos para avaliar a toxicidade dos dendrímeros são realizados *in vitro*, no entanto é importante salientar que os estudos *in vivo* são indispensáveis para comprovar a segurança na utilização dos dendrímeros para o transporte de fármacos.

Relativamente aos testes *in vivo*, até ao presente momento, os autores verificaram que os dendrímeros não exibem propriedades que os impeçam de serem utilizados para fins terapêuticos. No entanto, há necessidade de estudos adicionais para avaliar mais detalhadamente o seu comportamento, que irá depender dos seus constituintes estruturais, particularmente o núcleo central, as gerações interiores e os grupos superficiais. Para além das características do dendrímero, a toxicidade *in vivo* de um polímero é extremamente influenciada pela farmacocinética e pela biodistribuição e, por isso, são tão importantes os testes de biodistribuição, de modo a identificar oportunidades ou entraves à vetorização seletiva do fármaco e, também, para analisar quais os tecidos ou órgãos com maior capacidade de armazenamento do fármaco e que, portanto, são potenciais alvos de toxicidade.^{22,23} Abaixo serão mencionados alguns efeitos tóxicos mais detalhadamente.

10.1.1 Toxicidade hemolítica

Os dendrímeros que exibem na sua superfície grupos catiónicos terminais interagem com os glóbulos vermelhos, levando à sua hemólise. Estes factos são corroborados por um estudo efetuado em ratos albinos do sexo masculino, onde se analisou o potencial dos dendrímeros catiónicos de polipropilenoimina (PPI) libertarem fosfato de primaquina diretamente nas células hepáticas, quando estes eram revestidos perifericamente com galactose. Este estudo *in vivo* indicou que a principal limitação dos dendrímeros catiónicos era a toxicidade hemolítica, no caso dos grupos amina superficiais se encontrarem na forma livre, tendo-se obtido uma percentagem de hemólise igual a 35,7% e 49,2% para dendrímeros de 4.0G e 5.0G, respetivamente. Por outro lado, quando os dendrímeros de PPI são revestidos perifericamente com galactose, existe uma redução significativa na percentagem de hemólise para valores de 10% e 7,1% nos dendrímeros 4.0G e 5.0G, respetivamente.⁴⁰

Pelo contrário, estudos efetuados em dendrímeros aniónicos mostram ausência de atividade hemolítica. Alguns autores sugerem que quanto maior for a geração do dendrímero catiónico, maior será a hemólise observada, atribuindo-se esta proporcionalidade direta ao facto destes dendrímeros apresentarem uma carga catiónica global mais elevada.^{22,23}

Foram também efetuados estudos, administrando dendrímeros catiónicos PPI 5.0G a ratos albinos do sexo masculino, de modo a avaliar diversos parâmetros hematológicos, entre os quais a contagem de glóbulos brancos e de glóbulos vermelhos

bem como a medição da hemoglobina, hematócrito e hemoglobina corpuscular média. Foi, assim, possível determinar que os dendrímeros catiónicos podem influenciar de forma significativa os parâmetros hematológicos, verificando-se um aumento na contagem de glóbulos brancos e uma diminuição na contagem de glóbulos vermelhos, na hemoglobina, no hematócrito e na hemoglobina corpuscular média. Por outro lado, quando os mesmos dendrímeros foram revestidos à superfície com grupos protetores, como os aminoácidos glicina ou fenilalanina, o valor dos parâmetros hematológicos não diferiu de modo estatisticamente significativo em relação ao controlo, indicando assim que a funcionalização melhora a biocompatibilidade dos dendrímeros PPI.⁴¹

10.1.2 Imunogenicidade

Tem sido avaliada a possibilidade dos dendrímeros provocarem uma resposta imune exagerada quando administrados em organismos vivos, no entanto o que se tem observado é que os dendrímeros não exibem nenhuma ou apenas exibem uma fraca imunogenicidade. Isto significa que estes nanossistemas não são reconhecidos pelo sistema imunitário do hospedeiro como partículas “estranhas”, sendo este um fator importante quando se pretende utilizá-los no transporte de fármacos.²²

10.1.3 Ruptura da membrana celular

Alguns investigadores têm demonstrado que a citotoxicidade está extremamente correlacionada com os grupos terminais presentes à superfície dos dendrímeros.³⁶ Os dendrímeros catiónicos interagem com as cargas negativas dos grupos fosfatos da bicamada lipídica através de interações eletrostáticas, levando à formação de pequenos poros e contribuindo assim para uma menor estabilidade e para um aumento da permeabilidade da membrana celular. Como consequência dessa interação, advém a perda de proteínas citosólicas, como a lactato desidrogenase (LDH). Na figura abaixo encontra-se um esquema relativo ao processo de destabilização da membrana biológica.²²

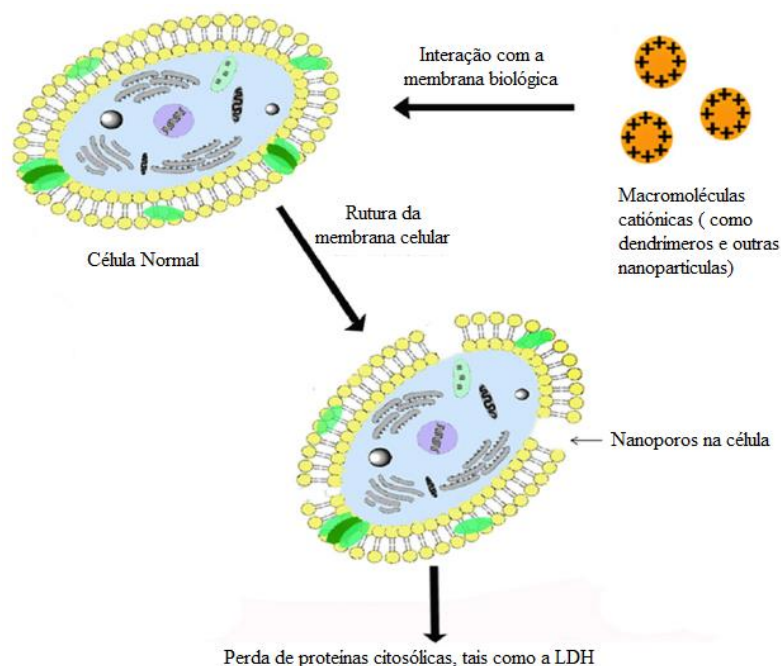


Figura 10.1 - Esquema relativo ao processo de rutura da membrana celular. Adaptado de [22].

Lee e Larson compararam a formação de nanoporos na bicamada lipídica, quando esta contacta com dendrímeros PAMAM e com polímeros lineares de PLL e verificaram que, ao contrário dos dendrímeros, os polímeros PLL, não levavam ao surgimento de poros na membrana. Isto deve-se à necessidade dos dendrímeros formarem interações eletrostáticas com as cabeças polares dos fosfolípidos da bicamada que estão em contacto com o meio intracelular, de modo a penetrarem no interior da célula. Além disso, concluíram que a rutura da membrana plasmática é mais acentuada quanto maior for a concentração e o peso molecular do dendrímero em estudo, pois estes são aspetos que contribuem para o surgimento de poros na membrana. Sendo assim, os resultados indicam que a forma esférica dos dendrímeros parece ser mais eficiente no transporte de fármacos em relação a polímeros lineares, devido ao aumento da permeabilidade da membrana, contudo, este aumento da permeabilidade, em contrapartida, também pode levar a efeitos nefastos se conduzir efetivamente à lise celular.⁴²

Em 2006, Hong *et al.* demonstraram que o número de gerações do dendrímero está intimamente relacionado com a capacidade destes nanossistemas formarem nanoporos. Recorrendo à técnica de microscopia de força atómica, foi possível estudarem as interações que ocorriam entre os dendrímeros e a bicamada lipídica. Estes investigadores verificaram que os dendrímeros PAMAM 7.0G induziam a formação de nanoporos de diâmetro entre 15 a 40 nm (Figura 10.2), enquanto os dendrímeros

PAMAM 5.0G apenas aumentavam o tamanho de defeitos pré-existentes na bicamada. Por outro lado, ainda apuraram que os dendrímeros, cuja neutralização das cargas positivas era alcançada através da utilização de grupos acetamida, não originavam a formação de novos poros na bicamada lipídica, nem o aumento de defeitos pré-existentes.⁴³

É importante salientar que o aumento da permeabilidade induzida pelos dendrímeros não é definitivo e que, após a remoção dos dendrímeros, as proteínas citoplasmáticas retornam aos valores normais.²²

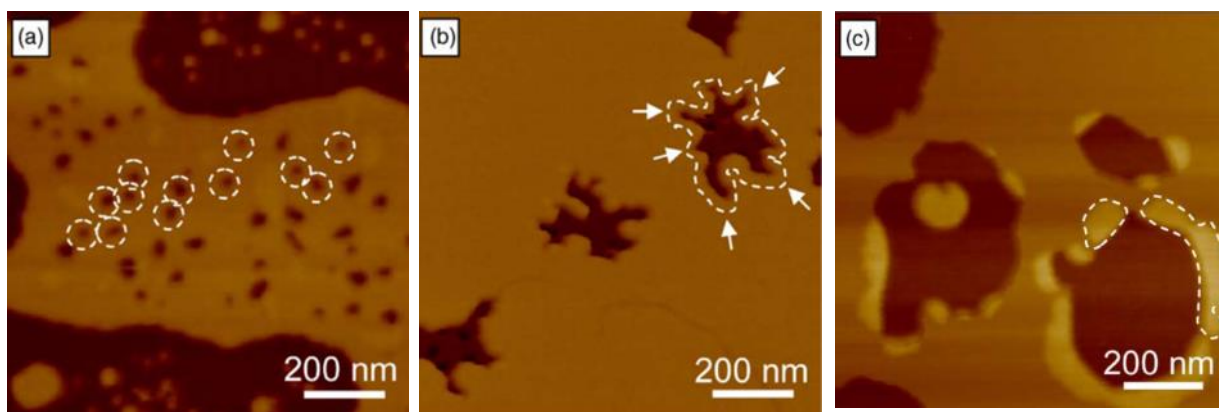


Figura 10.2 – Visualização por Microscopia de força atômica da bicamada lipídica, após a interação com os dendrímeros. As linhas brancas salientam algumas áreas onde a bicamada foi afetada. Não é possível observar os dendrímeros nestas imagens. a) Dendrímeros PAMAM 7.0G carregados positivamente levam à formação de nanoporos na bicamada previamente intacta. b) Dendrímeros PAMAM 5.0G carregados positivamente originam o aumento de defeitos pré-existentes na bicamada lipídica, representados pelas áreas escuras destacadas pelas setas brancas. c) Dendrímeros PAMAM neutralizados pelos grupos acetamida não originam a formação de nanoporos. Em vez disso, os dendrímeros aderem-se às bordas dos defeitos existentes na membrana. Adaptado de [43].

10.1.4 Liberação de citocinas e quimiocinas

Os dendrímeros podem modular a liberação de citocinas e quimiocinas, podendo este efeito ser uma ferramenta terapêutica útil ou levar a efeitos tóxicos significativos. Vannucci *et al.* administraram dendrímeros PAMAM acoplados com N-acetilglicosamina a ratinhos C57BL/6 com melanoma e avaliaram a capacidade destes glicodendrímeros modularem uma resposta imunológica por meio do reconhecimento dos hidratos de carbono, já que a N-acetilglicosamina apresenta uma elevada afinidade *in vitro* para o recetor dos linfócitos recombinantes NKR-P1A. Os resultados não indicaram uma regressão da massa tumoral, no entanto houve uma diminuição do crescimento do tumor e um aumento da sobrevivência. Para além disso, ainda observaram um aumento das células CD69⁺ no tecido tumoral e no baço e níveis de

citocinas aumentados, tais como a IL-1 β , o (INF)- γ , o (TNF)- α e a IL-2. Ainda, foram efetuados ensaios de citotoxicidade *ex vivo*, que revelaram um aumento da citotoxicidade proporcional à percentagem de células Natural-Killer ativadas. Assim sendo, os resultados obtidos pelos investigadores sugerem que os glicodendrímeros têm a capacidade de estimular uma resposta imunológica antitumoral, tanto a nível da imunidade inata como da imunidade adquirida, sendo esta competência conferida pelo revestimento de N-acetilglicosamina, que interage com os recetores presentes à superfície de algumas células do sistema imunológico.⁴⁴

10.2 Soluções para minimizar a toxicidade

Após o reconhecimento de que alguns dendrímeros poderiam induzir citotoxicidade e toxicidade hemolítica, os investigadores aperceberam-se da necessidade de desenvolver métodos que contornassem os efeitos adversos associados ao uso dos dendrímeros como transportadores seletivos de fármacos. Na figura 10.3, encontram-se esquematizadas as diversas estratégias que podem ser utilizadas para minimizar a toxicidade associada aos dendrímeros.²²

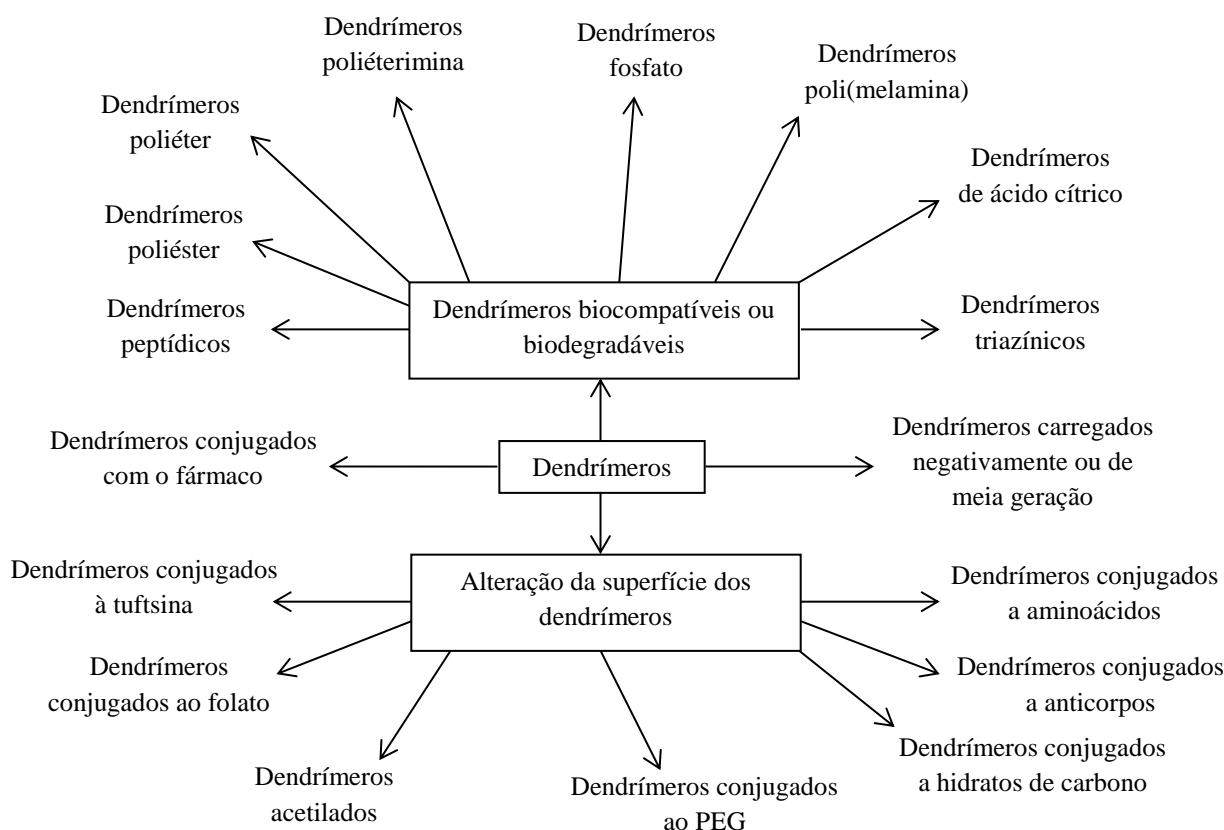


Figura 10.3 - Estratégias para minimizar a toxicidade associada aos dendrímeros. Adaptado de [22].

10.2.1 Utilização de dendrímeros biocompatíveis

A primeira abordagem para minimizar a toxicidade dos dendrímeros baseia-se no desenvolvimento de núcleos centrais ou ramificações que sejam biocompatíveis. A síntese destes dendrímeros assenta no pressuposto de que a utilização de monómeros análogos a produtos metabólicos de diversos processos biológicos, leva ao surgimento de nanopartículas biodegradáveis.²² Neste contexto, a utilização destes dendrímeros permite o desempenho das suas funções sem efeitos tóxicos nem imunológicos para as biomoléculas ou células normais, devendo para isso serem degradados em compostos não-tóxicos e, posteriormente, eliminados da circulação sistémica.³² Entre os diversos dendrímeros biocompatíveis, pode-se destacar os dendrímeros peptídicos, os dendrímeros poliéster, os dendrímeros triazínicos, os dendrímeros fosfato, os dendrímeros poliéter, dendrímeros de ácido cítrico, dendrímeros poli(melamina) e os dendrímeros poliéterimina.²²

10.2.1.1 Dendrímeros peptídicos

Os dendrímeros podem exibir na sua constituição diversos aminoácidos, tais como a lisina ou a arginina, que lhes conferem propriedades que parecem ser promissoras para a sua utilização como transportadores de fármacos.²²

Em 2007, Agrawal *et al.* sintetizaram dendrímeros de PLL 4.0G, utilizando o PEG 1000 como núcleo central e o aminoácido L-Lisina como unidade de ramificação. De seguida, os dendrímeros PLL foram conjugados periféricamente com galactose, de modo a revesti-los à superfície. Estes investigadores verificaram que a síntese de dendrímeros biocompatíveis, como é o caso dos PLL, reduz significativamente a hemólise dos glóbulos vermelhos comparativamente a outros dendrímeros. De acordo com o estudo, os valores de hemólise foram 2,53 vezes inferiores para dendrímeros PLL não revestidos com galactose e 5,3 vezes inferiores para dendrímeros PLL revestidos com galactose, quando comparados com os valores obtidos para dendrímeros PPI. Sendo assim, os investigadores concluíram que o revestimento dos dendrímeros peptídicos com galactose é uma abordagem vantajosa, permitindo utilizá-los como sistemas de libertação controlada seguros e eficazes.⁴⁵

10.2.1.2 Dendrímeros poliéster

Têm sido efetuados diversos estudos *in vitro*, a fim de avaliar a citotoxicidade associada aos dendrímeros poliéster, tais como os PEO. Gillies *et al.* incubaram dendrímeros PEO com células cancerígenas MDA-MB-231 durante um período de 48 horas e, posteriormente, avaliaram a viabilidade celular pela técnica do MTT. Com base nos resultados, determinaram que os dendrímeros não apresentavam toxicidade significativa a nenhuma das concentrações de polímero estudadas e que a viabilidade celular excedeu os 85% comparativamente aos respectivos controlos.⁴⁶

10.2.1.3 Dendrímeros triazínicos

Os dendrímeros triazínicos têm mostrado ser sistemas adequados para o transporte de fármacos e bons agentes de solubilização de moléculas hidrofóbicas. Relativamente à toxicidade, aparentam não conferir efeitos tóxicos nos animais modelos estudados. Zhang *et al.* averiguaram se os dendrímeros triazínicos possuíam toxicidade inerente, que os pudesse impossibilitar de serem utilizados no organismo humano. Por via intraperitoneal, administraram a ratinhos C3H do sexo masculino diferentes dosagens de dendrímeros, nomeadamente 1 mg/kg, 2,5 mg/kg e 10 mg/kg, usando quatro ratinhos por grupo. Após 48 horas da injeção, os ratinhos foram sacrificados e a autópsia efetuada aos animais não revelou quaisquer anomalias a nível dos órgãos. Além do mais, não verificaram um aumento dos indicadores de disfunção hepática, como a alanina aminotransferase e a transaminase glutamato-piruvato, nem dos indicadores de disfunção renal, como a ureia sérica.⁴⁷

10.2.1.4 Dendrímeros fosfato

Domanski *et al.* realizaram estudos a fim de averiguarem a hematotoxicidade e a citotoxicidade associada aos dendrímeros de tiofosfato 5.0G. A partir dos resultados obtidos, verificaram que, à temperatura fisiológica, nenhuma das concentrações de dendrímeros estudadas apresentaram valores de hemólise estatisticamente significativos. A libertação de hemoglobina considerada estatisticamente significativa apenas foi observada na amostra contendo uma concentração de 10 µM, a concentração em estudo mais elevada, e quando esta foi submetida a 42 e 46°C. Verificaram, ainda, que embora a interação entre os dendrímeros e as proteínas presentes à superfície das hemácias desencadeasse equinocitose, também levavam a um aumento da estabilidade da

membrana do eritrócito e da sua durabilidade térmica. Sendo assim, os investigadores concluíram que os dendrímeros de tiofosfato 5.0G não são nem hematotóxicos, nem citotóxicos dentro de uma gama de concentrações entre 100 pM e 10 µM e, portanto, devido à sua biocompatibilidade, são bons candidatos para serem utilizados como transportadores de fármacos.⁴⁸

10.2.1.5 Dendrímeros poliéter

Malik *et al.* sintetizaram dendrímeros poliéter por via convergente e avaliaram as suas propriedades hemolíticas. Os investigadores demonstraram que os dendrímeros contendo malonato ou carboxilato à sua superfície, não causavam hemólise dos eritrócitos uma hora após a sua administração. Pelo contrário, após vinte e quatro horas de incubação, estes dendrímeros já se mostraram líticos.³⁹

10.2.1.6 Dendrímeros poliéterimina

Krishna *et al.* avaliaram a citotoxicidade dos dendrímeros de poliéterimina através da técnica MTT, incubando-os em duas linhagens celulares distintas, mais especificamente em células do cancro da mama humanas T47D e em células renais de macaco-verde africano CV-1. Os resultados obtidos revelaram que mais de 98% das células mostraram viabilidade celular até uma concentração de dendrímeros igual a 100 mg/mL para ambas as linhagens celulares. Tendo em conta este ensaio *in vitro*, confirma-se que estes dendrímeros não são tóxicos, tendo um enorme potencial em diversas aplicações, tais como o transporte de fármacos.⁴⁹

10.2.1.7 Dendrímeros de ácido cítrico

Namazi e Adeli selecionaram dendrímeros de ácido cítrico e PEG, em virtude das suas propriedades singulares, entre as quais a sua adequada hidrossolubilidade, baixa toxicidade e biocompatibilidade. Após a síntese dos dendrímeros, diversas moléculas hospedeiras foram aprisionadas no interior destas nanoestruturas, tais como o ácido 5-amino-salicílico (5-ASA), a piridina, o ácido mefenâmico e o diclofenac. De seguida, os complexos dendrímero-fármaco foram mantidos à temperatura ambiente por um período de 10 meses e, após esse tempo findo, observaram que os complexos permaneceram estáveis e que não tinha ocorrido a libertação dos fármacos. Além disso, ainda estudaram o processo de libertação controlada dos fármacos a partir dos nanossistemas. Os dendrímeros foram submetidos a meios com pH distintos e

verificaram que a um pH de 7.4 a taxa de libertação dos fármacos era mais lenta comparativamente à mesma taxa em pH igual a 1 ou 10. Posteriormente, ainda apuraram a existência de uma relação de proporcionalidade direta entre a dimensão do dendrímero e a velocidade de libertação dos fármacos.⁵⁰

10.2.1.8 Dendrímeros poli(melamina)

Em 2004, Neerman *et al.* administraram dois fármacos anticancerígenos, o metotrexato (MTX) e o 6-mercaptopurina, em ratinhos C3H, na forma livre e encapsulados nos dendrímeros de melamina. Estes fármacos são conhecidos pela sua elevada hepatotoxicidade e, portanto, o estudo tinha como principal objetivo avaliar se a utilização dos dendrímeros de melamina poderia ser uma estratégia para minimizar a toxicidade. Quarenta e oito horas após a administração dos fármacos, os ratinhos foram sacrificados, a fim de recolher o seu soro para quantificar os níveis de alanina transaminase (ALT), um indicador de disfunção hepática. Com base no estudo, verificou-se que, quando os fármacos são encapsulados no interior dos dendrímeros, havia uma diminuição significativa nos níveis de ALT, obtendo-se uma redução dos valores da transaminase em cerca de 27%, no caso do MTX, e 36%, no caso da 6-mercaptopurina, comparativamente aos resultados obtidos para os animais administrados com o fármaco na forma livre. Sendo assim, os investigadores concluíram que as interações não covalentes entre o dendrímero e o fármaco são responsáveis por impedir que todo o fármaco se difunda rapidamente para fora do veículo, diminuindo assim a toxicidade sistémica.⁵¹

10.2.2 Alteração da superfície dos dendrímeros

Outra estratégia para diminuir a toxicidade dos dendrímeros baseia-se na alteração dos grupos de superfície, de modo a proteger os grupos catiónicos, como os grupos amina, com unidades neutras ou aniónicas, diminuindo assim a citotoxicidade inerente a estes, através do impedimento de interações eletrostáticas entre os dendrímeros e a membrana celular. Para além de diminuir a toxicidade, esta abordagem também permite melhorar a biodistribuição e a farmacocinética do transportador, aumentar a solubilidade, libertar o fármaco de forma mais controlada e conduzir a uma maior estabilidade.^{22,24} Abaixo serão apresentadas várias estratégias para modificar os grupos de superfície.

10.2.2.1 Conjugação dos dendrímeros com PEG

A conjugação dos dendrímeros com o PEG tem como principal finalidade a diminuição da toxicidade através da proteção dos grupos catiónicos dos dendrímeros (Figura 10.4). Além do mais, o PEG permite aumentar a hidrossolubilidade, prolongar o tempo do dendrímero em circulação e evitar a acumulação do mesmo em diferentes órgãos.^{12,27,36} Bhadra *et al.*, em 2003, realizaram um estudo, cujo principal objetivo era explorar a aplicação dos dendrímeros PAMAM conjugados com PEG como transportadores do fármaco 5-fluorouracilo (5-FU). Quanto aos estudos de toxicidade hemolítica, os investigadores verificaram que a conjugação com PEG levava a uma redução significativa na hemólise para valores abaixo dos 5%, devido à inibição da interação eletrostática entre os glóbulos vermelhos e o íon amónio quaternário carregado positivamente presente nos dendrímeros PAMAM não conjugados. Relativamente aos parâmetros hematológicos obtidos a partir de ratos albinos, observaram que a contagem de glóbulos vermelhos encontrava-se abaixo dos valores de referência, no caso dos dendrímeros PAMAM não conjugados, comparativamente aos dendrímeros conjugados. Além disso, também verificaram que apenas os ratos administrados com os dendrímeros não conjugados com PEG apresentavam um aumento estatisticamente significativo na contagem de glóbulos brancos. Portanto, os dendrímeros conjugados com PEG mostraram ser adequados para o transporte do fármaco e revelaram minimizar a toxicidade hemolítica e hematológica induzida pelo 5-FU.⁵²

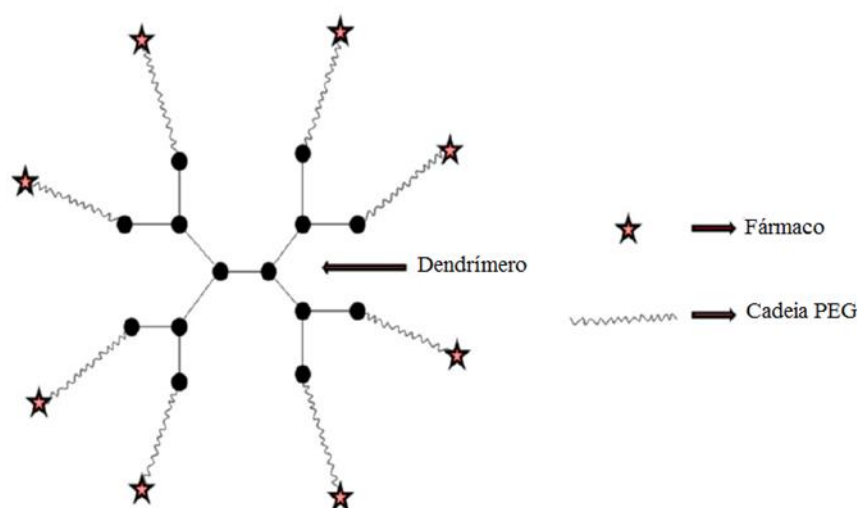


Figura 10.4 - Dendrímero conjugado ao PEG e ao fármaco. Adaptado de [22].

10.2.2.2 Conjugação dos dendrímeros com hidratos de carbono

Os dendrímeros que incorporam na sua arquitetura hidratos de carbono, tais como a galactose ou a maltose, são também designados por glicodendrímeros. Klajnert *et al.* realizaram um estudo utilizando dendrímeros PPI revestidos por unidades de maltose. Os investigadores efetuaram o teste de hemólise em dendrímeros PPI 2.0G e 4.0G e em dendrímeros similares conjugados com a maltose. Após um período de duas horas de incubação, verificaram que ambos os dendrímeros não conjugados induziam hemólise a uma concentração de 3 e 6 mg/mL, como se pode observar no Gráfico 10.1. Pelo contrário, os dendrímeros conjugados com maltose mostravam uma perda quase total da atividade hemolítica, o que indica que o acoplamento à maltose permite reduzir a toxicidade inerente aos dendrímeros.⁵³

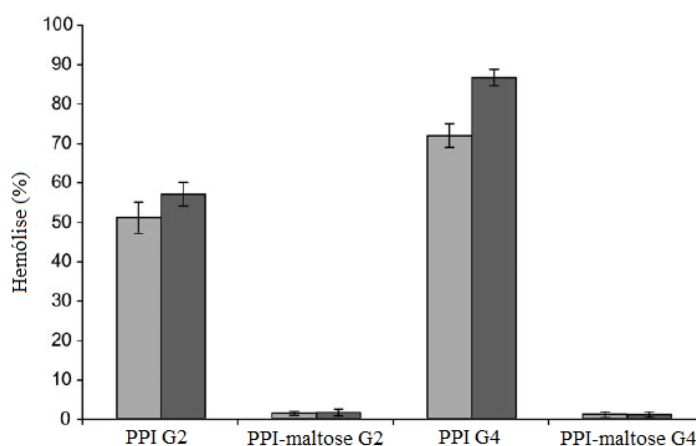


Gráfico 10.1 – Hemólise induzida pela incubação dos glóbulos vermelhos com os dendrímeros PPI 2.0G, PPI 2.0G acoplado à maltose, PPI 4.0G e PPI 4.0G acoplado à maltose a concentrações de 3 mg/mL (a cinzento claro) e 6 mg/mL (a cinzento escuro). Adaptado de [53].

10.2.2.3 Acetilação dos dendrímeros

Segundo Kolhatkar *et al.*, os dendrímeros PAMAM são candidatos promissores para o transporte dos fármacos até ao seu local de ação, contudo o seu elevado potencial para induzir citotoxicidade tem dificultado a sua aplicação *in vivo*. Tendo por base este conhecimento, os grupos amina superficiais dos dendrímeros PAMAM foram acoplados com grupos acetilo. Em seguida, foi avaliada a viabilidade celular *in vitro* utilizando diversas concentrações de dendrímeros. Os resultados obtidos mostraram que os dendrímeros PAMAM acetilados apresentavam uma viabilidade celular superior a 90%, enquanto, no caso dos dendrímeros não acetilados, à medida que a concentração

aumentava, observava-se uma redução cada vez mais acentuada da viabilidade das células. Os investigadores demonstraram ainda a existência de uma relação linear entre o número de grupos amina presentes à superfície dos dendrímeros e a citotoxicidade celular e que, por consequência, a viabilidade celular era dependente da geração do dendrímero PAMAM.⁵⁴

10.2.2.4 Dendrímeros de meia geração

Alguns dendrímeros, como os PAMAM, apresentam grupos superficiais carregados positivamente, contudo os dendrímeros de meia geração correspondentes apresentam, à sua superfície, grupos carboxílicos, tornando-os assim carregados negativamente.²² Jevprasesphant *et al.* modificaram a superfície de dendrímeros PAMAM, tornando-os dendrímeros de meia geração aniônicos, e avaliaram a sua citotoxicidade em células de adenocarcinoma humano Caco-2. Como se observa no gráfico 10.2, os dendrímeros de meia geração 2.5G e 3.5G não induziram citotoxicidade até uma concentração igual a 1mM. Pelo contrário, os dendrímeros PAMAM 2.0G apresentaram uma redução da viabilidade celular a concentrações acima de 700 μM e os dendrímeros 3.0G e 4.0G mostraram citotoxicidade a todas as concentrações analisadas. Portanto, os investigadores concluíram que, embora os dendrímeros PAMAM exibissem citotoxicidade, a modificação da sua superfície pode contribuir para uma redução significativa da toxicidade.⁵⁵

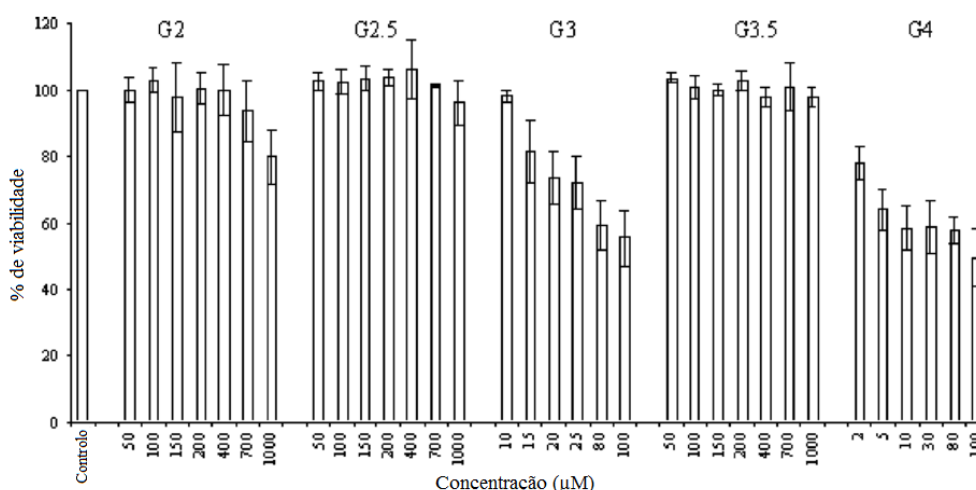


Gráfico 10.2 – Avaliação da viabilidade celular das células Caco-2, expondo-as a diferentes concentrações de dendrímeros PAMAM catiónicos (G2, G3 e G4), aniônicos (G2.5 e G3.5) e ao controlo. Adaptado de [55].

10.2.2.5 Conjugação dos dendrímeros com péptidos

Em 2007, Yang e Kao sintetizaram dendrímeros PAMAM 3.5G e 4.0G, os quais foram, posteriormente, conjugados com o péptido arginina-glicina-aspartato (RGD). A citotoxicidade destes dendrímeros foi avaliada *in vitro*, expondo os fibroblastos a diversas concentrações, 0.2, 2, ou 20 μM , de dendrímeros PAMAM 3.5G e 4.0G bem como a dendrímeros similares acoplados ao tripéptido. De acordo com os resultados, tanto os dendrímeros 3.5G modificados como os não modificados não induziram toxicidade nos fibroblastos a nenhuma das concentrações analisadas. Pelo contrário, os dendrímeros PAMAM 4.0G levavam a uma redução significativa da viabilidade celular, à medida que a concentração aumentava. Contudo, quando analisaram os dendrímeros 4.0G acoplados ao RGD, verificaram uma diminuição significativa da toxicidade inerente a estes, indicando assim que a conjugação de tripéptidos pode ser uma estratégia para minimizar a citotoxicidade dos dendrímeros PAMAM 4.0G catiónicos.⁵⁶

10.2.2.6 Dendrímeros conjugados ao fármaco

Asthana *et al.* avaliaram o potencial dos dendrímeros PAMAM 4.0G como transportadores de um fármaco anti-inflamatório ácido, o flurbiprofeno. Adicionalmente, foram efetuados estudos *in vitro*, de forma a estimar a toxicidade hemolítica intrínseca aos dendrímeros. O estudo revelou que a natureza policatiónica dos dendrímeros PAMAM não conjugados ao fármaco interagia com os eritrócitos, resultando na hemólise. Quando o estudo foi realizado nos dendrímeros conjugados ao fármaco anti-inflamatório, verificaram que havia uma redução significativa na toxicidade hemolítica.⁵⁷

10.2.2.7 Conjugação do dendrímero com um anticorpo

A ligação do dendrímero a um determinado anticorpo, para além de diminuir a toxicidade inerente aos fármacos anticancerígenos, também vai auxiliar na vetorização do fármaco para o tumor.²² A principal desvantagem da terapia anticancerígena é a elevada toxicidade intrínseca aos fármacos anticancerígenos, o que conduz a graves efeitos secundários. Quando se recorre aos anticorpos monoclonais, o fármaco é distribuído especificamente nas células tumorais, permitindo reduzir ou eliminar os efeitos colaterais. Em alguns tumores, ocorre uma elevada expressão do antigénio

tumoral HER2, permitindo que o anticorpo anti-HER2 direcione o fármaco para as células que expressam este antígeno tumoral. Em 2006, Shukla *et al.* conjugaram dendrímeros PAMAM 5.0G com um anticorpo monoclonal anti-HER2. Através de citometria de fluxo e microscopia confocal, os investigadores avaliaram a interação e a internalização do dendrímero conjugado ao anti-HER2 com as células que expressam HER2 e confirmaram que o dendrímero conjugado ao anticorpo foi predominantemente internalizado nas células que expressam o antígeno tumoral, à sua superfície. Ainda, foram efetuados estudos *in vivo* através do desenvolvimento de tumores em ratinhos SCID, que, por sua vez, foram injetados com uma solução de dendrímeros conjugados ao anticorpo monoclonal. Os ensaios revelaram que estes conjugados podem direcionar agentes de imagiologia e agentes anticancerígenos a tumores dependentes de HER2.⁵⁸

10.2.2.8 Conjugação do dendrímero à tuftsina

Dutta *et al.* exploraram, *in vitro*, o potencial dos dendrímeros PPI 5.0G conjugados à tuftsina para transportar um fármaco anti-retroviral, o efavirenz. A tuftsina é um tetrapéptido (Thr-Lys-Pro-Arg) ativador de macrófagos, monócitos e leucócitos polimorfonucleares, que faz parte do domínio Fc da imunoglobulina G, e é libertada fisiologicamente após clivagem enzimática. De forma a avaliar a citotoxicidade, os investigadores utilizaram células mononucleares humanas e sujeitaram-nas à técnica MTT. Poder-se-ia julgar que a toxicidade dos dendrímeros conjugados seria superior, devido ao facto da interação formar uma ligação amida entre os grupos amina do dendrímero PPI e os grupos carboxilo da tuftsina, expondo um maior número de grupos amina na superfície dos conjugados. Contudo, o estudo demonstrou uma redução significativa na citotoxicidade quando os dendrímeros PPI conjugados foram analisados, o que pode ser explicado pelo impedimento estérico conferido pelo tetrapéptido volumoso, permitindo mascarar a funcionalidade citotóxica à superfície. Além disso, ainda verificaram que a tuftsina estimulava a atividade fagocítica, auxiliando o fármaco no combate ao VIH. Portanto, os dendrímeros conjugados à tuftsina podem ser utilizados para melhorar a segurança e eficácia dos fármacos, permitindo reduzir a sua dose e os efeitos adversos associados a estes.⁵⁹

10.2.2.9 Conjugação dos dendrímeros ao ácido fólico

Singh *et al.* conjugaram dendrímeros PAMAM 4.0G ao ácido fólico ou ao ácido fólico-PEG. Os dendrímeros conjugados foram utilizados como transportadores do fármaco 5-FU e foi avaliada *in vitro* a toxicidade hemolítica dos dendrímeros PAMAM 4.0G, dos dendrímeros PAMAM 4.0G conjugados ao ácido fólico e dos dendrímeros PAMAM 4.0G conjugados ao ácido fólico-PEG, tendo-se obtido, respetivamente, os seguintes valores de hemólise: $18.67 \pm 0.92\%$, $15.47 \pm 0.71\%$ e $5.74 \pm 0.28\%$. Os dendrímeros conjugados ao ácido fólico-PEG mostraram uma redução significativa nos valores hemolíticos, devido ao aumento da biocompatibilidade conferido pelo PEG. O ligando ácido fólico auxilia na vetorização do fármaco ao local-alvo e, por isso, também contribuiu para a diminuição dos efeitos adversos associados ao 5-FU. Sendo assim, a combinação de ambas as abordagens parece ser promissora para minimizar a toxicidade e melhorar a eficácia da terapêutica.⁶⁰

10.2.3 Alteração do número de gerações

Por fim, é importante salientar que os dendrímeros com um número baixo de gerações têm os grupos superficiais mais acessíveis bem como o núcleo central, enquanto em gerações superiores, estes constituintes se tornam de mais difícil acesso do ponto de vista estérico. Esta abordagem pode ser útil para minimizar a toxicidade de um dendrímero em que o núcleo central seja potencialmente tóxico.²³

11. Libertação do fármaco no local-alvo

De modo a tornar o tratamento o mais efetivo possível, os fármacos devem ser capazes de alcançar os tecidos tumorais através da penetração das barreiras fisiológicas do organismo. Para além disso, o fármaco deve ser dirigido, permitindo aumentar a concentração dos fármacos citotóxicos nas células tumorais e minimizar a toxicidade nas células normais o que, por conseguinte, leva a uma taxa de sobrevivência superior e a uma melhor qualidade de vida para o doente. Deste modo, a efetividade de doses inferiores pode aumentar devido à maior percentagem de fármaco que alcança as células tumorais e, por outro lado, torna-se mais segura a administração de doses mais elevadas em virtude da distribuição ser específica. Abaixo encontram-se descritas mais detalhadamente duas estratégias distintas que permitem que os fármacos alcancem o tecido tumoral de forma mais direcionada, a vetorização passiva e a vetorização ativa

(Figura 11.1).^{19,21,34} A utilização em simultâneo de ambas as estratégias de vetorização permite tirar partido da máxima eficácia do tratamento.¹⁸

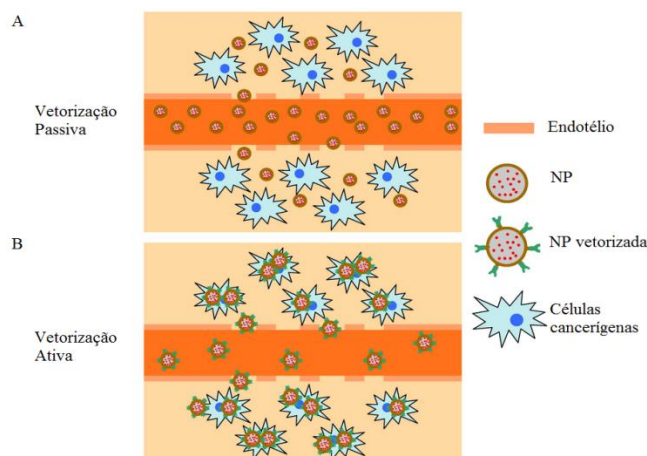


Figura 11.1- Libertação do fármaco controlada. A figura A corresponde à vetorização passiva, observando-se uma acumulação das nanopartículas no tecido tumoral devido ao efeito de retenção e permeabilidade aumentado. A figura B corresponde à vetorização ativa, verificando-se uma acumulação do fármaco através da utilização de nanopartículas, levando à formação de conjugados que interagem com as células cancerígenas. Adaptado de [20].

11.1 Vetorização passiva

A vetorização passiva diz respeito à acumulação dos nanossistemas na massa tumoral devido a fatores físico-químicos e farmacológicos.¹⁹ Os dendrímeros tiram proveito do seu tamanho nanométrico e das características específicas do tumor de modo a desenvolver mecanismos que conduzem a este tipo de vetorização. A vasculatura do tumor é muito diferente da observada nos tecidos normais. Os vasos sanguíneos presentes nos tecidos tumorais, formados a partir do processo de angiogénese, apresentam uma arquitetura deformada, contendo algumas fendas com uma dimensão entre 100 nm e 2 μ m, criada devido ao desequilíbrio resultante dos reguladores angiogénicos, como os fatores de crescimento e as metaloproteínas da matriz, e ao rápido fluxo sanguíneo necessário para aportar os nutrientes, de modo a fornecê-los às células de crescimento acelerado. Esta vasculatura danificada, juntamente com um sistema linfático anómalo, resultam numa escassa drenagem linfática no local e, por isso, numa retenção de fluídos no interior do tumor, o que faz com que haja um efeito de retenção e permeabilidade aumentado. Este efeito permite que os dendrímeros extravasem através das fendas formadas entre as células endoteliais e se acumulem no interior do tecido tumoral. Por outro lado, como a vasculatura dos tecidos normais permanece intacta, os dendrímeros não se acumulam nesses tecidos, aumentando assim a seletividade dos fármacos.^{6,24,34} Regra geral, observa-se uma relação inversamente

proporcional entre a dimensão do nanossistema e a sua capacidade de extravasamento, indicando que partículas com tamanho inferior a 200 nm acumulam-se no interior dos microvasos tumorais de forma mais eficaz.²⁰

Um estudo revelou que a vetorização passiva permite uma acumulação da cisplatina, um fármaco anticancerígeno associado a elevada nefrotoxicidade, na massa tumoral cinco vezes superior, quando esta se encontra encapsulada no interior de um dendrímero PAMAM em comparação à sua administração na forma livre.³⁸ Contudo, existem algumas características que tornam este tipo de vetorização inconveniente em determinados tumores. Geralmente, observa-se uma menor acumulação dos dendrímeros em tumores em fase inicial, cujo sistema vascular ainda não se encontra desenvolvido, ou em tumores já muito desenvolvidos que se encontrem numa fase necrótica.³⁴ Além disso, existem alguns tumores, como o cancro da próstata e do pâncreas, cuja vascularização é muito reduzida e, por isso, também não sofrem um efeito de retenção e permeabilidade aumentado significativo.¹²

Outro fator que contribui para a vetorização passiva é o microambiente único que rodeia as células tumorais, que é distinto do que circunda as células saudáveis. As células em rápida proliferação apresentam uma elevada taxa metabólica e necessitam de níveis mais elevados de oxigénio bem como uma maior quantidade de nutrientes, de modo a garantir a subsistência destas células. No entanto, normalmente estas necessidades não são suficientes e, por isso, as células cancerígenas recorrem à glicólise a fim de obter energia extra, resultando num meio ácido devido à libertação de ácido láctico e ácido carbónico. Tirando partido desta característica, existem dendrímeros, como os dendrímeros PAMAM que podem ser conjugados a grupos acetal hidrofóbicos, neutralizando a carga positiva dos grupos amina e tornando-os sensíveis ao pH. Estes nanossistemas são desenhados de forma a permanecerem estáveis ao pH fisiológico de 7.4, mas a degradarem-se na presença de meios mais ácidos a fim de libertar o fármaco, como acontece com os tecidos tumorais que apresentam valores de pH médios à volta de 6.8.^{19,61,62} Assim sendo, o dendrímero, quando entra em contacto com um meio ligeiramente ácido, sofre hidrólise dos grupos acetal, o que leva à desintegração da estrutura ramificada, resultando então na libertação do fármaco (Figura 11.2).²⁴

Dendrímeros

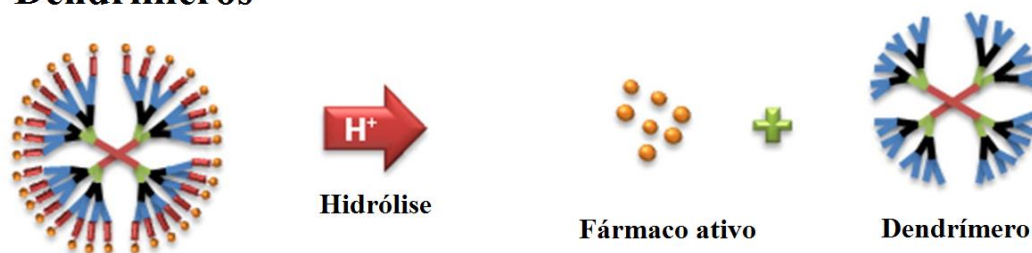


Figura 11.2 – Imagem representativa de um dendrímero sensível ao pH e do respetivo mecanismo de libertação do fármaco. Adaptado de [62].

11.2 Vetorização ativa

Como já foi referido anteriormente, as células tumorais expressam diversas moléculas na sua superfície com atividade antigénica, designadas por antigénios tumorais. Estes antigénios podem ser classificados em antigénios específicos do tumor, quando estão presentes apenas nas células neoplásicas e não nas células saudáveis, ou em antigénios associados ao tumor, no caso de serem comuns aos das células do tecido saudável de onde surgiu a neoplasia.^{4,10}

Um complexo dendrímero-fármaco, cuja biodistribuição apenas depende de um mecanismo de vetorização passiva irá decerto enfrentar limitações a nível da especificidade.²¹ Além disso, o efeito de retenção e permeabilidade aumentado pode, por um lado, auxiliar no extravasamento do fármaco para o interstício tumoral, contudo por outro lado, também induz o efluxo do mesmo a partir das células devido a um aumento da pressão osmótica no interior do interstício. A pressão osmótica tende a ser superior no centro da massa tumoral comparativamente à periferia, resultando numa redistribuição do fármaco para fora da região central do tumor.^{12,29} Na vetorização ativa, o fármaco é conjugado com um ligando, como um anticorpo, um péptido ou um aptâmero, o qual tem a capacidade de interagir com um recetor ou um antigénio próprio do tumor, de forma semelhante às interações naturais que ocorrem no organismo humano como as interações lectina-hidrato de carbono, ligando-recetor e antigénio-anticorpo, permitindo assim libertar o fármaco nos locais patológicos ou atravessar as barreiras fisiológicas com base em processos de reconhecimento molecular. Portanto, o complexo irá atuar como um profármaco, e o fármaco apenas se torna ativo quando entra em contacto com o tecido tumoral.¹⁸

A escolha do ligando adequado é um importante desafio no desenho dos complexos vetorizados. Existem ligandos ditos naturais, como o ácido fólico e fatores de crescimento, que apresentam algumas vantagens em comparação aos anticorpos

monoclonais, como um reduzido peso molecular e uma menor imunogenicidade. No entanto, alguns ligandos, como o ácido fólico obtido a partir da alimentação, podem competir com o dendrímero conjugado ao ligando pela ligação ao recetor, visto este ligando se encontrar naturalmente em elevada concentração no organismo humano, levando assim a uma diminuição da concentração intracelular do fármaco. Apesar das vantagens apresentadas pelos ligandos ditos naturais, os ligandos mais utilizados são os anticorpos monoclonais ou fragmentos de anticorpos. Embora os anticorpos monoclonais apresentem uma elevada afeição de ligação ao respetivo antígeno tumoral, o domínio Fc do anticorpo pode induzir uma resposta imunológica e ser rapidamente eliminado da corrente sanguínea, resultando numa diminuição da acumulação dos complexos no interior do tumor. Ao recorrer aos fragmentos de anticorpos, é possível reduzir a imunogenicidade e melhorar o perfil farmacocinético do complexo nanoparticulado.²⁹ Além do mais, para existir uma vetorização específica é importante que os antígenos tumorais ou os recetores apenas se encontrem na superfície das células tumorais e não na superfície das células saudáveis. Para além disso, também é essencial que sejam homogeneamente expressos em todas as células cancerígenas e que não sejam libertados para a circulação sanguínea.¹⁹⁻²¹

Quando o ligando interage com a célula-alvo, existe uma internalização, que geralmente ocorre via endocitose mediada por recetor. Por exemplo, quando um conjugado de folato se liga ao respetivo recetor na superfície celular, as invaginações da membrana plasmática rodeiam o complexo recetor-ligando, de modo a formar um endossoma, a fim de transportar o complexo até aos organelos. À medida que o valor do pH no interior do endossoma se torna cada vez mais ácido e os lisossomas são ativados, o fármaco é libertado do conjugado e entra no citoplasma, no caso deste possuir as propriedades físico-químicas apropriadas para atravessar a membrana endossomal. De seguida, o fármaco irá atuar no organelo-alvo, enquanto o recetor de folato é libertado e retorna para a membrana celular para iniciar um segundo ciclo de transporte através da interação com novos conjugados de folato.^{19,21} O facto do processo de internalização do complexo ocorrer, normalmente, via endocitose mediada por recetor permite escapar ao reconhecimento pela glicoproteína-P, evitando assim um dos principais mecanismos de resistência aos fármacos citotóxicos e conduzindo a elevadas concentrações intracelulares dos mesmos.²¹ No caso do ligando não suscitar o processo de internalização, o fármaco pode entrar no interior das células através de difusão simples ou de um sistema de transporte após ter sido libertado do complexo vetorizado

na superfície da célula ou na proximidade da mesma. Contudo, é importante salientar que a libertação do fármaco no exterior da célula pode levar à sua dispersão ou redistribuição para os tecidos saudáveis envolventes. Isto é corroborado por estudos *in vitro* e *in vivo* que demonstram que a concentração intracelular do fármaco é muito superior quando o fármaco é libertado do complexo no citoplasma através do processo de internalização.²⁹

A principal desvantagem dos conjugados obtidos é a possibilidade do profármaco, quando entra em contacto com o tumor, não se libertar eficazmente do complexo e dessa forma não surtir a ação terapêutica pretendida. Para além deste, existem outros inconvenientes, incluindo a diminuição da especificidade para a proteína-alvo, a penetração no tumor insuficiente e, como já referido anteriormente, a competição existente entre o dendrímero vetorizado e os ligandos que se encontram naturalmente em elevadas concentrações no interior do organismo, como é o caso do ácido fólico obtido a partir da alimentação, o que irá contribuir para uma diminuição da concentração intracelular do fármaco.^{5,6,24}

Devido ao facto de muitos tipos de tumores serem únicos, a seleção do recetor ou antigénio tumoral apropriado é essencial para o desenvolvimento de nanossistemas vetorizados, de forma a determinar qual o agente de vetorização mais efetivo para cada uma das linhagens celulares.^{29,34} De seguida, serão abordados os principais alvos de vetorização estudados até ao presente momento.

11.2.1 Vetorização às moléculas reguladoras da angiogénese

A angiogénese é um processo fundamental para a massa tumoral continuar em expansão e para a formação de metástases, e, por isso, os investigadores têm analisado a possibilidade de dirigir os fármacos a moléculas reguladoras, mediadoras e estimuladoras da angiogénese, de forma a inibir a proliferação, a migração e a diferenciação das células endoteliais, abrando assim a evolução do carcinoma. O equilíbrio que normalmente existe entre moléculas estimuladoras e inibidoras da angiogénese pensa-se que é comprometido durante a neovascularização iniciada pelas células tumorais, pois estas células têm capacidade de secretar moléculas estimuladoras, de modo a iniciar o processo de angiogénese. Entre algumas destas moléculas estimuladoras, encontram-se o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento de fibroblasto básico, o fator de crescimento derivado de plaquetas e certas metaloproteinases da matriz.^{5,6,33} Esta abordagem anti-angiogénica apresenta

algumas vantagens comparativamente a outras terapias convencionais, tais como a superação da barreira fisiológica que impede que os dendrímeros entrem em contacto com o tumor; a destruição da vasculatura, diminuindo assim a capacidade da massa tumoral se expandir e metastizar; a diminuição de fenómenos de resistência aos citotóxicos pois as células endoteliais apresentam uma menor variabilidade fenotípica; e a não existência de uma especificidade da vasculatura do tumor para um cancro em particular.^{5,6,12}

11.2.1.1 Recetor VEGF

O recetor do VEGF é considerado o indutor da angiogénese mais importante. O VEGF é expresso em concentrações elevadas nas células de alguns tumores sólidos, entre os quais o cancro do pulmão, do rim, da mama, do ovário e do trato gastrointestinal, levando a um aumento da quantidade do VEGF recetor-1 (VEGFR-1) e do VEGF recetor-2 (VEGFR-2) nas células endoteliais, sendo este último o recetor mais relevante. O VEGFR-2 está associado uma interação com o VEGF, dando início a uma cascata de sinalização que resulta na formação de vasos sanguíneos. Por consequência, tanto o VEGF como o VEGFR-2 têm sido estudados, a fim de desenvolver estratégias que direcionem os dendrímeros a estes alvos, de modo a evitar que os tumores gerem mecanismos próprios de aporte sanguíneo e impedir que os tumores evoluem ainda mais. Uma estratégia possível seria a conjugação do dendrímero com um análogo do VEGF ou com um anticorpo anti-VEGF. Atualmente, já existe no mercado um anticorpo anti-VEGF, designado por Bevacizumab (Avastin[®]), indicado para o tratamento do cancro do pulmão, colo-retal e mama. O mecanismo de ação do Bevacizumab baseia-se na ligação ao VEGF, de forma a inibir a interação entre o VEGF e os respetivos recetores, presentes à superfície das células endoteliais.^{5,6,63}

Backer *et al.* conjugaram dendrímeros PAMAM 5.0G boronados com VEGF recombinante humano, a fim de dirigi-los aos recetores VEGFR, que são expressos em elevada quantidade na vascularização tumoral. De forma a avaliar a absorção e biodistribuição dos dendrímeros *in vivo* através de imagiologia, estes foram marcados com o corante Cy5 e administrados em ratos 4T1 portadores de tumor. Os resultados indicaram uma acumulação seletiva dos dendrímeros vetorizados nas áreas de maior crescimento tumoral. Poder-se-ia julgar que a maior concentração dos dendrímeros nestas áreas devia-se a um mecanismo não específico de aumento da retenção e permeabilidade, contudo os ensaios de imagiologia (Figura 11.3) indicam o contrário

por duas razões: os mesmos dendrímeros não conjugados ao VEGF não se acumularam no tecido tumoral e, quando foi adicionada a toxina de fusão SLT-VEGF (toxina responsável pela eliminação seletiva de células que expressam o VEGFR em elevadas quantidades), verificaram uma elevada redução na acumulação dos dendrímeros conjugados ao VEGF no tumor. Portanto, a utilização do ligando VEGF pode auxiliar na eliminação das células endoteliais da neovascularização do tumor e, assim, induzir oclusão vascular e necrose isquêmica tumoral.⁶⁴

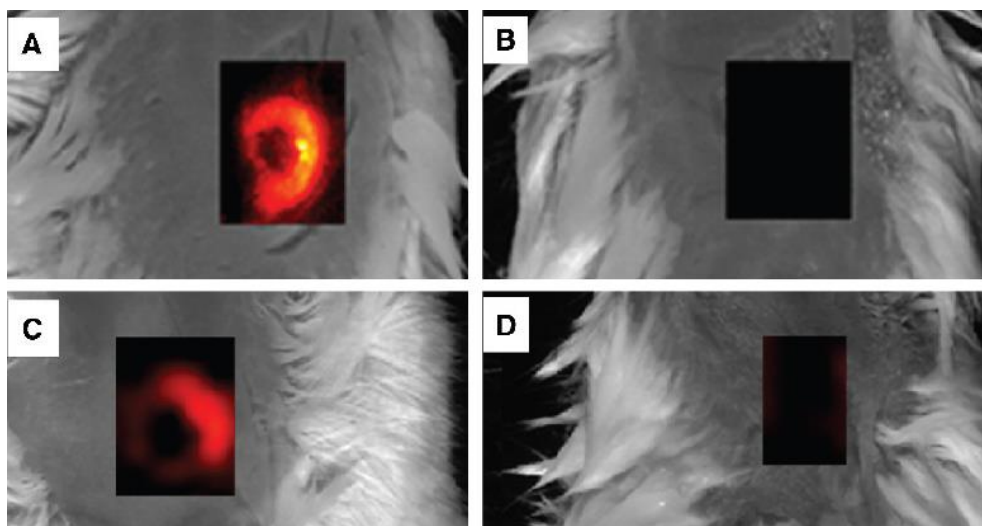


Figura 11.3 – Imagiologia fluorescente representando ratos 4T1 portadores de tumor, após a injeção de dendrímeros boronados conjugados ao VEGF (A e C), de dendrímeros boronados não conjugados (B) e de dendrímeros boronados conjugados ao VEGF em ratos pré-tratados com a toxina SLT-VEGF (D). Adaptado de [64].

11.2.1.2 Integrina $\alpha_v\beta_3$

A integrina $\alpha_v\beta_3$ é um recetor presente nas células endoteliais que interage com proteínas da matriz extracelular que contêm a sequência RGD, entre os quais o fator de Willenbrand, fibrinogénio, vitronectina e fibronectina. Este recetor está relacionado com algumas alterações celulares que ocorrem durante a angiogénese, nomeadamente o aumento na proliferação, o aumento da deslocação e a interação das células endoteliais com a matriz extracelular. Esta integrina é um dos marcadores mais específicos, encontrando-se apenas à superfície das células endoteliais durante o processo de angiogénese. Para além disso, a integrina $\alpha_v\beta_3$ está indiretamente relacionada com a sinalização VEGFR-2. Verificou-se que, quando esta integrina é bloqueada, há uma redução da sinalização VEGFR-2 e, portanto, ao conjugar-se o dendrímero com um análogo que mimique a sequência tripeptídica (Arginina-Glicina-Ácido Aspártico), é possível aumentar a eficiência dos tratamentos anti-angiogénicos.^{6,33}

Em 2007, Lesniak e os seus colaboradores conjugaram péptidos RGD cíclicos a dendrímeros PAMAM 5.0G, de modo a se ligarem seletivamente à integrina $\alpha_v\beta_3$. Além disso, utilizaram a biotina como marcador do dendrímero, já que esta pode ser seletivamente detetada por anticorpos anti-biotina. Os investigadores avaliaram *in vitro* a capacidade de ligação dos dendrímeros funcionalizados com RGD às células endoteliais microvasculares dérmicas humanas, células que expressam a integrina $\alpha_v\beta_3$ à sua superfície. Os resultados demonstraram a existência de uma interação específica superior no caso dos dendrímeros funcionalizados relativamente ao controlo (dendrímeros não funcionalizados com o RGD). Mesmo quando foi adicionado um excesso de RGD cíclico na forma livre 400 vezes superior, o ligando não foi capaz de deslocar mais do que 25% dos dendrímeros vetorizados ligados à integrina, o que significa que os dendrímeros vetorizados têm a capacidade de interagir de forma específica com a integrina $\alpha_v\beta_3$ e que aparentemente se ligam mais fortemente do que o péptido em si.⁶⁵

11.2.2 Vetorização ao recetor epidérmico humano (HER)

O recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e o recetor epidérmico humano do tipo 2 (HER2) são recetores de tirosina cinases, que intervêm na via de sinalização, resultando no crescimento e na multiplicação celular. O EGFR é expresso em cerca de um terço dos tumores sólidos e, normalmente, está associado a um pior prognóstico para o doente. Este recetor encontra-se na superfície das células de diversos cancros, entre os quais o cancro da mama, pulmão, colo-retal e cerebral. Neste caso, pode-se utilizar o anticorpo monoclonal Cetuximab em conjugação com o dendrímero para dirigir o fármaco anticancerígeno ao EGFR e libertá-lo. O Cetuximab foi indicado no cancro do colo-retal em estado avançado. O HER2 também está presente em diversos tumores malignos, tais como no cancro da mama, pulmão e ovários. Neste caso, pode-se utilizar uma abordagem semelhante à mencionada para o EGFR, já existindo um anticorpo monoclonal dirigido para este antigénio de interesse, com indicação no cancro da mama metastático, designado por Trastuzumab (Herceptina[®]).⁶

Shukla *et al.* conjugaram um anticorpo monoclonal anti-HER2 a dendrímeros PAMAM 5.0G e, de seguida, esses dendrímeros funcionalizados foram marcados com uma sonda fluorescente, o alexaFluor 488. De modo a avaliar a capacidade de ligação e internalização dos dendrímeros vetorizados ao antigénio tumoral HER2, os dendrímeros vetorizados foram administrados em ratinhos SCID do sexo feminino

xenotransplantados com células MCA 207, que expressam o HER2 à sua superfície. Noutros dois grupos de ratinhos, foi-lhes administrado dendrímeros não funcionalizados ou uma solução salina, o PBS. Quando os tumores alcançaram um diâmetro de 0,7 cm, estes foram isolados e analisados por citometria de fluxo. Os resultados indicaram que os dendrímeros conjugados ao anti-HER2 interagem preferencialmente com tumor em comparação aos dendrímeros não vetorizados e ao PBS. Posteriormente, recorrendo à microscopia confocal, foi possível observar nitidamente que os dendrímeros vetorizados foram internalizados nas células tumorais, ao contrário do que se observou no caso dos dendrímeros não vetorizados nem do PBS, cuja emissão de fluorescência não foi visível (Figura 11.4). Além disso, também não se observou emissão de fluorescência quando foi analisado um tumor, cujas células tumorais não expressavam o HER2 à sua superfície, o que significa que este antigénio tumoral é essencial para permitir a internalização dos dendrímeros.⁵⁸

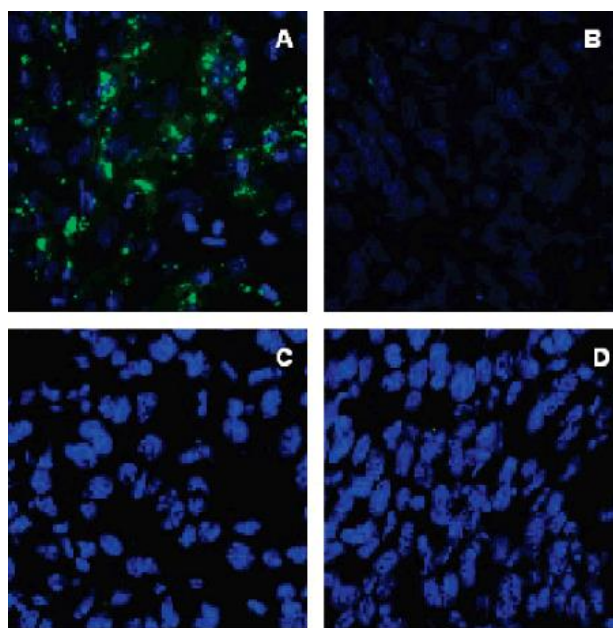


Figura 11.4 – Imagens representativas das secções dos tumores. Na figura A observa-se células tumorais, que sobreexpressam HER2 à superfície, enquanto na figura B estão representadas células tumorais, que não expressam HER2. Ambas estas figuras correspondem a tumores de ratinhos injetados com os dendrímeros funcionalizados com anti-HER2. Nas figuras C e D observa-se as células tumorais, que sobreexpressam HER2, cujos animais foram injetados com PBS (C) ou solução salina (D). Adaptado de [58].

11.2.3 Vetorização aos recetores da transferrina

A transferrina é uma glicoproteína sérica responsável pelo transporte de ferro, que pode ser utilizada como alvo terapêutico, devido à expressão aumentada dos recetores da transferrina nas células tumorais comparativamente às células saudáveis. A expressão elevada destes recetores, que pode ser até cem vezes superior

comparativamente às células saudáveis, resulta do aumento das necessidades de ferro na célula tumoral, já que o ferro é um elemento essencial para a célula se replicar. A glicoproteína após interagir com o seu recetor na superfície da célula, sofre endocitose para o interior de compartimentos acídicos, onde o ferro se dissocia. Sendo assim, é possível a realização de estudos em que o dendrímero se encontra conjugado à transferrina ou a um análogo.^{6,12}

Em 2010, Han *et al.* encapsularam o fármaco doxorrubicina (DOX) no interior de dendrímeros PAMAM e posteriormente funcionalizaram-nos recorrendo ao péptido HAIYPRH (T7), um ligando com potencial para dirigir o complexo nanoparticulado para o recetor da transferrina. Seguidamente, os dendrímeros funcionalizados (PAMAM-T7/DOX) foram administrados em ratinhos BALB/c xenotransplantados com células Bel-7402 indutoras de carcinoma hepatocelular, a fim de averiguar o efeito antitumoral *in vivo*. Os resultados demonstraram que os dendrímeros PAMAM-T7/DOX conduziam a uma redução superior da massa tumoral comparativamente ao fármaco na forma livre, aos respetivos dendrímeros não vetorizados (PAMAM/DOX) e à solução salina em cerca de 33,0%, 51,1% e 71,45%, respetivamente. Com base no estudo, os autores puderam concluir que existem evidências significativas que o T7 é um ligando promissor com potencial para dirigir os fármacos anticancerígenos aos recetores da transferrina sobreexpressos em diversos tumores.⁶⁶

11.2.4 Vetorização aos recetores do folato

Na atualidade, um dos alvos terapêuticos mais estudados para dirigir os conjugados fármaco-dendrímero ao tecido tumoral é o recetor do folato. O ácido fólico é uma vitamina indispensável para a síntese das purinas e pirimidinas, sendo portanto fundamental para a função da célula. O recetor do folato é expresso em maior quantidade nas células malignas em comparação às células ditas normais, especialmente nos tumores da mama, pulmão, cérebro, rim e ovário. Estas últimas apenas transportam o folato para o interior das células, contudo não transportam conjugados de folato. Por outro lado, as células tumorais internalizam estes conjugados através do reconhecimento ligando-recetor.^{6,24} Existem diversas vantagens na utilização do ácido fólico como agente de vetorização, entre os quais o baixo custo, o aumento da solubilidade, a redução da imunogenicidade e a facilidade do processo de conjugação ao dendrímero.³⁴

Em 2005, Kukowska-Latallo *et al.* conjugaram o ácido fólico a dendrímeros PAMAM acetilados. Em seguida, os conjugados foram injetados por via i.v. em

ratinhos imunodeficientes portadores do tumor humano KB. Tanto as células tumorais KB, como as células hepáticas expressam níveis elevados do recetor do ácido fólico, o que foi comprovado por um aumento da acumulação dos dendrímeros conjugados ao ácido fólico no fígado e no tumor, ao longo dos quatro dias após a injeção. Pelo contrário, a concentração dos dendrímeros não funcionalizados diminuiu rapidamente devido à eliminação dos dendrímeros circulantes na corrente sanguínea. De modo a estudar a internalização dos dendrímeros conjugados, estes foram acoplados ao corante 6-carboxi-tetrametilrodamina (6-TAMRA). Através de microscopia confocal, foi possível observar um número significativo de células fluorescentes no tecido tumoral com os dendrímeros conjugados ao ácido fólico em comparação aos dendrímeros não funcionalizados. Além do mais, os autores verificaram que, aos quatro dias, os conjugados encontravam-se presentes no tecido tumoral e eram internalizados por muitas das células tumorais (Figura 11.5). Por último, o estudo também mostrou que o acoplamento de MTX no interior dos dendrímeros vetorizados permitia aumentar a atividade antitumoral e diminuir drasticamente a toxicidade inerente ao fármaco comparativamente à administração do fármaco na forma livre.³⁷

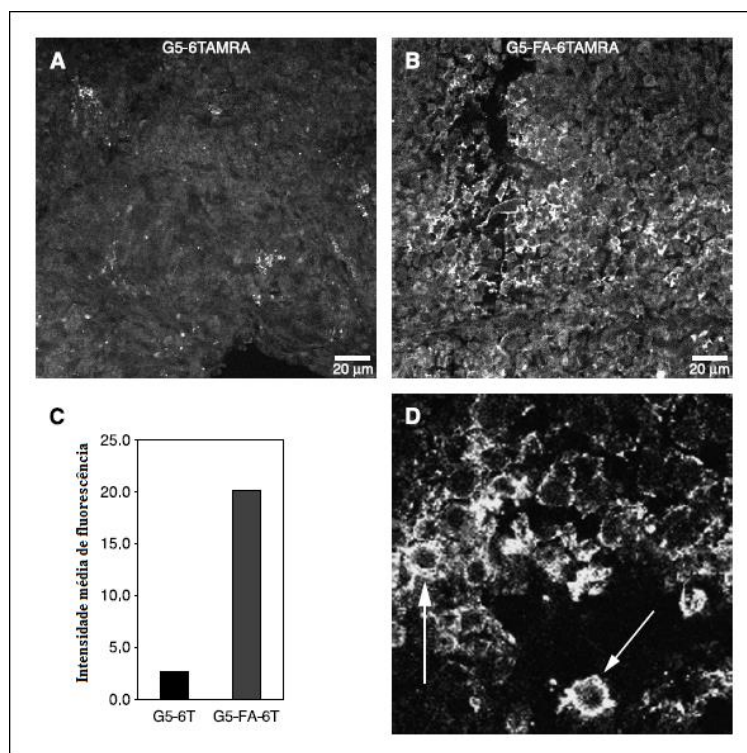


Figura 11.5 – Análise por microscopia confocal de amostras de ratinhos injetados com 10 nmol de dendrímeros não funcionalizados G5-6TAMRA (A) e de dendrímeros conjugados ao ácido fólico G5-FA-6TAMRA quinze horas (B) ou quatro dias (D), após a administração dos dendrímeros. A análise por citometria de fluxo (C) confirma a internalização celular dos dendrímeros conjugados (G5-FA-6T) em comparação aos dendrímeros não vetorizados (G5-6T). As setas salientam o citoplasma nitidamente visível ao redor do núcleo. Adaptado de [37].

11.2.5 Vetorização ao antígeno de membrana específico da próstata

O antígeno de membrana específico da próstata (PSMA) é uma glicoproteína transmembranar expressa em elevadas concentrações no tumor da próstata e, por isso, tem sido estudada a possibilidade de dirigir um determinado citotóxico utilizando o PSMA como alvo terapêutico. Esta glicoproteína interage com o ácido fólico e, portanto, pode ser útil a utilização de conjugados de folato.⁶

Num estudo recente, Huang *et al.* sintetizaram dendrímeros PAMAM 5.0G e conjugaram-nos a um fármaco anticancerígeno, o MTX, e ao ligando ureia-glutamato (GLA), um análogo do N-acetil-L-aspartil-L-Glutamato com afinidade para interagir com o PSMA. Posteriormente, recorrendo à sonda fluorescente FITC foi possível avaliar *in vitro* a internalização dos dendrímeros vetorizados (G5-FI₃-GLA₆) nas células LNCaP, que expressam o PSMA à sua superfície. Através da técnica de citometria de fluxo, os investigadores apuraram que os dendrímeros G5-FI₃-GLA₆ ligavam-se às células LNCaP, enquanto os dendrímeros não vetorizados não mostraram nenhuma interação significativa com estas células. Além disso, quando foi adicionado excesso do ligando GLA na forma livre, observou-se um bloqueio da ligação dos dendrímeros G5-FI₃-GLA₆ às células tumorais (Gráfico 11.1). Em concordância com a análise efetuada pela citometria de fluxo, a análise realizada por microscopia confocal também demonstrou a internalização dos dendrímeros vetorizados nas células tumorais LNCaP.⁶⁷

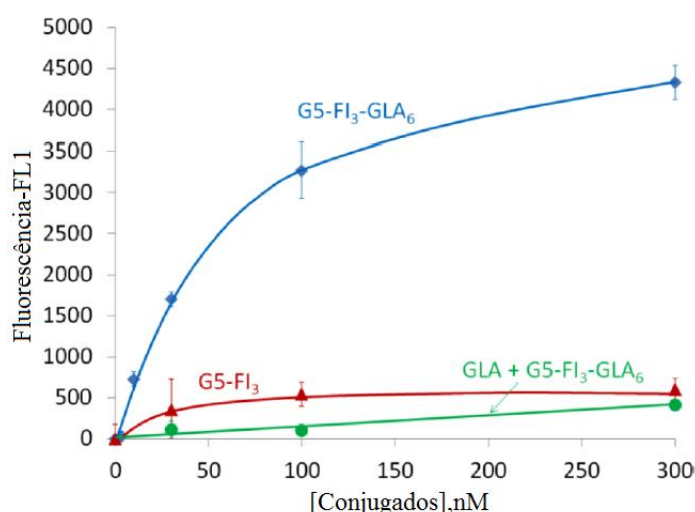


Gráfico 11.1 – Interação dose-dependente dos dendrímeros G5-FI₃-GLA₆ (a azul) e dos respectivos dendrímeros não funcionalizados G5-FI₃ (a vermelho) para o antígeno tumoral PSMA presente à superfície das células LNCaP. No gráfico também é possível observar a interação entre os dendrímeros G5-FI₃-GLA₆ e as células LNCaP na presença de CLA na forma livre, verificando-se uma diminuição da fluorescência devido à competição entre os dendrímeros funcionalizados e o ligando natural. Adaptado de [67].

11.2.6 Vetorização às lectinas

As lectinas são proteínas que reconhecem e interagem com hidratos de carbono constituintes de glicoproteínas presentes na face extracelular da membrana plasmática. No organismo humano, as lectinas podem também encontrar-se na forma livre.³⁴ Estas proteínas podem ser utilizadas na vetorização ativa da terapia antitumoral devido ao facto das células neoplásicas expressarem diferentes glicoproteínas comparativamente às células normais. O desenvolvimento de nanopartículas tendo por base as lectinas pode enquadrar-se na incorporação das mesmas nos sistemas de transporte a fim de dirigir o fármaco ao local-alvo (vetorização direta às lectinas).²¹ Por outro lado, algumas lectinas também são expressas à superfície das células e, por isso, também podem ser utilizadas como alvo de vetorização (vetorização reversa às lectinas). Por exemplo, as galectinas-1 e as galectinas-3 são sobreexpressas à superfície das células cancerígenas do colo-retal.⁶⁸ Na figura 11.6 é possível observar a vetorização às lectinas, bem como a vetorização aos hidratos de carbono.

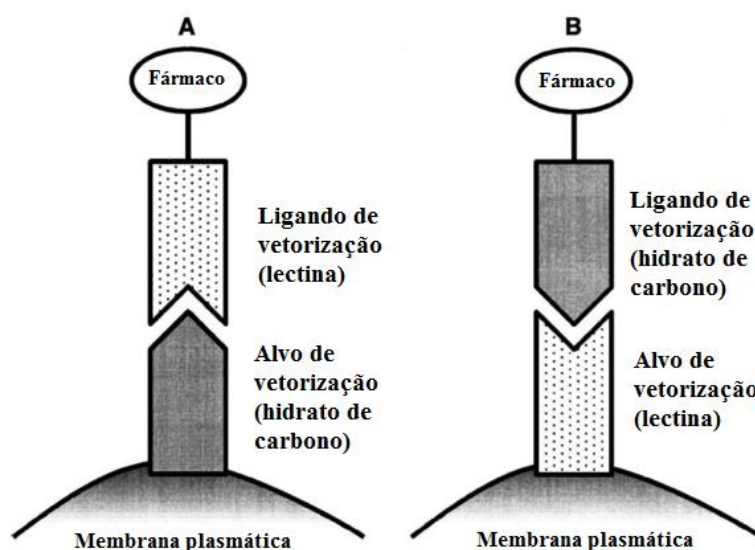


Figura 11.6 - Vetorização do fármaco ao local-alvo tirando partido da interação lectina-hidrato de carbono. Adaptado de [68].

Johansson e os seus colaboradores conjugaram um β – galactosídeo a dendrímeros baseados em glicopéptidos e, posteriormente, encapsularam a colchicina, um fármaco atualmente utilizado no tratamento da gota mas cujo potencial para ser utilizado na terapia anticancerígena encontra-se em investigação. De seguida, foi avaliada a capacidade destes dendrímeros interagirem com recetores específicos da galactose, como as galectinas. Para isso, foi realizado um ensaio *in vitro* recorrendo a

células Jurkat, células conhecidas por expressar galectinas à sua superfície. Através da técnica de separação de células ativadas por fluorescência (FACS), foi possível demonstrar que a presença do resíduo de galactose era essencial para a ligação dos dendrímeros às células Jurkat.⁶⁹

12. Dendrímeros como transportadores de fármacos quimioterápicos

Como já foi referido anteriormente, os objetivos dos dendrímeros como transportadores de fármacos quimioterápicos são, principalmente, contornar algumas limitações típicas da quimioterapia convencional e melhorar o perfil farmacocinético dos mesmos.³⁴ Abaixo serão apresentados alguns exemplos de fármacos citotóxicos, cuja aplicabilidade dos dendrímeros já foi demonstrada em diversos estudos.

12.1 Metotrexato

O MTX é um fármaco quimioterápico que atua através da inibição da enzima dihidrofolato reductase (DHFR), uma enzima fundamental para o processo mitótico. A incorporação deste fármaco em arquiteturas dendríticas já foi estudada tanto através do encapsulamento do fármaco, como através da conjugação do mesmo, e as conclusões que os investigadores têm chegado é que a conjugação do fármaco ao dendrímero parece ser o método preferencial para o controlo da sua libertação. A vantagem de conjugar o MTX a um dendrímero não se deve ao aumento da potência do fármaco, mas à possibilidade de administrar elevadas doses do mesmo sem que induza efeitos adversos graves.³⁴

Em 2011, Zhang e os seus colaboradores conjugaram o MTX a dendrímeros PAMAM 3.0G revestidos com um sacarídeo à superfície. De modo a avaliar *in vitro* a citotoxicidade induzida nas células KB, uma linhagem celular que sobrepresa recetores do ácido fólico à sua superfície, os investigadores recorreram à técnica XTT e utilizaram para o estudo 1) dendrímeros 3.0G (G3-OH), 2) MTX na forma livre e 3) dendrímeros 3.0G conjugados ao MTX (G3-MTX) a diferentes concentrações. Os resultados indicaram que o controlo G3-OH não mostrou citotoxicidade significativa. Por outro lado, o MTX na forma livre e o G3-MTX apresentaram uma citotoxicidade dependente da dose, verificando-se que, em doses mais baixas, o MTX induziu uma citotoxicidade superior comparativamente aos dendrímeros conjugados, contudo, em doses mais elevadas, ambos induziram uma citotoxicidade semelhante. Este resultado,

em doses mais baixas, pode ter sido obtido devido ao facto do MTX na forma livre ser internalizado nas células KB através do transportador de folato reduzido (RFC) enquanto os conjugados entram no interior das mesmas apenas através do recetor do folato, pois os complexos dendríticos são demasiado volumosos para utilizar o transportador. Sendo assim, a internalização mais seletiva dos conjugados sugere uma ausência de toxicidade não específica, mostrando a existência de um mecanismo diferente quando comparado com o MTX livre.⁷⁰

12.2 Doxorubicina

A DOX é um dos fármacos anticancerígenos mais potentes que atua através da inibição da síntese dos ácidos nucleicos no interior das células tumorais. Este fármaco apresenta alguns efeitos secundários indesejáveis, tais como a cardiotoxicidade e a mielossupressão, que leva a um índice terapêutico muito estreito. Os dendrímeros funcionalizados com a DOX têm demonstrado ser promissores para o tratamento anticancerígeno.^{5,34}

Em 2012, Kaminskas *et al.* sintetizaram dendrímeros PLL 5.0G e conjugaram-nos ao PEG1100 e ao fármaco doxorubicina numa proporção 50/50 (D-DOX), de forma a comparar a atividade e a toxicidade deste complexo nanoparticulado com a formulação de doxorubicina lipossomal conjugado com PEG (L-DOX). Para isso, foram utilizados ratos portadores do tumor Walker 256 e ratinhos xenotransplantados com o tumor MDA-MB231 humano. Nos primeiros animais modelo foi avaliada a atividade de diversas formulações de doxorubicina: 1) DOX na forma livre; 2) L-DOX e; 3) D-DOX e os resultados indicaram que todas as formulações de DOX apresentavam uma regressão do crescimento tumoral superior a 75% comparativamente ao PBS. Apesar de todas as formulações serem igualmente capazes de suprimir os tumores, foram observadas diferenças significativas na toxicidade sistémica induzida por cada uma das formulações de DOX. Os investigadores verificaram que a administração de DOX na forma livre e de L-DOX resultou numa desaceleração da taxa de crescimento dos ratinhos, o que não se observou nos ratinhos injetados com D-DOX ou PBS. Nos ratinhos xenotransplantados, foi possível determinar que a formulação D-DOX conduzia a uma reduzida incidência de cardiotoxicidade comparativamente às restantes formulações (Figura 12.1). Sendo assim, o estudo sugere que os dendrímeros conjugados à DOX podem oferecer vantagens sobre a formulação lipossomal e a solução de DOX na forma livre devido à reduzida toxicidade sistémica.⁷¹

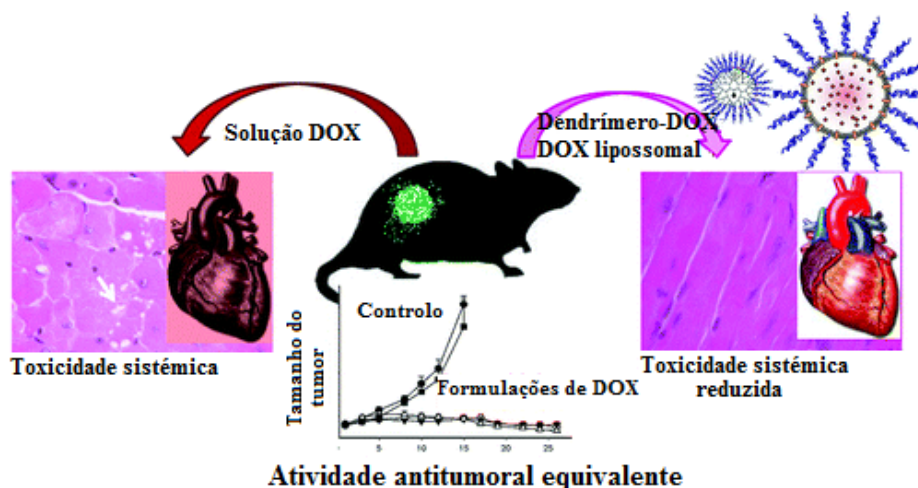


Figura 12.1 – Representação da atividade antitumoral das formulações de DOX comparativamente ao grupo controlo, bem como da cardiotoxicidade de ambas as formulações de DOX comparativamente ao fármaco na forma livre. Adaptado de [71].

12.3 Camptotecinas

As camptotecinas são uma família de fármacos quimioterápicos muito potente, que atua através da inibição da topoisomerase I e apresenta a particularidade de serem fármacos muito hidrofóbicos. Os principais exemplos deste grupo de fármacos são o irinotecano e o topotecano.^{5,9,34} Alguns investigadores determinaram que a encapsulação das camptotecinas no interior de dendrímeros baseados em poliéster conduzia a um aumento da atividade anticancerígena duas a sete vezes superior em diferentes linhagens celulares, sendo essa atividade aumentada atribuída a um incremento da internalização celular e à retenção dos fármacos nas células cancerígenas.³²

12.4 5-Fluorouracilo

O 5-fluorouracilo é um fármaco análogo do uracilo, um constituinte do ácido ribonucleico, que atua como antimetabolito, interferindo na síntese do ADN.⁷² Lee *et al.* sintetizaram dendrímeros 1.0G e 2.0G conjugados ao fármaco 5-FU, de modo a avaliar a atividade antitumoral *in vivo*. Para isso, ratinhos portadores do sarcoma 180 foram tratados com três dosagens diferentes da solução dos dendrímeros conjugados, nomeadamente 0,8; 80; e 800 mg/kg. Com base no estudo, verificou-se que os dendrímeros conjugados ao fármaco apresentaram uma atividade antitumoral superior comparativamente ao fármaco na forma livre, sendo este resultado explicado pelo efeito de retenção e permeabilidade aumentado. Além disso, foi possível determinar que os dendrímeros 2.0G conjugados apresentavam uma atividade antitumoral maior do que os dendrímeros 1.0G nas dosagens de 80 e 0,8 mg/kg. Os dendrímeros com um maior

número de gerações mostraram melhores resultados devido, principalmente, à menor taxa de hidrólise e à maior quantidade de fármaco libertado.⁷³

12.5 Paclitaxel

O paclitaxel é um fármaco estabilizador dos microtúbulos responsável por promover a polimerização da tubulina, impedindo assim a divisão descontrolada das células e induzindo a morte celular.⁵ Lim *et al.* avaliaram a potencialidade de dendrímeros triazínicos conjugados ao paclitaxel para inibir o crescimento tumoral de ratinhos SCID portadores de tumores da próstata. A dose administrada aos ratinhos variou desde 50 mg de paclitaxel/kg até 200 mg de paclitaxel/kg em regimes de dosagem simples, duplos ou triplos espaçados entre si uma semana. Os resultados obtidos mostraram evidências que todos os regimes terapêuticos conduziam a uma regressão tumoral durante as dez semanas de tratamento, destacando-se que todos os ratinhos injetados, três vezes, com 50 mg de paclitaxel/kg sobreviveram e exibiram uma supressão da massa tumoral mais acentuada. Além disso, todos os ratinhos apresentaram um comportamento normal durante todo o estudo. Quanto à toxicidade, foram analisados alguns parâmetros hematológicos, como a contagem dos glóbulos vermelhos e das plaquetas, cujos valores permaneceram dentro do intervalo de referência. Contudo, uma diminuição persistente dos glóbulos brancos nos ratinhos injetados com a solução de dendrímeros comparativamente ao grupo controle pode indicar alguma mielossupressão. Foi, ainda, observada uma ligeira toxicidade hepática e renal determinada através da medição da ALT, mas que retornou para os valores de referências na oitava semana.⁷⁴

12.6 Cisplatina

A cisplatina é um fármaco anticancerígeno, cujo mecanismo de ação se baseia na inibição da síntese do ADN através da formação de ligações cruzadas a todas as bases de ADN, com especial preferência pela posição N-7 da guanina e adenosina.⁷² Em 2011, Kirkpatrick *et al.* recorreram a dendrímeros PAMAM de meia geração incorporados com a cisplatina, de forma a avaliar a sua atividade *in vivo*. Para isso, ratinhos xenotransplantados com células tumorais A2780 do ovário humano foram injetados com diferentes regimes terapêuticos: 1) PBS; 2) cisplatina na forma livre; 3) dendrímeros 6.5G conjugados à cisplatina; ou 4) exclusivamente dendrímeros 6.5G. Tanto o fármaco na forma livre, como os dendrímeros conjugados ao fármaco

demonstraram uma eficácia semelhante e estatisticamente significativa na capacidade para suprimir o crescimento tumoral. Pelo contrário, o PBS e os dendrímeros 6.5G não conduziram a qualquer efeito inibitório da massa tumoral. Quando os investigadores administraram aos ratinhos uma dose superior do complexo dendrímero-cisplatina, observou-se uma toxicidade sistémica semelhante, contudo a capacidade para retardar a evolução tumoral foi significativamente superior, cerca de 45%, comparativamente à cisplatina na forma livre (Gráfico 12.1).⁷⁵

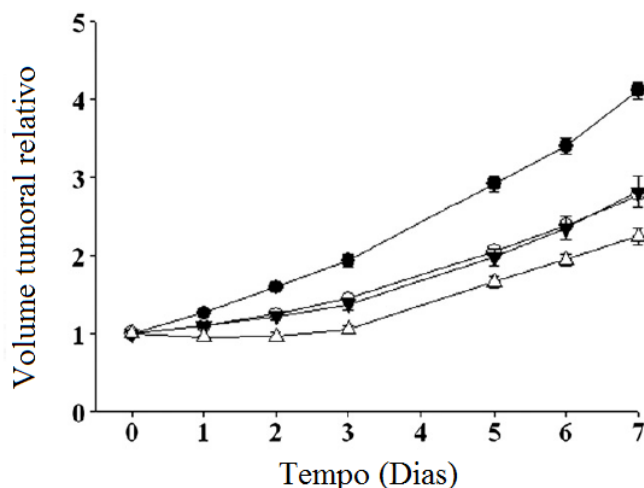


Gráfico 12.1 – Evolução do volume tumoral relativo ao longo dos dias após a administração intraperitoneal do PBS (●), da cisplatina na forma livre (○), dos dendrímeros 6.5G conjugados à cisplatina (▼, 6 mg/kg) e dos dendrímeros 6.5G conjugados à cisplatina (△, 8 mg/kg) em ratinhos xenotransplantados com células tumorais A2780 do ovário humano. Adaptado de [75].

13. Conclusão

Nos últimos quarenta anos, tem havido uma melhoria dos meios de diagnóstico e do tratamento anticancerígeno, o que tem contribuído, por um lado, para uma deteção mais precoce da doença, possibilitando assim o início do tratamento antes que esta avance para um estadio mais avançado, e, por outro lado, para um aumento da eficácia dos fármacos. No entanto, dado que a terapia anticancerígena está associada a fármacos com uma elevada toxicidade e que a letalidade associada às doenças oncológicas ainda é muito elevada, continua a ser essencial a investigação de fármacos mais eficazes e que induzem um menor número de efeitos adversos.

Os dendrímeros, devido às suas características estruturais e às suas dimensões similares às biomoléculas do organismo humano, têm sido estudados como transportadores de fármacos anticancerígenos. A introdução destes nanossistemas na terapia anticancerígena permite ajustar algumas propriedades dos fármacos, como a

hidrossolubilidade e o tempo de semivida, e dirigi-los diretamente ao local-alvo. Para além destas, existem outras vantagens, tais como a possibilidade de ultrapassar o mecanismo de resistência aos fármacos anticancerígenos induzido pela glicoproteína-P. Contudo, os complexos dendríticos também podem apresentar algumas limitações, entre as quais a toxicidade que lhes está inerente e a possibilidade do complexo não se dissociar e, por conseguinte, o fármaco não surtir o efeito desejado na massa tumoral. Quanto à toxicidade associada à utilização destes nanossistemas, tem-se verificado que os dendrímeros podem induzir alguns efeitos toxicológicos, como hemólise e rutura das membranas celulares. Contudo, existem já variadíssimas estratégias para contornar estes efeitos tóxicos, seja através da modificação da arquitetura do dendrímero de maneira a existir a libertação de monómeros análogos a produtos metabólicos ou da neutralização dos grupos reativos presentes à superfície dos complexos nanoparticulados.

Os estudos efetuados até agora revelaram que os dendrímeros permitem dirigir o fármaco ao local-alvo por dois mecanismos diferentes: vetorização passiva e ativa. A vetorização passiva baseia-se, essencialmente, na acumulação do fármaco devido a um efeito de retenção e permeabilidade aumentado e ao microambiente atípico que rodeia a massa tumoral. Por outro lado, a vetorização ativa baseia-se na conjugação do complexo dendrímero-fármaco a anticorpos monoclonais ou outro ligando, de forma a dirigir o complexo a um antigénio tumoral presente à superfície das células tumorais e, assim, aumentar a seletividade dos fármacos anticancerígenos e melhorar a qualidade de vida dos doentes.

Relativamente à vetorização ativa, é importante averiguar quais os recetores ou antigénios tumorais presentes à superfície de cada linhagem celular, de maneira a efetuar a seleção apropriada do agente de vetorização e, assim, garantir a seletividade do tratamento.

Os resultados obtidos em diversos estudos que envolvem a utilização de dendrímeros na terapia anticancerígena têm-se mostrado animadores, revelando um aumento da atividade antitumoral, nalguns casos, ou pelo menos uma diminuição da toxicidade comparativamente à utilização do fármaco na sua forma livre. Os muitos estudos já elaborados demonstram evidências de que os dendrímeros são nanossistemas promissores como transportadores de fármacos, que permitem melhorar a efetividade e a segurança da terapia anticancerígena. Contudo, é de salientar que os estudos efetuados, até ao momento, foram realizados em modelos experimentais *in vitro* ou em animais modelo e, por isso, ainda não é possível extrapolar estes resultados para os

organismos humanos. Assim sendo, a efetividade e segurança da utilização dos dendrímeros deve ser, cautelosamente, confirmada nos seres humanos, pois só assim é possível avaliar o verdadeiro potencial destes nanossistemas.

Por último, é importante referir, ainda, que apesar desta nova tecnologia se mostrar muito promissora, é necessário realizar mais estudos *in vivo*, de forma a compreender com alguma exatidão a biocompatibilidade e a toxicidade associada aos dendrímeros, a fim de dar início aos estudos em organismos humanos e avaliar o impacto toxicológico a médio-longo prazo nos mesmos.

14. Bibliografia

1. Liga Portuguesa Contra o cancro. em <<http://www.ligacontracancro.pt/noticias/detalhes.php?id=242>>
2. Pollock, R. E., Doroshow, J. H., O'Sullivan, B., Nakao, A. & Khayat, D. *Manual de Oncologia Clínica da União Internacional Contra o Cancro*. (Wiley, 2006).
3. WHO | Cancer. em <<http://www.who.int/cancer/en/index.html>>
4. Pinto, A. M. *Fisiopatologia - Fundamentos e Aplicações*. (Lidel, 2009).
5. Brannon-Peppas, L. & Blanchette, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 1649–59 (2004).
6. Gumbleton, M., Byrne, J. D., Betancourt, T. & Brannon-Peppas, L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1615–1626 (2008).
7. Vizirianakis, I. S., Fatouros, D. G. & Liu, S. Epigenetics advancing personalized nanomedicine in cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 1532–1543 (2012).
8. Parreira, D. B. Nanopartículas para aplicação oncológica. (2011).
9. Acker, D. B. *et al. Manual Merck de informação médica - Edição ampliada e actualizada*. (Oceano, 2008).
10. Mitchell, R. N., Kumar, V., Abbas, A. K. & Fausto, N. *Robbins & Cotran: Fundamentos de Patologia - Bases patológicas das doenças*. (Elsevier, 2006).
11. DeVita Jr., V. T., Lawrence, T. S. & Rosenberg, S. A. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. (Lippincott Williams & Wilkins, 2008).
12. 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* **148**, 135–46 (2010).

13. National Institute of Neurological Disorders and Stroke & National Institutes of Health. Brain and Spinal Cord Tumors. *NIH Publ.* **9**, 504 (2009).
14. Brown, J. M. & Giaccia, A. J. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res.* **58**, 1408–16 (1998).
15. Baker, J. R. Dendrimer-based nanoparticles for cancer therapy. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2009**, 708–19 (2009).
16. Macchetti, A. H. & Marana, H. R. C. Conceitos de cinética tumoral aplicados à quimioterapia para o câncer de mama. **40**, 213–222 (2007).
17. Kateb, B. *et al.* Nanoplatforms for constructing new approaches to cancer treatment, imaging, and drug delivery: what should be the policy? *Neuroimage* **54 Suppl 1**, S106–24 (2011).
18. Mousa, S. A. & Bharali, D. J. Nanotechnology-based detection and targeted therapy in cancer: nano-bio paradigms and applications. *Cancers (Basel)*. **3**, 2888–903 (2011).
19. Misra, R., Acharya, S. & Sahoo, S. K. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discov. Today* **15**, 842–850 (2010).
20. Alexis, F. *et al.* New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. *Urol. Oncol.* **26**, 74–85 (2008).
21. Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z. (Georgia) & Shin, D. M. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. em <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/14/5/1310/F1.small.gifamp>
22. Jain, K., Kesharwani, P., Gupta, U. & Jain, N. K. Dendrimer toxicity: Let's meet the challenge. *Int. J. Pharm.* **394**, 122–142 (2010).
23. Duncan, R. & Izzo, L. Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 2215–37 (2005).
24. Gillies, E. R. & Fréchet, J. M. J. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discov. Today* **10**, 35–43 (2005).
25. D'Emanuele, A. & Attwood, D. Dendrimer-drug interactions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 2147–62 (2005).
26. Sampathkumar, S.-G. & Yarema, K. J. Targeting cancer cells with dendrimers. *Chem. Biol.* **12**, 5–6 (2005).
27. Bharali, D. J., Khalil, M., Gurbuz, M., Simone, T. M. & Mousa, S. A. Nanoparticles and cancer therapy: a concise review with emphasis on dendrimers. *Int. J. Nanomedicine* **4**, 1–7 (2009).
28. Vergaro, V. *et al.* Drug-loaded polyelectrolyte microcapsules for sustained targeting of cancer cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 847–64 (2011).

29. Wang, X., Yang, L., Chen, Z. G. & Shin, D. M. Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging. *CA. Cancer J. Clin.* **58**, 97–110
30. Donald A. Tomalia | Chemical Heritage Foundation. em <<http://www.chemheritage.org/discover/online-resources/chemistry-in-history/themes/microelectronics-and-nanotechnology/tomalia.aspx>>
31. Liu, M. & Fréchet, J. M. J. Designing dendrimers for drug delivery. *Pharm. Sci. Technol. Today* **2**, 393–401 (1999).
32. Cheng, Y., Zhao, L., Li, Y. & Xu, T. Design of biocompatible dendrimers for cancer diagnosis and therapy: current status and future perspectives. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 2673–703 (2011).
33. Tekade, R. K., Kumar, P. V. & Jain, N. K. Dendrimers in oncology: an expanding horizon. *Chem. Rev.* **109**, 49–87 (2009).
34. Majoros, I. J., Williams, C. R. & Baker, J. R. Current dendrimer applications in cancer diagnosis and therapy. *Curr. Top. Med. Chem.* **8**, 1165–79 (2008).
35. Villanova, J. C. O., Oréfice, R. L. & Cunha, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **20**, 51–64 (2010).
36. Wolinsky, J. B. & Grinstaff, M. W. Therapeutic and diagnostic applications of dendrimers for cancer treatment. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1037–55 (2008).
37. Kukowska-Latallo, J. F. *et al.* Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. *Cancer Res.* **65**, 5317–24 (2005).
38. D, T., L, R. & S, S. Dendrimers as multi-purpose nanodevices for oncology drug delivery and diagnostic imaging. (2007). em <<http://www.biochemsoctrans.org/bst/035/0061/bst0350061.htm>>
39. Malik, N. *et al.* Dendrimers: Relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *J. Control. Release* **65**, 133–148 (2000).
40. Bhadra, D., Yadav, A. K., Bhadra, S. & Jain, N. K. Glycodendrimeric nanoparticulate carriers of primaquine phosphate for liver targeting. *Int. J. Pharm.* **295**, 221–33 (2005).
41. Agashe, H. B., Dutta, T., Garg, M. & Jain, N. K. Investigations on the toxicological profile of functionalized fifth-generation poly (propylene imine) dendrimer. *J. Pharm. Pharmacol.* **58**, 1491–8 (2006).
42. Lee, H. & Larson, R. G. Lipid bilayer curvature and pore formation induced by charged linear polymers and dendrimers: the effect of molecular shape. *J. Phys. Chem. B* **112**, 12279–85 (2008).
43. Hong, S. *et al.* Physical interactions of nanoparticles with biological membranes: The observation of nanoscale hole formation. *J. Chem. Heal. Saf.* **13**, 16–20 (2006).

44. Vannucci, L. *et al.* Effects of N-acetyl-glucosamine-coated glycodendrimers as biological modulators in the B16F10 melanoma model in vivo. *Int. J. Oncol.* **23**, 285–96 (2003).
45. Agrawal, P., Gupta, U. & Jain, N. K. Glycoconjugated peptide dendrimers-based nanoparticulate system for the delivery of chloroquine phosphate. *Biomaterials* **28**, 3349–59 (2007).
46. Gillies, E. R., Dy, E., Fréchet, J. M. J. & Szoka, F. C. Biological evaluation of polyester dendrimer: poly(ethylene oxide) “bow-tie” hybrids with tunable molecular weight and architecture. *Mol. Pharm.* **2**, 129–38 (2005).
47. Zhang, W. *et al.* Triazine Dendrimers for Drug Delivery: Evaluation of Solubilization Properties, Activity in Cell Culture, and In Vivo Toxicity of a Candidate Vehicle. *Supramol. Chem.* **15**, 607–616 (2003).
48. Domański, D. M., Bryszewska, M. & Salamończyk, G. Preliminary evaluation of the behavior of fifth-generation thiophosphate dendrimer in biological systems. *Biomacromolecules* **5**, 2007–12 (2004).
49. Krishna, T. R., Jain, S., Tatu, U. S. & Jayaraman, N. Synthesis and biological evaluation of 3-amino-propan-1-ol based poly(ether imine) dendrimers. *Tetrahedron* **61**, 4281–4288 (2005).
50. Namazi, H. & Adeli, M. Dendrimers of citric acid and poly (ethylene glycol) as the new drug-delivery agents. *Biomaterials* **26**, 1175–83 (2005).
51. Neerman, M. F., Chen, H.-T., Parrish, A. R. & Simanek, E. E. Reduction of Drug Toxicity Using Dendrimers Based on Melamine. *Mol. Pharm.* **1**, 390–393 (2004).
52. Bhadra, D., Bhadra, S., Jain, S. & Jain, N. K. A PEGylated dendritic nanoparticulate carrier of fluorouracil. *Int. J. Pharm.* **257**, 111–124 (2003).
53. Klajnert, B. *et al.* The influence of densely organized maltose shells on the biological properties of poly(propylene imine) dendrimers: new effects dependent on hydrogen bonding. *Chemistry* **14**, 7030–41 (2008).
54. Kolhatkar, R. B., Kitchens, K. M., Swaan, P. W. & Ghandehari, H. Surface acetylation of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers decreases cytotoxicity while maintaining membrane permeability. *Bioconjug. Chem.* **18**, 2054–60 (2007).
55. Jevprasesphant, R. The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. *Int. J. Pharm.* **252**, 263–266 (2003).
56. Yang, H. & Kao, W. J. Synthesis and characterization of nanoscale dendritic RGD clusters for potential applications in tissue engineering and drug delivery. *Int. J. Nanomedicine* **2**, 89–99 (2007).
57. Asthana, A., Chauhan, A. S., Diwan, P. V. & Jain, N. K. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendritic nanostructures for controlled site-specific delivery of acidic anti-inflammatory active ingredient. *AAPS PharmSciTech* **6**, E536–42 (2005).

58. Shukla, R. *et al.* HER2 specific tumor targeting with dendrimer conjugated anti-HER2 mAb. *Bioconjug. Chem.* **17**, 1109–15 (2006).
59. Dutta, T., Garg, M. & Jain, N. K. Targeting of efavirenz loaded tuftsin conjugated poly(propyleneimine) dendrimers to HIV infected macrophages in vitro. *Eur. J. Pharm. Sci.* **34**, 181–9 (2008).
60. Singh, P., Gupta, U., Asthana, A. & Jain, N. K. Folate and folate-PEG-PAMAM dendrimers: synthesis, characterization, and targeted anticancer drug delivery potential in tumor bearing mice. *Bioconjug. Chem.* **19**, 2239–52 (2008).
61. Majoros, I. J., Thomas, T. P., Mehta, C. B. & Baker, J. R. Poly(amidoamine) dendrimer-based multifunctional engineered nanodevice for cancer therapy. *J. Med. Chem.* **48**, 5892–9 (2005).
62. Manchun, S., Dass, C. R. & Sriamornsak, P. Targeted therapy for cancer using pH-responsive nanocarrier systems. *Life Sci.* **90**, 381–7 (2012).
63. European Medicines Agency - Find medicine - Avastin. em <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000582/human_med_000663.jsp&mid=WC0b01ac058001d124>
64. Backer, M. V *et al.* Vascular endothelial growth factor selectively targets boronated dendrimers to tumor vasculature. *Mol. Cancer Ther.* **4**, 1423–9 (2005).
65. Lesniak, W. G. *et al.* Synthesis and characterization of PAMAM dendrimer-based multifunctional nanodevices for targeting alphavbeta3 integrins. *Bioconjug. Chem.* **18**, 1148–54
66. Han, L., Huang, R., Liu, S., Huang, S. & Jiang, C. Peptide-conjugated PAMAM for targeted doxorubicin delivery to transferrin receptor overexpressed tumors. *Mol. Pharm.* **7**, 2156–65 (2010).
67. Huang, B., Otis, J., Joice, M., Kotlyar, A. & Thomas, T. P. PSMA-targeted stably linked “dendrimer-glutamate urea-methotrexate” as a prostate cancer therapeutic. *Biomacromolecules* **15**, 915–23 (2014).
68. Minko, T. Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 491–509 (2004).
69. Johansson, E. M. V, Dubois, J., Darbre, T. & Reymond, J.-L. Glycopeptide dendrimer colchicine conjugates targeting cancer cells. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 6589–97 (2010).
70. Zhang, Y. *et al.* Polyvalent saccharide-functionalized generation 3 poly(amidoamine) dendrimer-methotrexate conjugate as a potential anticancer agent. *Bioorg. Med. Chem.* **19**, 2557–64 (2011).
71. Kaminskas, L. M. *et al.* Doxorubicin-conjugated PEGylated dendrimers show similar tumoricidal activity but lower systemic toxicity when compared to PEGylated liposome and solution formulations in mouse and rat tumor models. *Mol. Pharm.* **9**, 422–32 (2012).

72. Infomed - Base de dados de medicamentos. em <<http://www.infarmed.pt/infomed/pesquisa.php>>
73. Lee, S.-M., Bala, Y. S., Lee, W.-K., Jo, N.-J. & Chung, I. Antitumor and antiangiogenic active dendrimer/5-fluorouracil conjugates. *J. Biomed. Mater. Res. A* **101**, 2306–12 (2013).
74. Lim, J. & Simanek, E. E. Triazine dendrimers as drug delivery systems: from synthesis to therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 826–35 (2012).
75. Kirkpatrick, G. J., Plumb, J. A., Sutcliffe, O. B., Flint, D. J. & Wheate, N. J. Evaluation of anionic half generation 3.5-6.5 poly(amidoamine) dendrimers as delivery vehicles for the active component of the anticancer drug cisplatin. *J. Inorg. Biochem.* **105**, 1115–22 (2011).

15. Anexos

Anexo I – Quadro enumerando os principais marcadores tumorais bem como as respetivas descrições. Adaptado de [9].

MARCADOR TUMORAL	DESCRIÇÃO
Antigénio carcinoembrionário (CEA)	Os níveis deste marcador aumentam na corrente sanguínea de indivíduos com cancro do cólon, da mama, do pâncreas, da bexiga, dos ovários e do colo do útero. Os valores também podem aumentar nos grandes fumadores e nos que sofrem de cirrose hepática ou colite ulcerosa.
Alfa-fetoproteína (AFP)	Geralmente, a alfa-fetoproteína encontra-se no sangue das pessoas com cancro hepático e é produzida por células do fígado no feto. Este marcador também se encontra em pessoas com cancro do ovário ou dos testículos e em crianças ou adultos jovens com tumores da glândula pineal.
Gonadotrofina coriónica humana fração beta (β -HCG)	Esta hormona é produzida durante a gravidez, mas também surge em mulheres com cancro originado na placenta e em homens com vários tipos de cancro testicular.
Antigénio específico da próstata (PSA)	Os níveis aumentam nos homens com hiperplasia benigna da próstata e, de forma considerável, nos homens com cancro da próstata. Os indivíduos com valores elevados de PSA devem ser examinados mais minuciosamente por um médico.
Antigénio 125 do cancro (CA-125)	Os níveis encontram-se elevados nas mulheres com doenças distintas dos ovários, incluindo o cancro.
Antigénio 15-3 do cancro (CA 15-3)	Os níveis encontram-se elevados em mulheres com cancro da mama. Este marcador não é recomendado para a deteção do cancro, mas é útil para supervisionar o tratamento.
Antigénio hidrogenocarbonato 19-9 (CA 19-9)	Os níveis encontram-se elevados em pessoas com cancro do aparelho digestivo, particularmente o cancro do pâncreas. Este marcador não é recomendado para a deteção do cancro, mas é útil para supervisionar o tratamento.
Beta ₂ (β_2)-microglobulina	Os níveis encontram-se elevados nas pessoas com mieloma múltiplo, leucemia linfocítica crónica e muitas formas de linfoma. Este marcador não é recomendado para a deteção do cancro, mas é útil para supervisionar o tratamento.
Lactato desidrogenase	Os níveis podem aumentar por diversas razões. Este marcador não é recomendado para a deteção do cancro, mas é útil para supervisionar o tratamento.

Anexo II – Quadro enumerando as diversas classes de antineoplásicos, bem como os respetivos exemplos de fármacos, mecanismos de ação e reações adversas. Adaptado de [9].

CLASSE	EXEMPLOS	MECANISMO DE AÇÃO	REAÇÕES ADVERSAS
Agentes alquilantes	Ciclofosfamida Clorambucilo Melfalano	Formam ligações químicas com o ADN, causando ruturas no ADN e erros na sua duplicação.	Suprimem a medula óssea, danificam a mucosa gástrica, causam queda de cabelo; podem diminuir a fertilidade.
Antimetabolitos	Metotrexato Citarabina Fludarabina 6-Mercaptopurina 5-Fluorouracilo	Bloqueiam a síntese de ADN.	Reações adversas semelhantes às dos agentes alquilantes.
Antimitóticos	Vincristina Paclitaxel Vinorelbina	Bloqueiam a divisão das células neoplásicas.	Reações adversas semelhantes às dos agentes alquilantes; também podem provocar lesões nervosas.
Inibidores da topoisomerase	Doxorrubicina Irinotecano	Evitam a síntese e a reparação de ADN pelo bloqueio de enzimas intituladas topoisomerases.	Reações adversas semelhantes às dos agentes alquilantes; a doxorrubicina pode causar lesão cardíaca.
Derivados da platina	Cisplatina Carboplatina	Formam ligações com o ADN, provocando ruturas.	Reações adversas semelhantes às dos agentes alquilantes; também podem causar lesões nos nervos, nos rins e perda de audição.
Terapias hormonais	Tamoxifeno	Bloqueiam a ação dos estrogénios (utilizado no cancro da mama).	Pode provocar cancro do endométrio, coágulos sanguíneos, dispneia.
	Flutamida	Bloqueiam a ação dos androgénios (utilizado no cancro da próstata).	Pode provocar disfunção erétil.
Inibidores de sinal	Imatinib	Bloqueia o sinal de divisão celular na leucemia mielóide crónica.	Pode levar a resultados anómalos nos exames da função hepática e retenção hídrica.

CLASSE <i>(continuação)</i>	EXEMPLOS	MECANISMO DE AÇÃO	REAÇÕES ADVERSAS
Anticorpos monoclonais	Rituximab	Induz morte celular por meio da ligação ao recetor de superfície celular em tumores derivados de linfócitos.	Pode provocar reações alérgicas.
	Trastuzumab	Bloqueia o recetor do fator de crescimento de células do cancro da mama.	Pode provocar reações alérgicas.
Modificadores da resposta biológica	Interferão alfa	Desconhecido	Pode provocar febre, arrepios, supressão da medula óssea.