

Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia



Estudo da contribuição dos *smart polymers*
na eficácia e segurança do tratamento
antineoplásico

Daniel Gonçalves Martins

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2010/2011

Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia



Estudo da contribuição dos *smart polymers* na eficácia e segurança do tratamento antineoplásico

Daniel Gonçalves Martins

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Dissertação orientada pela Professora Doutora Ana Margarida Grenha

2010/2011

[i]

*Aos meus pais e aos amigos presentes nos bons
e nos maus momentos*

Resumo

O cancro é uma das mais conhecidas e temidas doenças existentes e, como tal, existe um grande interesse no desenvolvimento de métodos de tratamento das afeções tumorais. Os grandes avanços da quimioterapia têm dado ótimos resultados no tratamento do cancro. Contudo, a administração de fármacos antineoplásicos não garante uma elevada eficácia pois os tecidos tumorais apresentam propriedades estruturais que dificultam o transporte de agentes terapêuticos, como a disposição heterogénea dos vasos sanguíneos, a ausência de sistema linfático funcional, as inúmeras barreiras de transporte que o fármaco enfrenta até chegar às células alvo ou a disparidade da expressão de antigénios e recetores nas próprias células.

Para além disso, os agentes quimioterapêuticos exibem elevada toxicidade não específica, afetando tanto as células tumorais como as células saudáveis, o que resulta frequentemente em severos efeitos secundários. Se a dose for reduzida para diminuir estes efeitos, a eficácia do tratamento diminuirá também; por outro lado, o aumento da dose, apesar de permitir um melhor controlo do crescimento do tumor, leva também a uma maior toxicidade nos tecidos saudáveis. Para contornar este efeito têm-se desenvolvido diferentes tipos de sistemas de libertação de fármacos com o objetivo de maximizar o direcionamento para os tumores e minimizar a toxicidade sistémica.

Entre estas alternativas figuram os chamados *smart polymers*, que são macromoléculas que sofrem rápidas e reversíveis mudanças na sua estrutura em resposta a estímulos, os quais correspondem geralmente a pequenas alterações no meio, como pH, temperatura, incidência de radiação ou presença de determinadas substâncias químicas. Assim, associando um fármaco a um destes polímeros, em geral recorrendo a técnicas de encapsulação, é possível fazer com que a libertação do fármaco ocorra apenas nas células tumorais, seja por estas apresentarem as características necessárias para alterar a estrutura dos polímeros (acidez ou temperatura diferente das células saudáveis, por exemplo) ou por se conferir externamente à zona do tumor essas mesmas características (por exemplo, incidindo radiação na zona afetada).

Os *smart polymers* têm outras vantagens. Os fármacos conjugados com estes polímeros têm tendência para se acumularem nos tecidos tumorais devido aos altos efeitos de permeabilidade e retenção nestas células e também demonstram menor toxicidade sistémica comparativamente com o fármaco livre. Além disso, os sistemas de libertação poliméricos podem permitir o aumento do tempo de semivida plasmático e da solubilidade dos fármacos de baixo peso molecular, assim como a sua libertação controlada.

Com este trabalho pretende-se estudar mais profundamente de que forma é que a utilização dos *smart polymers* pode aumentar a eficácia e diminuir a toxicidade sistémica das terapias anticancerígenas no tratamento de afeções tumorais.

Palavras-chave: Cancro, imagiologia, quimioterapia, radiação, sensibilidade ao pH, *smart polymers*, terapia génica, termossensibilidade, ultrassons.

Abstract

Cancer is one of the most known and feared diseases, and so there is a great interest in the development of new methods of treating tumors. The remarkable advances in chemotherapy have given good results in cancer treatment. However, the administration of antineoplastic agents does not guarantee an high efficiency, since the tumoral tissues have structural properties that hinder the transport of therapeutic agents, such as the heterogeneous distribution of the blood vessels, the absence of a functional lymphatic system, the numerous barriers that the drug faces to reach the target cells or the heterogeneity of antigen and receptor expression in the cancer cells.

In addition, the chemotherapeutic agents exhibit high non-specific toxicity, affecting both tumor cells and healthy cells, which often results in severe side effects. If the dose is decreased to reduce these effects, the effectiveness of treatment will also decrease; on the other hand, increasing the dose, despite allowing a better control of the tumor growth, also leads to greater toxicity in healthy tissues. To circumvent this effect, different types of drug delivery systems that maximize the targeting of tumors while minimizing systemic toxicity have been developed.

These alternatives include the so-called smart polymers, which are macromolecules that undergo rapid and reversible changes in its structure in response to stimuli, which generally correspond to small changes in the environment, such as pH, temperature, radiation incidence or the presence of some chemicals. Thus, the association of a drug with one of these polymers, generally using encapsulation techniques, can cause the drug release to only occur in the tumoral cells, either because they have the characteristics necessary to change the structure of the polymers (acidity or a different temperature from healthy cells, for example) or because these characteristics were conferred to the tumor (focusing radiation in the affected area, for example).

The smart polymers have other advantages. The drugs combined with these polymers tend to accumulate in tumor tissues due to high permeability and retention effect in these cells and also show less systemic toxicity

compared with free drug. In addition, the polymeric delivery systems improve the plasma half-life and the solubility of drugs with low molecular weight, as well as their controlled release.

The main objective of this work was to study more deeply how the use of smart polymers can increase efficiency and decrease the systemic toxicity of anticancer therapies in the treatment of tumor diseases.

Keywords: Cancer, chemotherapy, gene therapy, imaging, pH-responsiveness, radiation, smart polymers, thermosensitivity, ultrasounds.

Índice

| | |
|--|----|
| 1. Introdução..... | 1 |
| 1.1 O cancro..... | 1 |
| 1.2 A evolução da quimioterapia..... | 2 |
| 1.3 Obstáculos das terapias antineoplásicas..... | 5 |
| 1.4 Novas abordagens quimioterapêuticas: os <i>smart polymers</i> | 7 |
| 2. <i>Smart polymers</i> : conceitos gerais..... | 9 |
| 2.1 Vantagens dos <i>smart polymers</i> na terapia antineoplásica..... | 10 |
| 2.2 Classificação dos <i>smart polymers</i> segundo o tipo de mecanismo de regulação..... | 12 |
| 3. Utilização de <i>smart polymers</i> em técnicas de imagiologia do cancro..... | 14 |
| 4. Sistemas de libertação com regulação externa: <i>smart polymers</i> termossensíveis..... | 18 |
| 4.1 Ensaio sobre a capacidade de direcionamento dos <i>smart polymers</i> termossensíveis..... | 20 |
| 4.2 Sistemas de libertação termossensíveis com aplicadores de hipertermia fototermal..... | 23 |
| 4.3 Sistemas de libertação termossensíveis controlados por <i>High-intensity Focused Ultrasounds</i> | 29 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 5. | Sistemas de libertação auto-regulados: <i>smart polymers</i> sensíveis ao pH... | 34 |
| 5.1 | Estratégias de atribuição de sensibilidade ao pH a sistemas de libertação de fármaco..... | 35 |
| 5.2 | Sistemas de libertação de fármaco com sensibilidade ao pH de duplo direcionamento..... | 37 |
| 6. | Terapia génica: utilização de <i>smart polymers</i> no fabrico de vetores..... | 42 |
| 6.1 | Vetores genéticos virais e sintéticos: vantagens e desvantagens..... | 43 |
| 6.2 | A polietilenoimina no fabrico de vetores genéticos..... | 48 |
| 7. | Conclusão..... | 53 |
| 8. | Bibliografia..... | 54 |

Índice de Imagens

| | |
|---|----|
| 1- Fotografia do corte de um fígado com múltiplos nódulos provenientes de um cancro pancreático..... | 9 |
| 2- Esquema de diferentes tipos de resposta dos <i>smart polymers</i> aos estímulos do meio..... | 9 |
| 3- Imagem por fluorescência NIR de ratos com fibrosarcoma e com a atividade da MMP-2 medida em ratos tratados e não-tratados com inibidores da MMP-2..... | 16 |
| 4- Fotografia de uma câmara dorsal implantada num rato nu..... | 21 |
| 5- Gráfico da intensidade de fluorescência medida em cada grupo de ratos em função do polímero utilizado (ELP ou poli(NIPAAm))..... | 22 |
| 6- Esquema de formação do sistema de libertação PLGA-DOX com camada de ouro..... | 24 |
| 7- Gráfico do aumento da temperatura de uma solução do sistema PLGA-DOX e de outra contendo somente água, em função do tempo de irradiação..... | 25 |
| 8- Gráfico da quantidade de DOX libertada pelo sistema PLGA-DOX com e sem radiação, em função do tempo..... | 26 |

| | |
|---|----|
| 9- Gráfico da intensidade de fluorescência medida nas células A431 e MCF7 após a administração de sistemas PLGA-DOX-cetuximab e PLGA-DOX-IgG..... | 27 |
| 10- Esquema demonstrativo do processo de liberação de fármaco nos sistemas ouro-poli(NIPAAm) quando expostos à radiação NIR..... | 28 |
| 11- Gráfico da viabilidade celular de amostras de células de tumor mamário tratadas com sistemas com e sem ouro, com e sem DOX e irradiadas com laser NIR durante 2 e 5 minutos..... | 29 |
| 12- Gráfico da concentração de R6G libertada pelos sistemas aquecidos convencionalmente e irradiados com HIFUs, em função do tempo..... | 31 |
| 13A- Imagem de microscopia de fluorescência de uma mistura de gelatina e sistemas carregados com R6G antes da irradiação com HIFUs..... | 33 |
| 13B- Imagem de microscopia de fluorescência de uma mistura de gelatina e sistemas carregados com R6G após irradiação com HIFUs de 10 W durante 2 minutos..... | 33 |
| 13C- Imagem de microscopia de fluorescência de uma mistura de gelatina e sistemas carregados com R6G após irradiação com HIFUs de 10 W durante 20 minutos..... | 33 |
| 13D- Gráfico da média de intensidade de fluorescência da R6G libertada por sistemas irradiados com ultrassons de várias potências, em função do tempo..... | 33 |

| | |
|---|----|
| 14- Esquema de representação da ligação às células alvo dos sistemas poliméricos de libertação sensíveis ao pH de duplo direcionamento..... | 38 |
| 15- Diagrama esquemático representando o conceito central do posicionamento da biotina no sistema, em função do pH do meio..... | 40 |
| 16- Gráfico da percentagem de captação celular das micelas poliméricas-TAT a diferentes pHs, em função do tempo..... | 41 |
| 17- Esquema do processo de formação de poliplexos..... | 44 |
| 18- Mecanismo de ação do iRNA na supressão da expressão genética..... | 45 |
| 19- Esquema da entrada e processamento celular dos poliplexos..... | 46 |
| 20- Estrutura da PEI ramificada e linear..... | 48 |
| 21- Gráfico da viabilidade celular das células SGC7901 tratadas com os poliplexos PEG-PEI e PEI, em função da concentração de poliplexo..... | 50 |
| 22- Gráfico da eficácia de transfeção de diferentes vetores genéticos: poliplexos PEG-PEI/iRNA com diferentes rácios N/P, Lipofectamina 2000 (“lipo”) e PEI..... | 51 |
| 23- Resultado de um <i>Real-Time</i> PCR após transfeção com iRNA-CD44v6/PEG-PEI em células SGC7901..... | 52 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| I – Classificação de estímulos segundo o mecanismo de regulação da liberação de fármaco..... | 13 |
|--|----|

Abreviaturas

AAM – Acrilamida

DOX – Doxorrubicina

dsRNA – *Double-stranded RNA* (RNA de cadeia dupla)

EGFR – *Epidermal Growth Factor Receptor* (Recetor do Fator de Crescimento Epidermal)

ELP – *Elastin-Like Polypeptide* (Polipéptido Semelhante à Elastina)

EPR – *Enhanced Permeability and Retention* (Aumento da Permeabilidade e Retenção)

GnRH – *Gonadotropin-Releasing Hormone* (Hormona Libertadora da Gonadotropina)

HIFU – *High Intensity Focused Ultrasound* (Ultrassons Focalizados de Alta Intensidade)

IgG – Imunoglobulina G

IRM – Imagiologia por Ressonância Magnética

iRNA – RNA de interferência

LCST – *Lower Critical Solution Temperature* (Temperatura Inferior Crítica de Solução)

mRNA – RNA mensageiro

MDR – *Multi-Drug Resistance* (Resistência Múltipla a Fármacos)

MMP – Metaloproteínase da Matriz

NIR – *Near-Infrared* (Infravermelho Próximo)

pAsp – Poliaspartato

pDNA – DNA plasmídico

PEG – Polietilenoglicol

PEI – Polietilenoimina

PLA – Ácido Polilático

PLGA – Poli(lactato-co-glicolato)

PoliHis – Poli(L-Histidina)

Poli(NIPAAm) – Poli(*N*-isopropilacrilamida)

P-gp – Glicoproteína P

RDL – *Recursive Directional Ligation* (Ligação Direcional Recursiva)

RISC – *RNA-induced Silence Complex*

R6G – Rodamina 6G

TAT – Trans-ativador da Transcriptase do HIV

1. Introdução

1.1 O cancro

O cancro, também designado por neoplasia ou tumor maligno, é um termo genérico para um largo grupo de doenças que afetam qualquer parte do corpo. Uma das características do cancro é a rápida produção de células anormais, que crescem para além dos seus limites habituais e que podem invadir regiões adjacentes e espalharem-se por outros órgãos. Este processo é designado por metastização e é a principal causa da letalidade do cancro.^[1]



Figura 1. Fotografia do corte de um fígado com múltiplos nódulos provenientes de um cancro pancreático.^[2]

Os tumores começam por se desenvolver a partir de apenas uma célula. A transformação de uma célula normal numa célula tumoral é um processo que compreende várias etapas, começando geralmente numa lesão pré-cancerígena e continuando até à formação do tumor primário. Estas etapas resultam da interação entre os fatores genéticos do doente e a exposição a agentes cancerígenos externos, que podem ser físicos (como a radiação UV ou

ionizante), químicos (como o fumo do tabaco e contaminantes alimentares) e biológicos (infecções de certos vírus, bactérias ou parasitas).^[3] A idade também é um fator fundamental no desenvolvimento do cancro. A incidência do cancro aumenta dramaticamente com o envelhecimento devido à acumulação de riscos de desenvolvimento de determinados cancros, combinada com a tendência para os mecanismos de reparação celular perderem a sua eficácia.^[4]

Segundo a OMS, o combate ao cancro pode ser resumido essencialmente em três frentes:

- A implementação de estratégias para a prevenção do cancro, como campanhas antitabágicas, de promoção de dietas saudáveis ou dos riscos da exposição solar, p.e.;
- A deteção precoce do cancro, através de análises sanguíneas, à urina ou por técnicas de imagiologia;
- O tratamento dos doentes com cancro, que pode ter como objetivo curar a doença ou prolongar e melhorar a qualidade de vida do doente. Geralmente é feito por cirurgia, radioterapia ou quimioterapia.^[5]

1.2 A evolução da quimioterapia

Apesar da grande importância que tem nos dias de hoje, só há relativamente pouco tempo é que a quimioterapia se tornou uma ferramenta legítima da medicina avançada no tratamento do cancro. Nos finais do século XIX, o tratamento do cancro era feito apenas através de cirurgia, radioterapia e ocasionalmente com abordagens homeopáticas tradicionais, envolvendo cicuta ou sílica, por exemplo. Os primeiros avanços na quimioterapia antineoplásica seguiram os desenvolvimentos da quimioterapia das doenças infecciosas, muito devido à crença de que o cancro era contagioso. A solução de Fowler, constituída por trióxido de arsénio e bicarbonato de potássio e utilizada inicialmente para tratar a malária, foi por essa altura experimentada no tratamento da leucemia e linfomas e o seu uso nos casos de leucemia prolongou-se até aos anos 30 do século passado.^[6,7,8]

Durante a 1ª Grande Guerra, várias autópsias mostraram que a exposição ao gás mostarda poderia causar imunossupressão grave, aplasia da medula óssea e neutropenia, o que levou a que, em 1937, Alfred Gilman e Louis Goodman descobrissem que a mostarda nitrogenada tinha atividade antitumoral quando administrada em ratinhos com linfoma. Em 1943 fez-se o primeiro tratamento com mostarda nitrogenada de um cancro em humanos, mais precisamente de um linfoma não-Hodgkin. No entanto, o sigilo de guerra e a utilização de gases tóxicos como arma química adiaram a publicação dos relatórios destes casos até 1946. Começaram a surgir vários derivados da mostarda nitrogenada que ainda hoje são utilizados, como a ciclofosfamida, o melfalan, a ifosfamida e o clorambucilo.^[6,7] Desenvolvimentos paralelos durante a 2ª Guerra Mundial levaram à criação de antifolatos como o metotrexato que em 1948 mostraram ser úteis no tratamento da leucemia em crianças, e o antibiótico actinomicina D foi amplamente usado em casos de tumores pediátricos durante os anos 50 e 60 do século XX. Nos primeiros anos do pós-guerra também apareceram as tiopurinas (6-mercaptopurina e tioguanina), utilizadas contra as leucemias agudas e como agentes imunossupressores. No entanto, nos anos 50 a utilização de fármacos antineoplásicos não era consensual pois estes fármacos produziam efeitos rápidos mas de curta duração, e a introdução do 5-fluorouracilo e de corticosteroides nas terapias anticancerígenas não diminuiu a desconfiança em relação à capacidade de cura da quimioterapia. Em 1958, Roy Hertz e Min Chiu Li usaram metotrexato para tratar um coriocarcinoma, e assim conseguiram pela primeira vez curar um tumor sólido humano utilizando apenas quimioterapia, devolvendo alguma esperança quanto ao potencial dos fármacos antineoplásicos.^[6,7]

O início dos anos 60 viu a introdução dos alcaloides da vinca (vincristina, vimblastina) e da procarbazina. Até ao final da década de 60, a quimioterapia era geralmente feita apenas com um fármaco. O conceito da associação de diferentes fármacos em quimioterapia começou com o uso de “VAMP” (vincristina, metotrexato, 6-mercaptopurina e prednisona) no tratamento da leucemia linfoblástica aguda em crianças, que aumentou a taxa de remissão de 25% para 60%, sendo que 50% das remissões tiveram uma duração suficiente para serem consideradas “curas”.^[6,7] O linfoma não-Hodgkin foi tratado com

“MOMP” (melfalan, metotrexato, vincristina e prednisona) e “MOPP” (difere apenas na troca do metotrexato por procarbazina), obtendo-se com estes protocolos uma taxa de remissão que passou de quase zero para 80% e a remissão completa do linfoma em 60% dos pacientes tratados com “MOPP”. O gradual sucesso dos fármacos antineoplásicos levou a que estes fossem cada vez mais utilizados nos estágios iniciais do cancro e como adjuvantes da cirurgia e/ou da radioterapia. A combinação da quimioterapia com a cirurgia revelou-se especialmente benéfica para os pacientes com cancro da mama ou colo-retal. Em 1984 fizeram-se os primeiros ensaios clínicos ao paclitaxel, que pouco tempo depois foi considerado bastante útil para o tratamento do cancro nos ovários, cancro da mama, cancro do pulmão, sarcoma de Kaposi associado ao HIV, entre outros.^[6,7] Nos anos 90 chegou a era da terapia-alvo. O interesse da comunidade científica no estudo do sequenciamento do genoma forneceu dados que sugeriram que muitas das irregularidades das células cancerígenas eram derivadas do funcionamento anormal das proteínas quinases. Em 1996 é lançado o primeiro inibidor da tirosina quinase, o mesilato de imatinib, que juntamente com outros inibidores das proteínas quinases revolucionaram o tratamento da leucemia mieloide crónica e do tumor estromal gastrointestinal. Também nesta década foram introduzidos os anticorpos monoclonais, cuja combinação com quimioterapia aumentou a eficácia do tratamento por permitir que outros fármacos antineoplásicos se ligassem a recetores celulares específicos. O rituximab foi o primeiro anticorpo monoclonal lançado e viu o seu uso destinado ao tratamento de linfomas não-Hodgkin através da sua ligação ao antigénio transmembranar CD-20, existente na superfície das células B.^[6,7]

Atualmente existem 14 categorias de fármacos antineoplásicos representando mais de 50 agentes terapêuticos diferentes. O aumento do conhecimento da biologia das células neoplásicas tem sido notável e tem possibilitado o desenvolvimento de tratamentos cada vez mais avançados. Os eventos celulares envolvidos nas transformações tumorais e nas alterações do crescimento celular estão identificados e as etapas da carcinogénese de diversos tumores já se encontram documentadas. Os oncogenes que causam o descontrolo do crescimento celular estão identificados e caracterizados por

origem genética e função.^[6,9] As vias específicas de regulação da replicação celular são conhecidas ao detalhe e já existe clonagem das proteínas envolvidas na regulação. Está demonstrado que a manipulação das vias do ciclo de replicação celular possibilita a paragem do crescimento e a indução de apoptose nas células neoplásicas. Em 2007, a mortalidade do cancro foi 50% do que era em 1990, sendo que metade desse decréscimo se deveu à prevenção e deteção precoce e a outra metade é atribuída aos avanços nos tratamentos quimioterapêuticos. As novas iniciativas na quimioterapia e radioterapia têm aumentado a sobrevivência dos pacientes com diversas formas de neoplasias, e vários cancros têm agora uma taxa de sobrevivência de cinco anos superior a 80%. Cerca de 70% da leucemia pediátrica é potencialmente curável e a maioria dos casos de cancro testicular são tratáveis nos dias de hoje.^[6,9] No entanto, o cancro continua a ser uma das principais causas de morte no mundo e segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) foi responsável por 7,6 milhões de mortes em 2008 (cerca de 13% da mortalidade), valor que a OMS prevê que aumente para 11 milhões no ano de 2030.^[10]

1.3 Obstáculos das terapias antineoplásicas

Uma das principais causas da letalidade do cancro é o facto de a sua deteção ser, em muitos casos, tardia. Apesar das metástases serem a derradeira causa da morte, a falta de controlo do tumor primário é uma falha determinante na terapia. Para além de ser mais fácil tratar um cancro confinado a uma área ou órgão, ao tratar um tumor antes da sua metastização aumentam-se consideravelmente as probabilidades do doente sobreviver ao cancro. No entanto, o controlo local do tumor é particularmente difícil no colo do útero, ovários, pâncreas, cólon e cérebro, e este facto torna necessário o aperfeiçoamento das técnicas de diagnóstico dos tumores primários.^[11]

As próprias características dos tecidos tumorais são entraves para o sucesso dos tratamentos anticancerígenos. A libertação de agentes terapêuticos nos tumores sólidos é um problema significativo devido aos impedimentos ao transporte de fármacos que são colocados pelas

propriedades biológicas e ultraestruturais dos tumores. A distribuição heterogênea dos vasos sanguíneos, juntamente com a sua ramificação anômala e sinuosa, resultam num fluxo sanguíneo lento e desigual em redor dos tumores. Para além disso, a tendência para escoar dos capilares tumorais e a ausência de um sistema linfático funcional leva a que a pressão intersticial seja elevada, o que retarda o transporte dos fármacos de alto peso molecular. Outro obstáculo para a terapia antineoplásica é a própria estrutura do tumor. As células cancerígenas geralmente ocupam menos de 50% do volume total do tumor, a vasculatura tumoral ocupa entre 1% a 10% e o restante é ocupado por interstício rico em colagénio. Assim, quando o fármaco sai dos capilares, enfrenta várias barreiras de transporte até chegar às células alvo. A disparidade da expressão de antigénios e recetores nas células tumorais também pode diminuir a eficácia da quimioterapia. A maioria dos tumores não têm antigénios únicos e os antigénios alvo não se encontram unicamente nos tumores, o que faz com que os tratamentos com afinidade a determinados antigénios ou recetores por si só não sejam suficientes nem seguros para tratar as neoplasias.^[10,11] Por exemplo, o Recetor 2 do Fator de Crescimento Humano (HER2) é correntemente utilizado no direcionamento de fármacos no tratamento do cancro da mama, mas só é expresso em 20 a 30% dos tumores da mama.^[12] Como resultado de todas as barreiras mencionadas, cada dose de quimioterapia acaba por tratar o tumor apenas parcialmente e são necessárias doses adicionais para eliminar o tumor na totalidade. As células cancerígenas sobreviventes vão sendo sujeitas a uma pressão seletiva que favorece as mutações genéticas que aumentam a resistência aos fármacos. Após repetidos tratamentos, as células cancerígenas inicialmente vulneráveis a certos fármacos podem deixar de responder aos mesmos, e isso leva ao aumento da dose (e conseqüente aumento dos efeitos adversos) ou à necessidade de continuar o tratamento com outro fármaco. No entanto, com a troca de fármaco muitas vezes constata-se que as células cancerígenas desenvolveram mecanismos de defesa tão eficazes que se tornaram não só resistentes ao fármaco inicial, como já não respondem a outros fármacos que por vezes nem estão funcionalmente relacionados. Este fenómeno é designado por efeito *Multi-Drug Resistance* (MDR).^[13]

Por fim, existe a questão dos agentes quimio- e radioterapêuticos serem geralmente tóxicos tanto para as células tumorais como para as células saudáveis, o que leva aos indesejáveis efeitos secundários. Se a dose for reduzida para aliviar esses efeitos adversos, corre-se o risco de comprometer a eficácia da terapia; por outro lado, se aumentarmos a dose, o controlo do crescimento tumoral será maior mas a toxicidade nos tecidos saudáveis também aumentará. Nalguns casos os efeitos secundários limitam de tal forma as terapias antineoplásicas que alguns pacientes com cancro não têm opções terapêuticas.^[10,11] Estas reações adversas podem ir desde as frequentes náuseas, diarreia, fadiga e alopecia, até situações mais graves como mielosupressão, neurotoxicidade e depressão do sistema imunitário.^[14]

1.4 Novas abordagens quimioterapêuticas: os *smart polymers*

Com o objetivo de melhorar os meios disponíveis para a remissão do cancro, têm-se desenvolvido diferentes tipos de sistemas de libertação de fármacos que empregam macromoléculas, vesículas ou outras partículas que são portadoras de agentes terapêuticos e/ou funcionam como reservatórios desses agentes no organismo.^[11,15,16] A função principal destes sistemas terapêuticos passa por alterar a biodisponibilidade e a farmacocinética do fármaco, de modo a maximizarem o seu direcionamento para os tecidos neoplásicos, enquanto minimizam a sua toxicidade sistémica e a sua degradação.^[11,17,18] Estes sistemas terapêuticos também permitem manter a concentração do fármaco dentro do seu índice terapêutico e com uma menor frequência de doses, diminuem a necessidade de fornecer um acompanhamento cuidado por parte dos médicos e aumentam o conforto do doente e a sua adesão ao tratamento. Estes sistemas de libertação devem ser de fácil produção e a sua relação custo/benefício deve ser compensadora.^[15,16,17,18,19]

Alguns destes sistemas de libertação são constituídos por *smart polymers*, ou seja, por polímeros que têm capacidade de modificar as suas características como resposta a estímulos externos. Estas moléculas são polímeros funcionais que sofrem transformações rápidas e reversíveis na sua

microestrutura, passando de um estado hidrofílico para um estado hidrofóbico (ou vice-versa) e libertando o fármaco ao qual estavam ligados quando formulados num sistema de administração. Estas transformações são causadas por pequenas alterações no meio, como pH, temperatura, presença de determinadas biomoléculas, entre outras.^[20,21] Assim, a utilização destes sistemas poliméricos possibilita uma libertação localizada do fármaco, seja por se conferir exclusivamente à zona do corpo afetada as alterações necessárias para a autodegradação do polímero e consequente libertação do fármaco, seja porque os polímeros que constituem o sistema se degradam quando sujeitos a um certo estímulo já existente no tecido alvo. Esta capacidade de modular a libertação do fármaco tem um elevado potencial para a quimioterapia, já que um dos problemas das terapias anticancerígenas é o facto de elas afetarem tanto as células cancerígenas como as células normais.

O principal objetivo do presente trabalho foi avaliar de que forma o uso de *smart polymers* e a resultante libertação localizada dos fármacos antineoplásicos pode influenciar a eficácia e a segurança dos tratamentos quimioterapêuticos.

2. *Smart polymers*: conceitos gerais

Os *smart polymers* podem adotar várias conformações, antes e depois de sujeitos ao estímulo. Essas conformações dependem da estrutura do polímero e do estímulo que provoca as alterações estruturais. Na figura 2 estão esquematizados alguns dos tipos de respostas dos *smart polymers* aos estímulos do meio.^[20, 21]

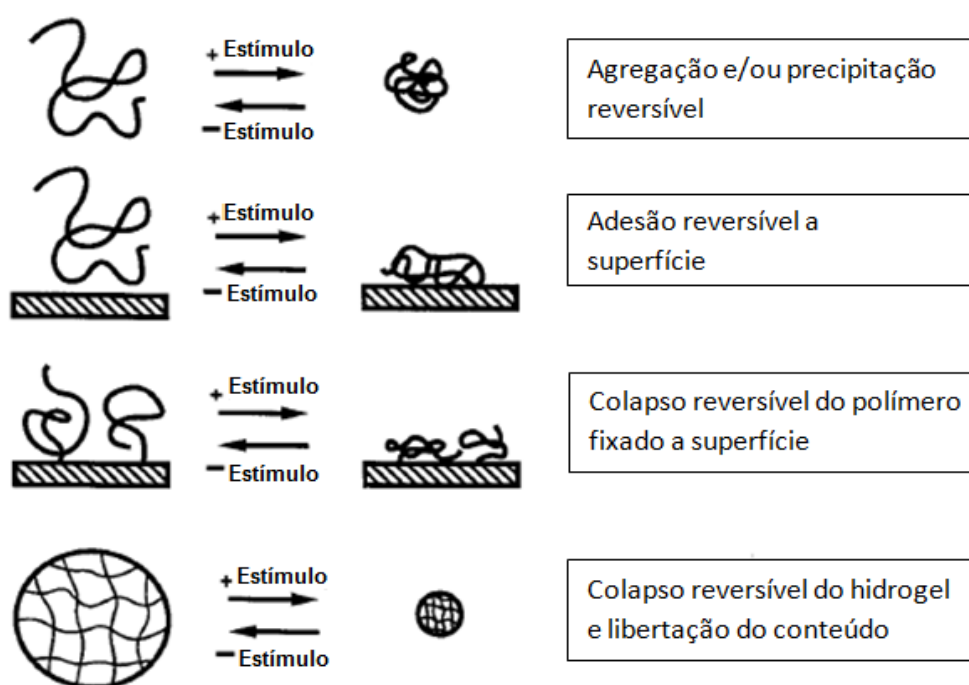


Figura 2. Esquema de diferentes tipos de resposta dos *smart polymers* aos estímulos do meio.^[21]

A transição de estados é vital para os sistemas feitos à base de *smart polymers*, pois o fármaco enquanto está ligado ao polímero fica inativo e só volta a ganhar atividade quando deixa de estar conjugado e passa para a sua forma livre. Para que esta transição de estados aconteça é necessário que haja um balanço adequado entre grupos funcionais hidrofílicos (-CONH, p.e.) e hidrofóbicos (-CH(CH₃)₂-, p.e.) na estrutura molecular do polímero.^[20;22] Estas

transformações ocorrem geralmente em meio aquoso, o que é ideal dado que o sangue é constituído na sua maioria por água. Este facto é de tal forma conveniente, que contribuiu para que os *smart polymers* se transformassem num caso de grande interesse para a biotecnologia e a medicina.^[20]

2.1 Vantagens dos *smart polymers* na terapia antineoplásica

Nas últimas duas décadas, os sistemas de libertação constituídos por *smart polymers* têm captado muita atenção. Em pouco tempo vários destes sistemas deixaram o laboratório e passaram a ser utilizados clinicamente, e alguns já são produtos comerciais. Outros polímeros também utilizados para formar sistemas de administração para alguns fármacos como nitroglicerina, escopolamina, pilocarpina, antibióticos, contraceptivos e antineoplásicos, já se encontram em fases avançadas de ensaios clínicos.^[15;23;24] Todo este interesse se deve às vantagens da sua utilização na terapia, incluindo a terapia antineoplásica.

A principal vantagem da utilização dos *smart polymers* nos sistemas de libertação é a possibilidade de proporcionarem a libertação do fármaco de forma seletiva nas células doentes, contribuindo para um tratamento mais eficaz, pois a grande maioria do fármaco seria libertado no tecido alvo e a dose necessária para produzir efeito terapêutico seria menor. Como as células saudáveis seriam pouco afetadas, o uso de *smart polymers* também tornaria o tratamento mais seguro para o doente. Fazendo a analogia para as terapias anticancerígenas existentes, o recurso aos *smart polymers* permitiria a utilização de doses de fármaco que antes eram impensáveis devido aos efeitos secundários que acarretariam para o paciente.^[11,17]

Para além de libertarem o fármaco apenas nas células cancerígenas, os sistemas com *smart polymers* acumulam-se preferencialmente nos tumores devido à elevada permeabilidade e retenção destes tecidos, conhecida como efeito EPR, do inglês *Enhanced Permeability and Retention*. Este efeito baseia-se no facto da vasculatura tumoral ser mais permeável, o que leva ao extravasamento das moléculas/partículas e à sua acumulação no tecido

intersticial do tumor. Esta acumulação é facilitada pela habitual ausência de sistema linfático funcional nos tumores, que é responsável pela drenagem das macromoléculas nas células saudáveis. No entanto, ao usar um sistema de administração de fármacos, o efeito EPR não é suficiente para que haja a passagem do fármaco para dentro da célula; esse papel é desempenhado pelos estímulos que provocam a mudança de estado do polímero e, conseqüentemente, a libertação do fármaco.^[11,17,19]

Muitos agentes quimioterapêuticos são pequenas moléculas hidrofóbicas, o que os torna pouco solúveis e faz com que sejam rapidamente excretados após a sua administração intravenosa, e no pior dos casos podem-se agregar e provocar toxicidade local, o que leva a que a concentração do fármaco no tumor seja baixa. Como polímeros que são, os *smart polymers* quando conjugados com fármacos de baixo peso molecular aumentam consideravelmente o seu tempo de semivida plasmático e a sua solubilidade.^[11,17] O facto de serem polímeros erosíveis torna os *smart polymers* mais vantajosos em relação a outros compostos transportadores não-erosíveis, pois vão se degradando e gradualmente vão desaparecendo após a libertação do fármaco, o que os torna biodegradáveis.^[19] Comparativamente com sistemas de libertação que necessitam de ser cirurgicamente implantados e, nalguns casos, posteriormente explantados, os *smart polymers* são menos desconfortáveis para o paciente, trazem um menor risco de infeção e acarretam menores custos.^[23]

A ação dos *smart polymers* é compatível com a presença de outras partículas que procurem ativamente e se liguem a células específicas através de ligandos, anticorpos ou aptâmeros. Assim, os sistemas de libertação de fármacos podem combinar *smart polymers* com estes ligandos, de forma a aumentar ainda mais a sua capacidade de direcionamento para os tumores.^[19] Exemplos de ligandos com maior especificidade para os tumores são o ácido fólico e a transferrina. As células cancerígenas possuem um grande número de recetores de ácido fólico e de transferrina, pois necessitam destas moléculas para se desenvolverem e se proliferarem de forma rápida.^[17,25]

Por fim, mas não menos importante, alguns estudos demonstraram que os sistemas poliméricos de libertação podem superar os efeitos de MDR. O principal mecanismo de MDR é a superexpressão de bombas de efluxo, geralmente com base na glicoproteína-P (P-gp), existente nas células cancerígenas. Estas bombas de efluxo são transportadores transmembranares que se ligam ao fármaco quando este entra na membrana celular e o devolvem ao espaço extracelular. Se o sistema de administração estiver desenhado para proporcionar uma acumulação seletiva no tecido tumoral, isso leva a uma libertação de fármaco de tal forma grande que supera qualquer mecanismo de MDR, sendo suficientemente localizada para não afetar as células saudáveis. Outro meio de contornar os mecanismos de MDR é utilizando sistemas de libertação constituídos por micelas ou lipossomas e cobertos com *smart polymers*. Estes sistemas entram na célula por endocitose, evitando assim o contacto com as P-gp.^[11,13]

Apesar das várias vantagens, continuam a existir considerações críticas a ter em conta na produção de sistemas poliméricos de libertação em função de estímulos externos, como por exemplo a sua biocompatibilidade e toxicologia, o tempo de resposta aos estímulos, a capacidade de libertar a quantidade de fármaco desejada e no local designado, a sua esterilização e a reprodutibilidade da produção.^[15]

2.2 Classificação dos *smart polymers* segundo o tipo de mecanismo de regulação

Nos últimos anos vários grupos de investigação têm procurado desenvolver *smart polymers* mais específicos para o tipo de tratamento que se pretende pôr em prática e/ou em que a quantidade de fármaco libertada seja condicionada pelas próprias carências fisiológicas. Os sistemas poliméricos de libertação podem ser classificados como sendo de regulação externa ou de autorregulação. Os sistemas de regulação externa necessitam de ser estimulados externamente para que a difusão do agente terapêutico ocorra. Essa estimulação é feita na zona em que se pretende que o fármaco se distribua. Nos sistemas autorregulados a taxa de libertação do fármaco é

controlada apenas por *feedback* homeostático, não existindo intervenção externa ou, quando existe, a intervenção é mínima. Na tabela I estão classificados segundo mecanismo de regulação alguns dos estímulos utilizados na libertação de fármaco.^[15]

Tabela I – Classificação de estímulos segundo o mecanismo de regulação da libertação de fármaco.^[15]

| Mecanismo de regulação | Estímulos associados |
|------------------------|---|
| Regulação externa | Temperatura Incidência de radiação Ultrassons Magnetismo |
| Autoregulação | pH Reações enzimáticas Hidrólise dependente de metais |

Atualmente, a utilização dos *smart polymers* no tratamento do cancro é feita em quatro frentes: a imagiologia, o tratamento utilizando estímulos externos para focalizar a libertação do fármaco, o tratamento com sistemas especificamente degradados pela maior acidez das células cancerígenas, e a terapia génica. Este trabalho irá abordar cada uma destas frentes de forma mais pormenorizada.

3. Utilização de *smart polymers* em técnicas de imagiologia do cancro

A detecção atempada de tumores contribui em grande escala para um tratamento quimioterapêutico eficaz e diminui a gravidade dos efeitos secundários inerentes à terapia. Desenvolvimentos na área da bioquímica e biologia molecular têm permitido um maior conhecimento sobre os mecanismos moleculares da carcinogénese. Cada etapa da carcinogénese envolve reações entre moléculas específicas e a detecção destas moléculas oferece a oportunidade de deter a evolução da neoplasia nos seus estágios iniciais e de prevenir efetivamente a progressão subsequente do cancro e a necessidade dos tratamentos caros e dolorosos associados. A prevenção através da detecção precoce continua a ser a melhor estratégia para a redução da incidência e mortalidade do cancro, e a visualização das características ao nível molecular da carcinogénese possibilitam a condução e monitorização da terapia.^[26]

Os avanços na tecnologia de imagiologia foram possibilitando a substituição dos diagnósticos invasivos convencionais por técnicas não-invasivas de imagem fisiológica/molecular. A alta resolução espacial, juntamente com a acumulação contínua de conhecimentos sobre os processos fisiológicos ao nível molecular, tornaram a imagiologia molecular uma das mais promissoras tecnologias do século XXI. No entanto, a aplicação de técnicas de imagiologia molecular, como a imagiologia por ressonância magnética (IRM), por fluorescência ótica ou por ultrassons, tem sido dificultada pela baixa sensibilidade, especificidade e capacidade de direcionamento das atuais sondas de imagem. Moléculas pequenas que são marcadas diretamente por um grande número de substâncias químicas têm tido o seu uso limitado pela sua falta de especificidade, instabilidade, toxicidade e rápida eliminação.^[26,27] Recentemente, a combinação da química de polímeros com o campo da imagiologia levou à criação de sondas para diagnóstico clínico contendo *smart polymers*. A criação de sistemas de libertação com *smart polymers* permite que o agente de contraste seja ativado apenas no local pretendido e através de

mudanças na conformação ou na estrutura química, o que traz duas vantagens: um baixo valor de ruído intrínseco e uma inerente amplificação do sinal dependente da concentração no(s) tecido(s) alvo. Como os agentes de contraste não transmitem sinal enquanto estão inativados, não há necessidade de ter em conta o sinal que não chegou ao local pretendido, e como a ativação é feita exclusivamente nos tecidos alvo, a intensidade do sinal vai ser em função da concentração nesses mesmos tecidos.^[26,27]

Antes da introdução dos *smart polymers* na construção das sondas de imagem, a utilização de polímeros na imagiologia já era uma realidade. Em geral, as sondas de imagem são suscetíveis de agregação ou degradação *in vivo*, o que resulta numa má qualidade de imagem. O uso de polímeros hidrofílicos como o polietilenoglicol (PEG) é uma boa solução para evitar que as sondas se agreguem ou degradem. A associação de óxido de ferro com PEG (ou outros polímeros) tem sido bastante investigada para aplicação em IRM, especialmente em angiografia por ressonância magnética, por ter um tempo prolongado de circulação e uma boa estabilidade no sangue.^[27] Estudos sobre o PEG mostraram que quanto maior a cadeia deste polímero, maior o aumento de contraste nos rins, o que por sua vez indicou que o tamanho da cadeia de PEG pode afetar a eliminação renal das sondas. Sondas poliméricas têm sido utilizadas em várias técnicas de imagiologia, como nos instrumentos de imagem ótica ou nuclear. O Feridex[®] é um agente de contraste constituído por óxido de ferro revestido por dextrano, sendo bastante utilizado em IRM e apresentando excelentes imagens de carcinomas hepatocelulares, devido à sua grande afinidade com o sistema reticuloendotelial hepático.^[27]

Os primeiros sistemas de libertação envolvendo *smart polymers* e fluoróforos foram desenvolvidos em 1999 por Weissleder e Ntziachristos e adquiriam fluorescência após serem ativados proteoliticamente pela ação de determinadas enzimas. Consistiam em fluoróforos com absorção no infravermelho próximo (NIR – do inglês *Near-Infrared*) ligados a copolímeros de polilisina-PEG que podem ser clivados pela proteinase lisossomal catepsina-B, enzima associada aos tumores e existente nos ratos. Vários sistemas análogos têm sido experimentados com outras proteinases como a catepsina-D, proteinases intracelulares e metaloproteinases da matriz (MMPs). O uso de

sistemas clivados pela catepsina-D detetou com êxito a presença de tumores mamários bem diferenciados e pouco diferenciados em ratos utilizados como modelos do cancro da mama humano. Proteinases intracelulares como a caspase-3, que está relacionada com a apoptose celular, foram localizadas através do uso de proteínas de fusão da luciferase que são hidrolisadas pela caspase-3. Na figura 3 estão representadas imagens de fluorescência NIR de ratos com fibrosarcoma, um deles sem qualquer tratamento (A) e o outro que foi tratado com sistemas contendo inibidores da MMP-2 (B), sendo que neste último verifica-se uma redução da fluorescência.^[26,27]

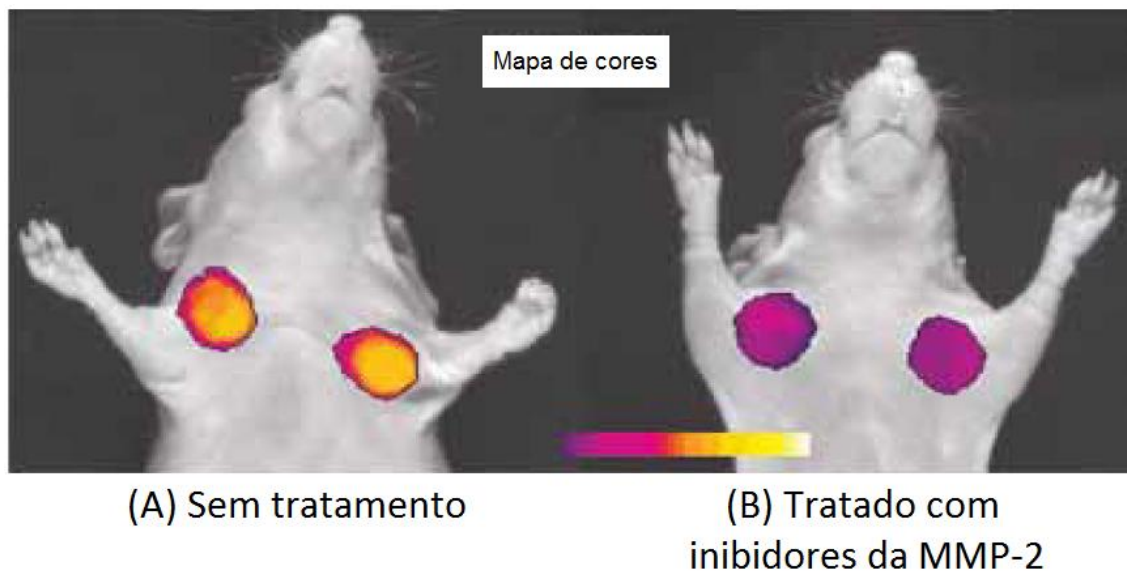


Figura 3. Imagem por fluorescência NIR de ratos com fibrosarcoma e com a atividade da MMP-2 medida em ratos tratados (B) e não-tratados (A) com inibidores da MMP-2.^[26]

O objetivo atual da imagiologia molecular passa pela criação de sondas cada vez mais específicas, que providenciem um elevado contraste com um rácio de sinal-ruído cada vez mais baixo. As estratégias de direcionamento e os sistemas com *smart polymers* são boas soluções pois permitem a criação de sondas altamente capazes de se localizarem em locais específicos do organismo. Outra característica destas sondas é o facto de provocarem um

sinal forte somente quando são confrontadas com os estímulos pretendidos, causados por uma determinada doença ou por características patofisiológicas anormais numa área limitada. Sondas que incluem *smart polymers*, PEG e fluoróforos NIR têm sido investigadas para imagiologia do cancro da mama, pulmão e para melhor entender os mecanismos da apoptose celular. Contudo, os ensaios da utilização de sondas à base de *smart polymers* ainda são feitos essencialmente em animais. Os bons resultados obtidos nestes ensaios levam ao otimismo em relação à viabilidade deste método e espera-se que num curto espaço de tempo (5-10 anos) se utilizem estas sondas na imagiologia do cancro em humanos. ^[26,27]

4. Sistemas de libertação com regulação externa: *smart polymers* termossensíveis

Como já foi referido, um dos estímulos utilizados para promover a libertação do fármaco é a alteração da temperatura. Transportadores poliméricos que possuam uma transição *Lower Critical Solution Temperature* (LCST) mantêm-se solúveis enquanto estão sujeitos a uma temperatura abaixo da sua LCST, mas sofrem colapso hidrofóbico e agregam-se quando sujeitos a temperaturas acima da LCST. Este fenómeno deve-se ao facto de que, com o aumento da temperatura, as forças de interação entre as moléculas de água e o polímero se tornam desfavoráveis comparativamente às interações água-água e polímero-polímero.^[11,23] Deste modo, o polímero termicamente sensível deve ser projetado de forma a que seja solúvel quando injetado *in vivo*, mas se torne insolúvel, se agregue e se acumule num tumor aquecido localmente onde vai libertando o fármaco de forma gradual. Para que isso aconteça é necessário que o polímero tenha uma LCST superior à temperatura corporal (aproximadamente 37 °C) mas inferior à temperatura à qual o tumor é aquecido. O aquecimento dos tumores *in vivo* é realizado através de métodos que permitem um aquecimento o mais localizado possível, de modo a que se evite a libertação de fármaco nas células saudáveis, e é geralmente feito com recurso a radiação infravermelha, ultrassons ou micro-ondas.^[19,28]

A LCST de cada polímero pode ser determinada medindo a turvação ótica numa solução aquosa em função da temperatura. Abaixo da LCST, a solução mantém-se transparente mas com o aumento da temperatura a solução vai turvando devido à agregação do polímero. Alguns autores definiram a LCST como a temperatura a que se obtém 5% da turvação máxima.^[11,21,29] Nalgumas situações o polímero utilizado apresenta termossensibilidade mas a LCST está acima ou abaixo da temperatura pretendida, pelo que tem de se recorrer a modificações. O método mais utilizado para alterar o valor de LCST de um polímero é ajustando a sua hidrofobicidade relativa. Se, por exemplo, se deseja aumentar a LCST de um polímero, isso pode ser conseguido através da substituição de um ou mais monómeros por outros comparativamente mais

hidrofílicos, diminuindo assim a hidrofobicidade do polímero. Outro fator a ter em conta quando se define o valor de LCST é se o polímero se liga a proteínas plasmáticas e a células sanguíneas e, se isso acontecer, deve-se verificar se essas interações alteram significativamente a LCST.^[11,21]

A poli(*N*-isopropilacrilamida) (poli(NIPAAm)) é um polímero sintético termossensível bastante estudado. Já são conhecidas várias formas de sintetizar este polímero para a sua utilização na construção de sistemas de libertação de fármaco.^[22] Um dos métodos que permite uma produção fácil e com baixos custos é a polimerização via radical livre a partir da *N*-isopropilacrilamida (NIPAAm) e da acrilamida (AAm). Apesar das suas propriedades poderem ser até certo ponto ajustadas mediante a inclusão de comonómeros, este método de síntese faz com que não seja possível controlar de forma precisa o comprimento da cadeia do polímero, a sequência e a sua estereoquímica. Também é difícil regular a quantidade e posição dos grupos reativos na cadeia polimérica que permitem a ligação do polímero com os agentes quimio- e radioterapêuticos. Todos estes fatores levam a que a estequiometria e o rendimento das reações de conjugação da poli(NIPAAm) com os grupos funcionais terapêuticos seja de difícil controlo.^[11]

Outros *smart polymers* termossensíveis são os polipéptidos semelhantes à elastina (*Elastin-Like Polypeptides*, ou ELP's). São polímeros naturais termossensíveis resultantes da repetição do pentapéptido Val-Pro-Gly-Xaa-Gly, em que "Xaa" pode ser qualquer aminoácido exceto prolina (Pro), e são sintetizados recombinantemente em *E. Coli* através da superexpressão de um gene sintético. Ao contrário dos polímeros sintéticos como a poli(NIPAAm), o facto dos polímeros proteicos como os ELP's serem geneticamente codificados possibilita um controlo preciso em relação à sequência e comprimento da cadeia do polipéptido, assim como da quantidade e posição das suas cadeias laterais reativas. Duas variáveis importantes a ter em conta nas aplicações *in vitro* são o peso molecular, que regula a farmacocinética, e a sequência de aminoácidos, que pode ser projetada de forma a definir a atividade biológica (por exemplo, a afinidade para determinados recetores da membrana celular) e controlar a biodegradação do polipéptido. Outra grande vantagem dos ELP's é a sua biocompatibilidade extremamente elevada. Apesar da natureza

polipeptídica, ainda não foi possível obter anticorpos monoclonais contra os ELP's, aparentemente porque o sistema imunitário não os consegue distinguir da elastina natural e assim, os ELP's mantêm-se mais tempo em circulação. Outro exemplo da sua biocompatibilidade é o facto da sua degradação dar origem apenas a aminoácidos comuns. Resumindo, a boa capacidade de direcionamento tumoral, a facilidade de produção e modelação e a alta biocompatibilidade são características que tornam os ELP's excelentes candidatos a sistemas de libertação de fármacos.^[11,29] Uma das estratégias de produção dos genes que codificam as sequências dos ELP's é por *Recursive Directional Ligation* (RDL). Trata-se de um método rápido, conveniente e flexível que monta um número específico de repetições oligoméricas de DNA numa orientação previamente estabelecida e que é feita por etapas, permitindo que o peso molecular desejado do polipéptido seja racionalmente atingido durante a oligomerização dos genes. Cada etapa da oligomerização produz oligómeros de DNA idênticos e que, portanto, não têm de ser fracionados. Os diferentes monómeros ou oligómeros codificantes com diferentes sequências de repetição podem ser combinados em qualquer etapa da oligomerização para gerar maior diversidade ao nível da sequência polipeptídica. Os genes finais serão depois utilizados para a produção dos ELP's pretendidos, que serão expressos pela *E. coli*.^[11]

4.1 Ensaio sobre a capacidade de direcionamento dos *smart polymers* termosensíveis

Foram realizados ensaios *in vivo* que pretendiam estudar a libertação de fármaco de sistemas constituídos por poli(NIPAAm) e ELP's em tumores sólidos através de fluorescência microscópica intra vital de tumores em ovários humanos implantados em câmaras na pele dorsal de ratos nus (figura 4). Estes sistemas foram marcados com rodamina, que é um composto orgânico fluorescente.^[11]



Figura 4. Fotografia de uma câmara dorsal implantada num rato nu.^[30]

O aquecimento dos tecidos tumorais foi feito através do aumento da temperatura das câmaras dorsais. Utilizaram-se a poli(NIPAAm) e ELP com LCST de 40 °C e para cada um dos polímeros estabeleceram-se três grupos de ratos: um grupo com o tumor aquecido a 42 °C, um grupo controlo com o tumor não-aquecido, e outro grupo controlo ao qual se administrou o mesmo polímero mas com um valor de LCST consideravelmente superior e que se designaram como poli(NIPAAm)₂ e ELP₂, respetivamente. Estes dois últimos polímeros serviram como controlo na medida em que os tumores iriam ser aquecidos a uma temperatura bastante inferior à sua LCST e assim não se iriam agregar na zona aquecida e continuariam em circulação. Como os polímeros têm pesos moleculares diferentes e, conseqüentemente, exibem farmacocinéticas diferentes, a fluorescência no caso do ELP foi medida 44 minutos após a sua injeção, enquanto que para a poli(NIPAAm) o intervalo de tempo foi de 26 minutos. Na figura 5 está representado o gráfico da intensidade média da fluorescência observada em cada um dos grupos de ratos.^[11]

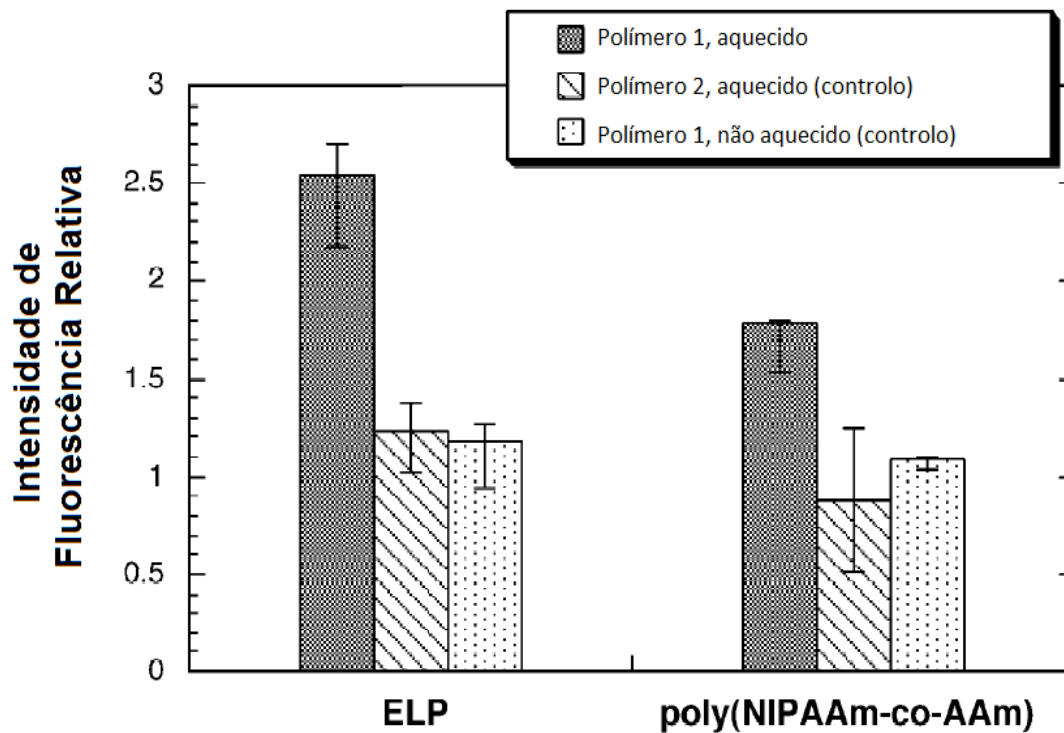


Figura 5. Gráfico da intensidade de fluorescência medida em cada grupo de ratos, em função do polímero utilizado (ELP ou poli(NIPAAm)).^[11]

Verificou-se que a intensidade da fluorescência nos grupos do ELP e poli(NIPAAm) aquecidos, comparativamente aos correspondentes grupos controle aquecidos e não-aquecidos, foi cerca de duas vezes superior, e no caso do ELP essa superioridade ficou próxima dos 250%. Estes resultados indicam que o aquecimento do tumor levou a uma significativa acumulação dos transportadores termossensíveis nas células cancerígenas.^[11]

4.2 Sistemas de libertação termossensíveis com aplicadores de hipertermia fototermal

Novas técnicas que conjugam *smart polymers* termossensíveis com elementos aplicadores de hipertermia têm sido ativamente estudados pela sua eficácia antitumoral. A hipertermia do tumor em si não é suficiente para alcançar os níveis desejados de citotoxicidade cancerígena (principalmente nos tumores mais viscerais) e até pode ser dolorosa para o paciente,^[28] mas tem diversos efeitos benéficos para o tratamento antineoplásico que podem ser aproveitados quando combinados com outras técnicas: diminui a síntese de DNA, altera a síntese proteica (incluindo a indução de proteínas de choque térmico), rompe o centróssoma das células, altera a expressão dos recetores e a ligação dos fatores de crescimento, e modifica a morfologia celular, entre outros. Para além disso, a hipertermia, que geralmente atinge temperaturas próximas dos 45 °C, aumenta o fluxo de sangue e a permeabilidade vascular do tumor, facilitando a entrada dos fármacos nas suas células. A implementação clínica do direcionamento térmico utilizando este tipo de polímeros não precisa de qualquer desenvolvimento ao nível da tecnologia de hipertermia, já que os protocolos de hipertermia existentes são consistentes com as temperaturas que estes polímeros necessitam para se agregarem ao tumor.^[11]

Um estudo avaliou a capacidade antineoplásica epitelial de um sistema de libertação que alia *smart polymers* a um agente de hipertermia. O sistema referido era composto por uma matriz de poli(lactato-co-glicolato) (PLGA) contendo doxorrubicina (DOX) como agente quimioterapêutico e com uma camada superficial de ouro como aplicador de hipertermia fototermal. O ouro tem recebido uma considerável atenção na área biomédica devido às suas excelentes propriedades óticas, inércia e baixa citotoxicidade. Para aumentar a afinidade deste sistema com as células epiteliais cancerígenas, incorporou-se cetuximab na camada de ouro. O cetuximab é um anticorpo anti-*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR), que é um recetor que existe em maior quantidade na membrana celular das células dos tumores epiteliais comparativamente com as células saudáveis. Para além de se ligar aos EGFR, o cetuximab também bloqueia a produção destes recetores.^[28, 31]

A incidência de laser NIR na zona do tumor leva à ocorrência do efeito *Surface Plasmon Resonance* (SPR) na camada de ouro, o que por sua vez leva a um aumento da temperatura. A temperatura ao ultrapassar a LCST do PLGA (45 °C) provoca a agregação do polímero perto do tumor e facilita a liberação da DOX.^[28]

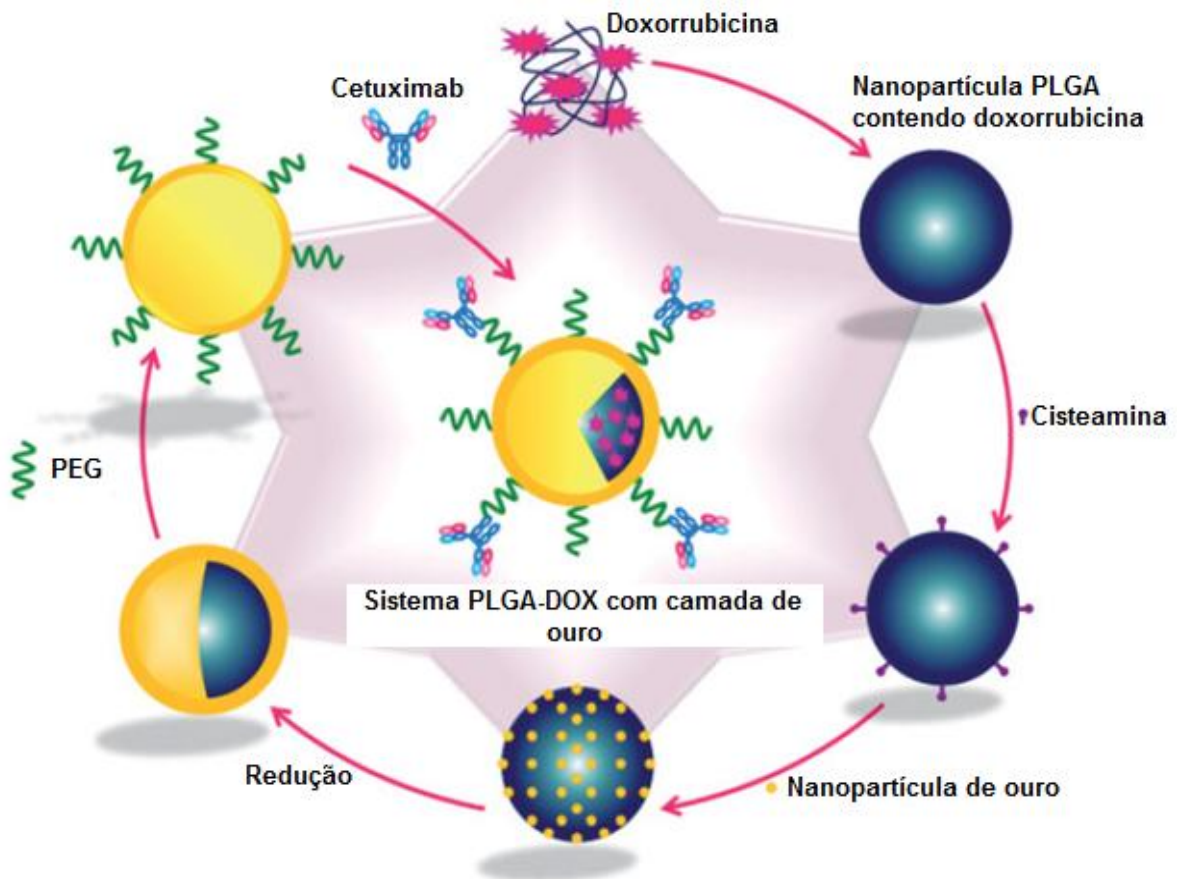


Figura 6. Esquema de formação do sistema de liberação PLGA-DOX com camada de ouro.^[28]

Na figura 6 encontra-se esquematizado o processo de formação do sistema PLGA-DOX. A primeira etapa de produção destes sistemas é a formação do conjugado PLGA-DOX através de uma nanoemulsão (emulsão translúcida ou transparente em que as partículas têm entre 20 a 500 nm de diâmetro).^[28,32] De seguida, o grupo carboxilo do polímero reage com cisteína

de modo a que depois se possam ligar nanopartículas de ouro ao grupo sulfidrilo na extremidade da cisteína. Posteriormente, cria-se a camada de ouro que envolve o sistema através da redução das partículas de ouro. Esta estrutura permite a utilização de uma região de infravermelho que tenha uma absorção mínima pela água e hemoglobina, mas que seja suficientemente absorvida pela camada de ouro de forma a gerar um efeito termal antitumoral efetivo. Na figura 7 está representado o aumento da temperatura com radiação de 820 nm ao longo do tempo de uma solução do sistema (linha vermelha, I), comparativamente com a água (linha azul, II). A adição de moléculas de PEG confere ao sistema a diminuição da sua eliminação renal, protegem-no do sistema imunitário e possibilitam a ligação do cetuximab, através de uma técnica de bioconjugação.^[16,28]

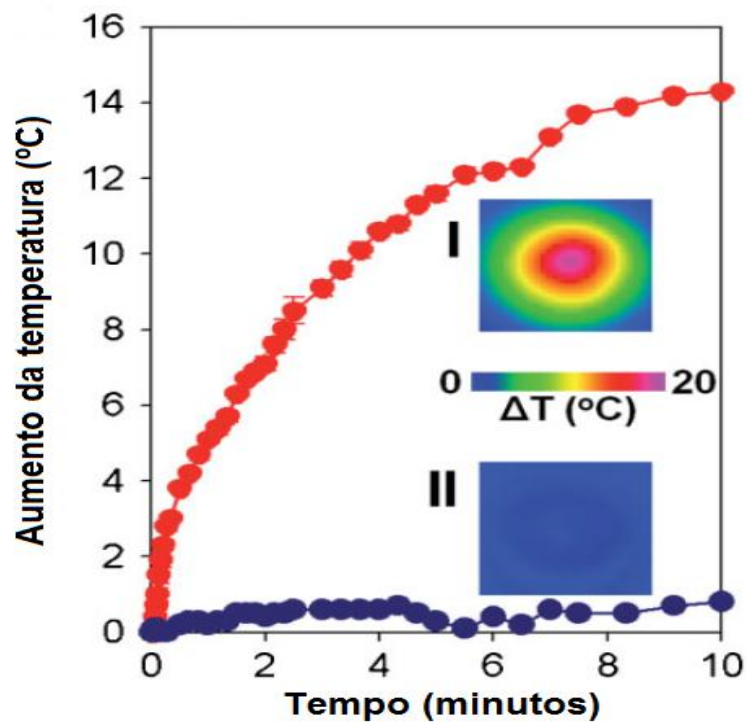


Figura 7. Gráfico do aumento da temperatura de uma solução do sistema PLGA-DOX (I) e de outra contendo somente água (II), em função do tempo de irradiação.^[28]

Na figura 8 está representado um gráfico que compara a quantidade de DOX libertada por uma solução do sistema (I) exposto a radiação de 820 nm, e por outra solução do mesmo sistema mas sem irradiação (II). A seta verde indica o ponto a partir do qual se iniciou a irradiação da solução I. É visível que a exposição à radiação levou a uma maior libertação de DOX nos sistemas da solução I, em relação aos sistemas presentes na solução II. A radiação IV fez com que a temperatura da solução I aumentasse mais depressa e, como consequência, a LCST do PLGA foi atingida em menos tempo.^[28]

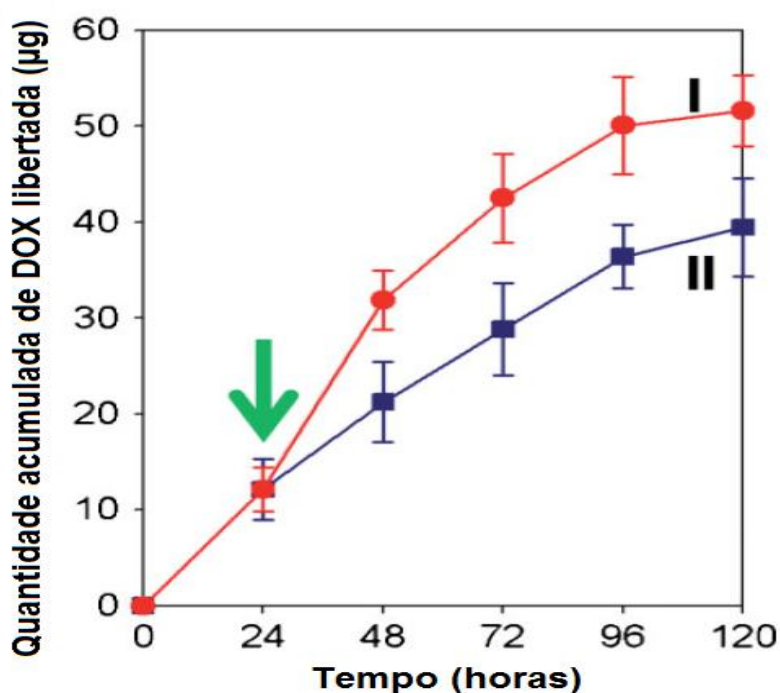


Figura 8. Gráfico da quantidade de DOX libertada pelos sistemas PLGA-DOX com (I) e sem (II) radiação, em função do tempo.^[28]

Para avaliar a eficácia do direcionamento celular dos sistemas para as células de tumores epiteliais, fez-se um ensaio (figura 9) utilizando o PLGA-DOX conjugado com cetuximab (I), tendo como controlo o PLGA-DOX conjugado com um anticorpo irrelevante, a imunoglobulina G (II). Utilizaram-se duas linhas de células: as A431, que expressam uma grande quantidade de EGFR, e as MCF7 que, ao contrário das A431, expressam pouco EGFR. A

análise por citometria de fluxo mostrou que as células A341 exibiram uma intensidade de fluorescência quase seis vezes superior à das células MCF7, resultado que é consonante com a diferença na quantidade de expressão de EGFR nas duas linhas de células. Já os sistemas de controlo com IgG, devido à sua inespecificidade em relação às células cancerígenas, mostraram valores de fluorescência insignificantes.^[28]

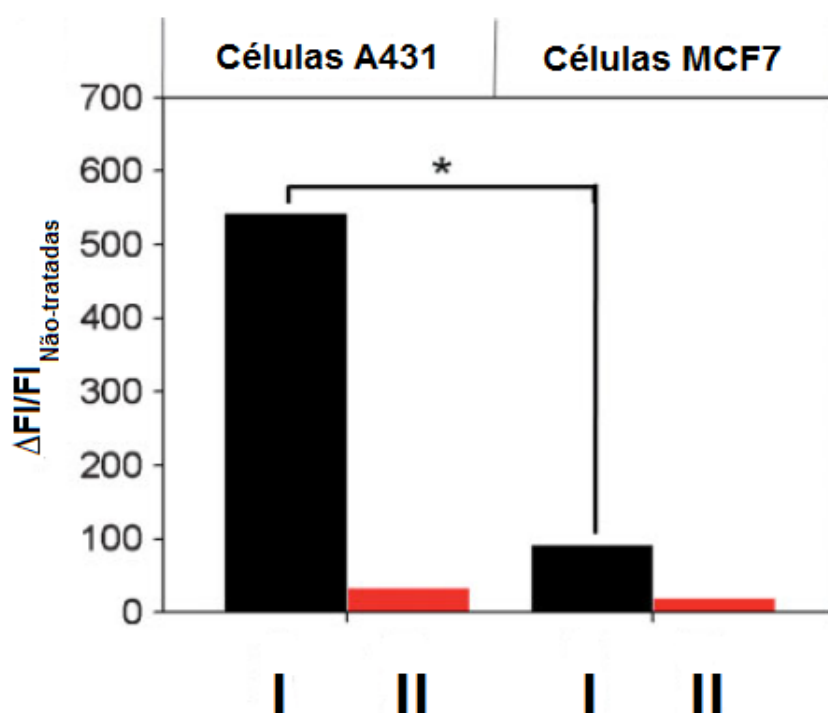


Figura 9. Gráfico da intensidade de fluorescência medida nas células A431 e MCF7 após a administração de sistemas PLGA-DOX-cetuximab (I) e PLGA-DOX-IgG (II).^[28]

Outro estudo utilizou sistemas compostos por ouro e poli(NIPAAm) contendo DOX. O método de atuação deste sistema é bastante semelhante ao do sistema PLGA-DOX e está representado na figura 10. O ouro absorve a radiação NIR e converte-a em calor, que a partir dos 39 °C provocará o colapso das cadeias poliméricas da poli(NIPAAm) que cobrem as placas de ouro. Este colapso irá expor os espaços existentes entre as placas de ouro e por aí se irá libertando a DOX contida no sistema. O fim da exposição à radiação NIR leva a

que a temperatura desça, as cadeias poliméricas regressam à sua conformação natural, os poros voltam a ficar obstruídos e a libertação de DOX cessa. O pico de absorção destes sistemas situa-se nos 354 nm.^[33]

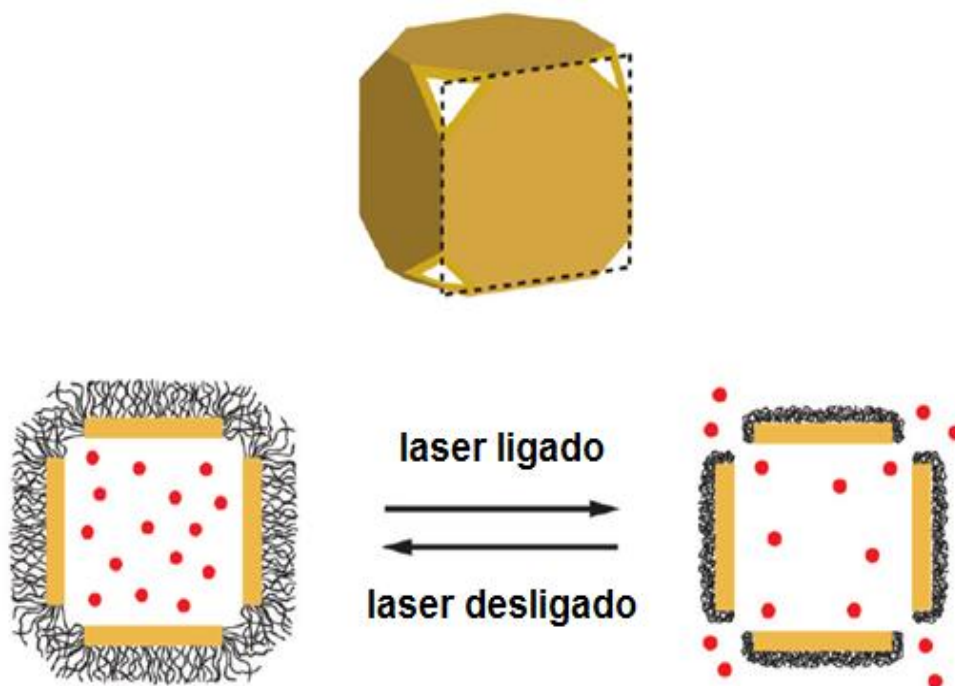


Figura 10. Esquema demonstrativo do processo de libertação de fármaco nos sistemas ouro-poli(NIPAAm) quando expostos à radiação NIR.^[33]

Para testar a capacidade de controlo da libertação de DOX destes sistemas, fez-se um ensaio *in vitro* com células de um tumor mamário. Com o aumento do tempo de irradiação, observou-se um maior número de células tumorais mortas devido à crescente libertação de DOX (figura 11). Em comparação, a irradiação com laser na amostra C-1, com a ausência de ouro na constituição dos sistemas, não teve essencialmente nenhum efeito na viabilidade celular. A irradiação com laser na amostra C-2, com a presença de ouro na estrutura dos sistemas mas sem DOX, elevou a temperatura até aos 45 °C e resultou num leve decréscimo da viabilidade celular. Este decréscimo provavelmente se deveu à ação exclusiva do efeito fototermal.^[33]

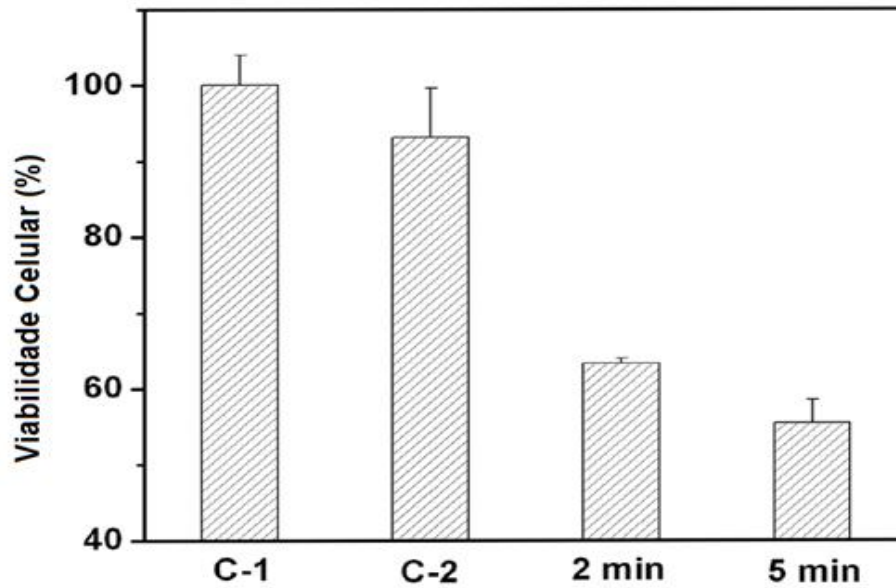


Figura 11. Viabilidade celular de amostras de células de tumor mamário sujeitas a diferentes tratamentos: **(C-1)** células irradiadas com laser NIR durante 2 minutos na presença de sistemas sem ouro; **(C-2)** células irradiadas com laser NIR na presença de sistemas com ouro e sem DOX; **(2/5 min)** células irradiadas com laser NIR durante 2 e 5 minutos na presença de sistemas com ouro e DOX.^[33]

4.3 Sistemas de libertação termossensíveis controlados por *High-intensity Focused Ultrasounds*

Para além de ser um aplicador de hipertermia fototermal, o ouro também pode ser utilizado em conjunto com *smart polymers* termossensíveis na criação de sistemas cuja libertação de fármaco seja controlada pela aplicação de ultrassons de alta intensidade (HIFUs). A utilização de HIFUs tem sido alvo de um grande interesse da investigação médica durante décadas, e o facto de ser uma técnica minimamente invasiva torna-a bastante atractiva para o tratamento do cancro.^[31] Ao contrário das terapias de radiação convencionais, não existe uma dose máxima cumulativa para os ultrassons focalizados, de modo que este tratamento pode ser repetido até o tumor ser destruído. Por causa da acumulação significativa de energia acústica no ponto de aplicação dos HIFUs, a temperatura sobe rapidamente, provocando a necrose das células tumorais

do tecido alvo e permitindo que haja libertação de fármaco na região atingida com efeitos secundários mínimos para os tecidos circundantes. A dose libertada pode ser controlada à distância pela regulação da intensidade dos HIFUs e/ou a duração da exposição.^[31]

Realizou-se um estudo da libertação controlada por HIFUs de sistemas compostos por placas de ouro porosas, cobertas pelo copolímero poli(NIPAAm-co-Aam) e contendo o corante rodamina 6G (R6G) no seu interior. O polímero utilizado tinha uma LCST de 38,5 °C, que se situa entre a temperatura fisiológica (37 °C) e a temperatura de hipertermia (45 °C). A R6G é bastante semelhante à DOX no que concerne ao peso molecular e às cargas da superfície. Como tem um forte pico de absorção nos 527 nm, a libertação da R6G pode ser monitorizada por um espectro UV-vis dos sobrenadantes após a centrifugação das soluções contendo os sistemas. Para carregar o corante, os sistemas foram adicionados a uma solução aquosa de R6G e agitados a 42 °C durante uma noite. Depois, a suspensão foi arrefecida rapidamente com um banho de gelo para que o polímero voltasse à sua conformação inicial, obstruísse os poros das placas de ouro e mantivesse a rodamina dentro dos sistemas.^[31]

Após a medição da absorvância da R6G libertada pelos sistemas quando aquecidos a 40 °C e irradiados pelos HIFUs, determinaram-se as exatas concentrações de R6G libertada em função do tempo através da utilização de uma curva de calibração preparada separadamente para o mesmo corante (figura 12). Houve uma maior libertação de rodamina nos sistemas irradiados, comparativamente aos sistemas que foram aquecidos convencionalmente. A concentração de R6G libertada após 5 minutos de exposição aos HIFUs rondava os 2,15 µM, enquanto que com o aquecimento convencional essa concentração só foi atingida após 20 minutos. Ainda, quando os HIFUs foram utilizados para provocarem a libertação, maior parte da R6G foi libertada ao fim de 10 minutos. A concentração de R6G libertada aumentou apenas 0,1 µM entre os 10 e os 20 minutos, e basicamente não se alterou após os 20 minutos. A maior libertação de rodamina dos sistemas irradiados deve-se ao facto de os HIFUs gerarem mais calor que as técnicas de aquecimento convencionais, e assim o copolímero mantém-se contraído

durante mais tempo, conservando os poros entre as placas de ouro desobstruídas ao longo de um maior período de tempo e, conseqüentemente, libertando mais R6G.^[31]

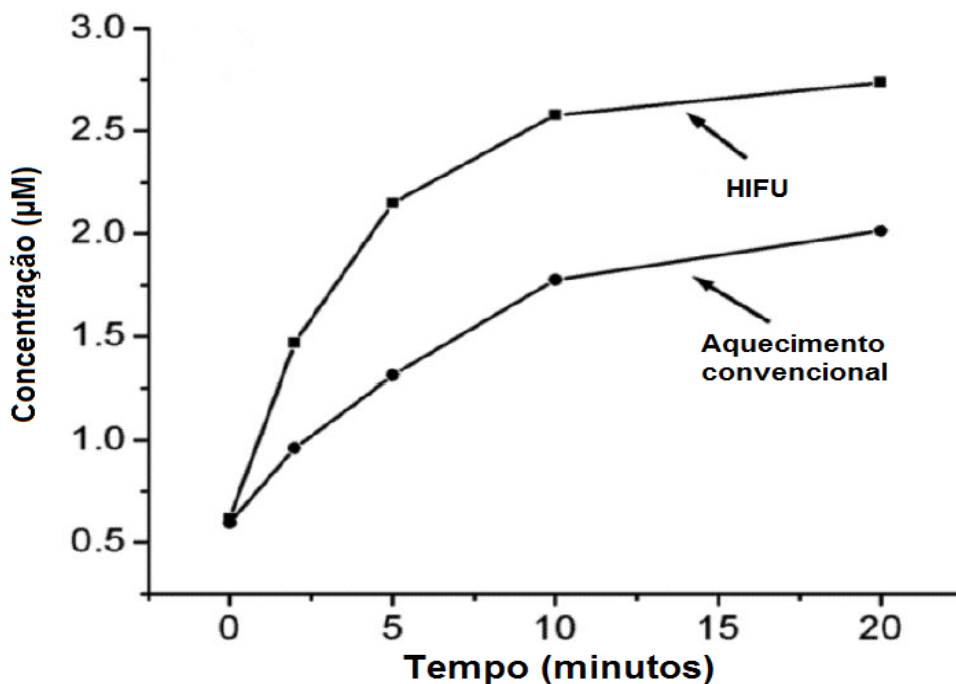


Figura 12. Gráfico da concentração de R6G libertada pelos sistemas aquecidos convencionalmente e irradiados com HIFUs, em função do tempo.^[31]

A precisão da libertação destes sistemas foi avaliada através da utilização de uma solução constituída por gelatina e sistemas carregados com R6G. Esta mistura foi colocada em caixas de Petri para formar uma camada de gelatina uniforme com tom azul-escuro, cor atribuída pela presença dos sistemas.^[31] A figura 13A mostra uma imagem de microscopia de fluorescência de uma camada de gelatina antes de ser irradiada e que serviu como controlo. A rodamina encapsulada não fluoresceu devido ao efeito de extinção das placas de ouro envolventes. As figuras 13B e 13C mostram duas imagens de microscopia de fluorescência das camadas de gelatina após a exposição focalizada de HIFUs de 10 W durante 2 e 20 minutos, respetivamente. Pode-se observar que apenas uma pequena área à volta do ponto de aplicação dos

ultrassons apresentou libertação da R6G. A intensidade da fluorescência do corante libertado foi maior ao fim de 20 minutos, como era esperado. O padrão de libertação da rodamina em cada imagem foi quase circular, sugerindo a ocorrência de difusão da R6G e a dissipação de calor a partir do ponto de aplicação dos HIFUs. A figura 13D mostra a média de intensidade de fluorescência da R6G em função do tempo, e utilizando HIFUs de 6, 8 e 10 W. Os dados foram calculados a partir das imagens de fluorescência. A fluorescência da imagem 13A foi considerada como padrão, e a intensidade de fluorescência das outras imagens foi obtida eliminando a fluorescência padrão e fazendo uma estimativa em relação à fluorescência dos píxeis restantes. A intensidade da fluorescência aumentou com a duração do tempo de exposição aos HIFUs e, para os mesmos tempos de exposição, a intensidade da fluorescência cresceu com o aumento da potência dos ultrassons.^[31]

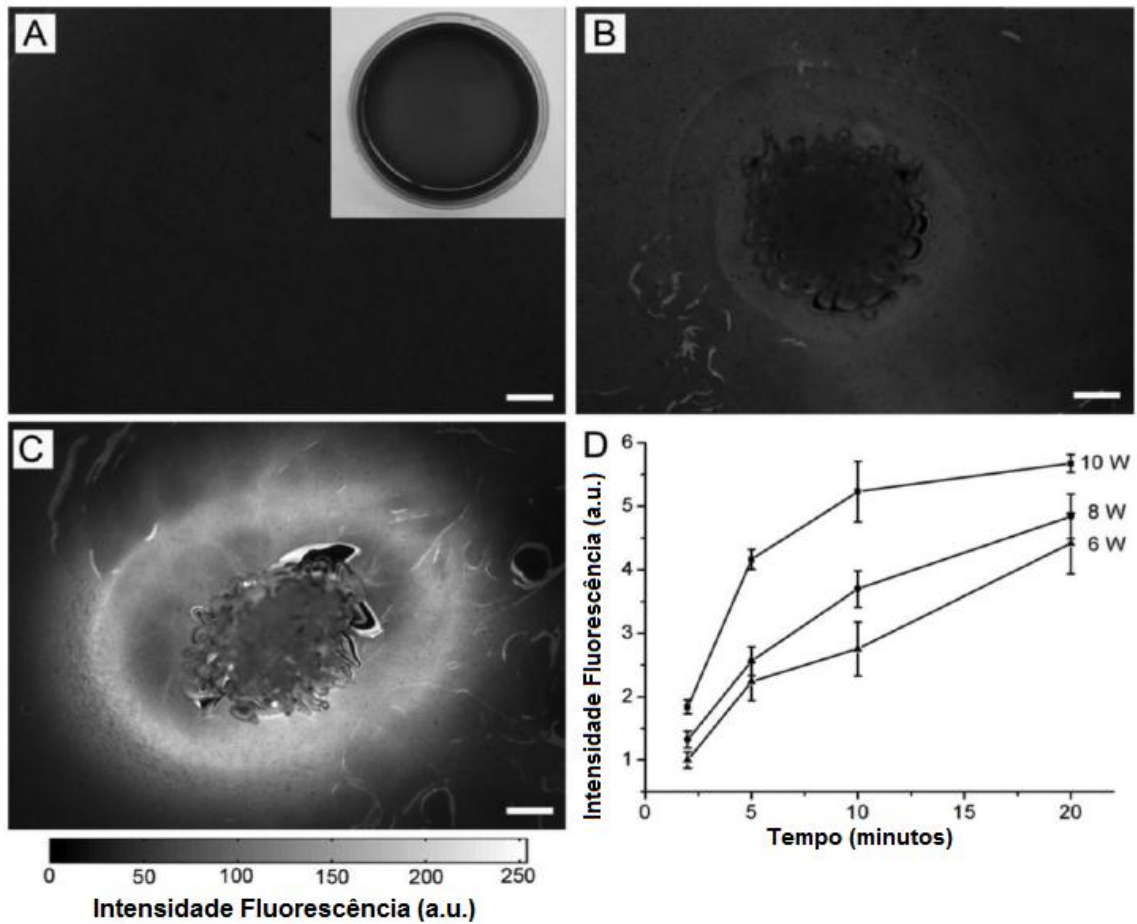


Figura 13. Imagens de microscopia de fluorescência da mistura de gelatina com sistemas carregados com R6G antes (A) e depois (B,C) da exposição a HIFUs a uma potência de 10 W durante 2 e 20 minutos, respectivamente. A barra de escala corresponde a 500 μm e aplica-se a todas as imagens. (D) Gráfico da média de intensidade de fluorescência da R6G libertada em função do tempo, calculada através de imagens de fluorescência da gelatina após exposição a HIFUs durante diferentes períodos de tempo (2, 5, 10 e 20 minutos) e com diferentes potências (6, 8 e 10 W).^[31]

5. Sistemas de libertação auto-regulados: *smart polymers* sensíveis ao pH

Smart polymers sensíveis ao pH são usados para produzir sistemas libertadores de fármaco que são estáveis quando se encontram em circulação ou nos tecidos normais, mas que se degradam e libertam o fármaco em tecidos com pH mais ácido, como os tumores. Num indivíduo saudável, o pH corporal é mantido em torno de 7,4. No entanto, existem diversos mecanismos capazes de modular o pH do corpo, desde a acidificação do trato gastrointestinal até à ação catalítica dos lisossomas e endossomas ao nível celular.^[27]

Comparativamente com as células saudáveis, o meio extracelular das células cancerígenas é geralmente mais ácido. Esta acidez deve-se às grandes necessidades energéticas das células cancerígenas e à já referida circulação sanguínea nos tumores, que é, por regra, desigual e com baixa pressão sanguínea. A má circulação leva a que o fornecimento de oxigénio para as células tumorais seja baixo e, conseqüentemente, obriga a que estas células recorram mais regularmente à fermentação láctica para a produção de energia. O ácido láctico produzido dissocia-se em H^+ e ião lactato, e o H^+ é bombeado em grandes quantidades para o meio extracelular. A circulação lenta acaba também por favorecer a acumulação dos metabolitos ácidos no exterior das células tumorais. Todos estes fatores levam a que o pH do meio extracelular nos tumores varie entre os 5,7 e os 7,8, enquanto que o pH celular médio do corpo humano se fixa nos 7,4.^[27,34,35,36]

Os *smart polymers* sensíveis ao pH utilizados no tratamento do cancro devem ter uma estreita faixa de valores de pH que suscite as alterações das suas propriedades físicas. Caso contrário, esses mesmos polímeros podem induzir toxicidade severa causada pela libertação excessiva e deslocalizada do fármaco, ou invalidarem a eficácia da terapêutica por não serem capazes de libertar a quantidade certa de fármaco no tecido alvo.^[27] Neste género de sistemas é usual o fármaco estar contido numa micela. As micelas têm propriedades fusogénicas que lhes conferem a capacidade de se fundirem com

a membrana endossomal quando expostas ao pH baixo, e assim aceder ao citoplasma mais facilmente. Este fenómeno tornou-se um pretendido meio de libertação intracelular após o estudo de vários vírus que aproveitavam a acidez dos endossomas para infetar células. No lugar das micelas podem também ser utilizados lipossomas. Contudo, a maioria dos fármacos antineoplásicos são hidrofóbicos e assim ficam melhor solubilizados no interior das micelas, que também é hidrofóbico. Os lipossomas são preferencialmente usados no transporte de fármacos hidrofílicos, como proteínas, péptidos e ácidos nucleicos.^[12,17,19,36]

5.1 Estratégias de atribuição de sensibilidade ao pH a sistemas de libertação de fármaco

Existem duas estratégias regularmente usadas para conferir sensibilidade ao pH a um sistema de libertação de fármaco. A primeira passa por utilizar um polímero que crie uma ligação lábil em meio ácido com o fármaco ou a micela que o contém, a outra é uma estratégia não-covalente envolvendo *smart polymers* suscetíveis de serem protonados. A sensibilidade ao pH pode resultar da criação de uma ligação polímero-fármaco facilmente quebrável quando exposta à acidez característica do meio extracelular tumoral. Esta rutura cria uma modificação covalente no sistema que leva a uma grande libertação do agente terapêutico. A principal desvantagem deste método é o requerimento de grupos funcionais no fármaco que possam ser covalentemente modificados, o que limita o alcance deste método já que nem todos os fármacos se conseguem conjugar desta forma com o polímero.^[35] As utilizações mais eficazes das ligações lábeis em meio ácido têm sido na conjugação direta da DOX com ácido poliláctico (PLA) através de hidrazonas ou cis-acotinil. As ligações de cis-acotinil libertam dez vezes mais fármaco em pH 5.0 comparativamente com o pH 7.0, enquanto que no caso das ligações de hidrazona esse aumento apenas é quadruplicado. No entanto, a quebra do cis-acotinil pode alterar quimicamente o fármaco, enquanto que a hidrazona se degrada completamente e liberta o fármaco sem o modificar. Posteriormente tomou-se uma nova abordagem que consistiu na conjugação de DOX com um

copolímero de PEG-poliaspartato (PEG-pAsp) através de ligações hidrazona. O copolímero em si é hidrofílico, mas a ligação da DOX aos grupos aspartato induz hidrofobicidade nos segmentos pAsp. Estes sistemas praticamente não libertaram DOX a pH 7.0, mas após 48h em solução a pH 5.5 libertaram 25% do fármaco. A pH 3.0 observou-se através de HPLC uma libertação quase completa da DOX. Estudos de biodistribuição mostraram que embora somente 2% do fármaco livre se deposita no tumor, a encapsulação da DOX numa micela aumentou este valor para 10%. O uso de micelas favoreceu também a tolerância para com o fármaco, que passou de 15mg/kg para 40mg/kg.^[35]

O outro método mais frequentemente utilizado para conferir sensibilidade ao pH consiste na presença de grupos ionizáveis dentro do polímero que alterem a sua conformação ao serem protonados. Este fenómeno ocorre quando estes grupos são expostos a valores de pH abaixo do seu pK_a . Os grupos ionizáveis mais utilizados nesta estratégia são o ácido carboxílico, amina, azo-compostos, ácido fenilborónico, imidazol, piridina, sulfonamida ou tiol. A protonação destes grupos leva à entrada no sistema de contra-íões que irão neutralizar a carga do polímero, gerando-se assim um gradiente osmótico que favorece a entrada quase simultânea de moléculas de água para o interior do sistema. Este aumento do volume hidrodinâmico, juntamente com as forças eletrostáticas repulsivas entre as cadeias ionizadas do polímero, leva à expansão do polímero e à gradual passagem do fármaco para o meio exterior. Se na altura da protonação o sistema se encontrar dentro de uma vesícula endossomal, a expansão do polímero poderá romper o endossoma e lançar o fármaco no citoplasma antes deste ser degradado pela acidez endossomal.^[27,37,38] Este facto, juntamente com as propriedades fusogénicas das micelas, reduzem a probabilidade de contacto do fármaco com as P-gp e assim possibilitam o contornar dos mecanismos de MDR das células tumorais. Muitos dos agentes antitumorais perdem a sua eficácia devido ao efeito MDR nas células tumorais. Além disso, a libertação prematura do fármaco no sangue pode levar à ocorrência de efeitos colaterais e compromete a sua concentração nos tecidos alvos. Após a identificação das P-gp como sendo a principal causa dos efeitos de MDR nas células *in vitro* e da descoberta do verapamil como inibidor das P-gp, vários esforços têm sido feitos na pesquisa de moduladores

da atividade das P-gp que tenham grande afinidade mas sem desregularem as funções biológicas. Vários reguladores das P-gp têm sido sintetizados através da modificação química de outros fármacos, como o já referido verapamil, a ciclosporina A e a glibenclamida. Contudo, o efeito MDR é multifacetado e a inibição das P-gp por si só não é tão efetiva quanto o previsto. Como alternativa aos moduladores da P-gp, tem-se estudado a utilização destes sistemas compostos por micelas e *smart polymers* sensíveis ao pH endossomal, que se têm mostrado eficientes no tratamento de células tumorais com MDR. A sensibilidade ao pH endossomal e atividade de escape endossomal do polímero permite a libertação do agente quimioterapêutico no citoplasma, fugindo assim aos mecanismos de sequestração das células com MDR. Estes sistemas demonstraram ter um nível de citotoxicidade contra as células MDR similar à citotoxicidade da DOX livre contra as células tumorais sem MDR.^[37, 39]

Um dos *smart polymers* utilizado no design de sistemas micelares com sensibilidade ao pH endossomal é a poli(NIPAAm). Apesar de a poli(NIPAAm) ser mais conhecida pela sua termossensibilidade, a incorporação de grupos hidrofóbicos na sua cadeia, como o ácido undecanóico, alteram a sua LCST ao ponto de lhe conferirem sensibilidade à acidez. A pH fisiológico, o ácido undecanóico é desprotonado e a LCST do polímero resultante atinge um valor próximo dos 38 °C, ficando assim acima da temperatura corporal. Contudo, a pH 4.5 o ácido é neutralizado e a LCST da poli(NIPAAm) baixa para os 29 °C, tornando-a hidrofóbica quando exposta à acidez endossomal. Micelas poliméricas contendo DOX foram testadas e libertaram três vezes mais fármaco quando expostas a pH 6.6, comparativamente com o pH fisiológico.^[35]

5.2 Sistemas de libertação de fármaco com sensibilidade ao pH de duplo direcionamento

Numa tentativa de contornar simultaneamente os obstáculos à libertação localizada dos fármacos, provocados pela MDR e pela heterogeneidade dos tumores, nos últimos tempos tem-se procurado criar sistemas de libertação que interajam com o baixo pH extracelular característico dos tumores, e que sejam

também capazes de romper os endossomas e lançar o fármaco no citoplasma. Este interesse levou ao desenho de sistemas de duplo direcionamento, que são micelas poliméricas com ligandos em que o posicionamento destes últimos na superfície do sistema seja controlado pelo pH do meio.^[12, 39]

Na figura 14 está representado um exemplo de um mecanismo de atuação dos sistemas de libertação sensíveis ao pH de duplo direcionamento. O sistema (1) é composto por uma micela (ou lipossoma) com *smart polymers* sensíveis ao pH na sua estrutura e contendo o fármaco no seu interior (2). Na superfície do sistema estão presentes os ligandos (3), que permitem a sua conexão às células, e uma camada de polímeros (4) que estão unidos ao resto do sistema por ligações sensíveis ao pH extracelular tumoral (5). Enquanto está em circulação, os ligandos estão estericamente protegidos pelas cadeias poliméricas e o sistema com o tempo vai se depositando no tumor devido ao efeito de EPR. Dentro do tumor, o baixo pH provoca o destacamento dos polímeros e expõe os ligandos, que se vão conectar às células tumorais e possibilitar a entrada do lipossoma por endocitose. Já dentro da célula, a acidez do endossoma irá destabilizar a membrana da micela ou do lipossoma e o fármaco será lançado directamente para o citoplasma.^[17,19]

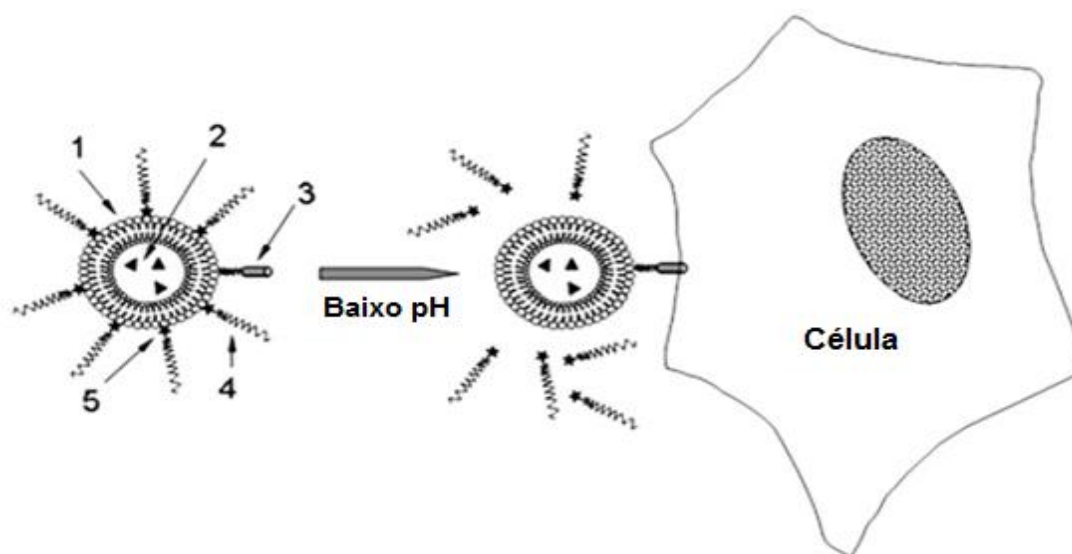


Figura 14. Esquema de representação da ligação às células alvo dos sistemas poliméricos de libertação sensíveis ao pH de duplo direcionamento.^[17]

Um estudo testou a afinidade para com as células cancerígenas e a capacidade antitumoral de sistemas sensíveis ao pH de duplo direcionamento. Os sistemas consistiam numa micela envolta em duas cadeias poliméricas: uma constituída por poli(L-histidina) (poliHis) ligada a PEG e outra composta por PLA-*b*-PEG-*b*-poliHis-biotina (figura 15). O bloco de poliHis mais curto desta última cadeia está localizado entre o núcleo hidrofóbico do PLA/poliHis e a camada hidrofílica de PEG devido ao facto de estar ligado à biotina que, tal como a camada de PEG, é hidrofílica. Isto faz com que o PEG ligado ao bloco curto de poliHis se encontre fletido e a biotina permaneça debaixo de camada de PEG. Como resultado, a micela mantém-se estável acima do pH 7.2 e com a biotina encoberta.^[12, 39] Contudo, à medida que o pH vai baixando a partir dos 7.2, a poliHis vai se ionizando. Devido à sua maior exposição, o bloco curto de poliHis é o primeiro a ionizar-se e a sua ionização vai enfraquecendo a sua interação hidrofóbica com o núcleo do sistema. Este enfraquecimento leva a que a cadeia PEG-*b*-poliHis-biotina se expanda, expondo a biotina fora da camada de PEG. O pH 7.0 parece ser o ponto crítico para esta expansão, como ficou demonstrado pela turvação pH-dependente de uma solução contendo este sistema e avidina, que é uma proteína tetramérica com quatro locais onde a biotina se pode ligar. Com a diminuição do pH da solução, a transparência relativa da solução vai se reduzindo gradualmente até aos 10% num intervalo de pH entre 6.0 e 6.8. Este fenómeno é atribuído à ionização da poliHis do núcleo e subsequente destabilização da membrana da micela causada pela saída do seu interior da poliHis ionizada. Em suma, quando o pH do meio é ligeiramente inferior a 7.4, como no caso do pH extracelular tumoral, a biotina é exposta à superfície micelar e pode interagir com as células, o que facilita a endocitose mediada pelos recetores da biotina. Quando o sistema se encontra numa vesícula endossomal, em que o pH é inferior a 6.5, a micela destabiliza e provoca a disrupção da membrana endossomal, seguindo-se uma elevada libertação de fármaco diretamente no citoplasma.^[12, 39]

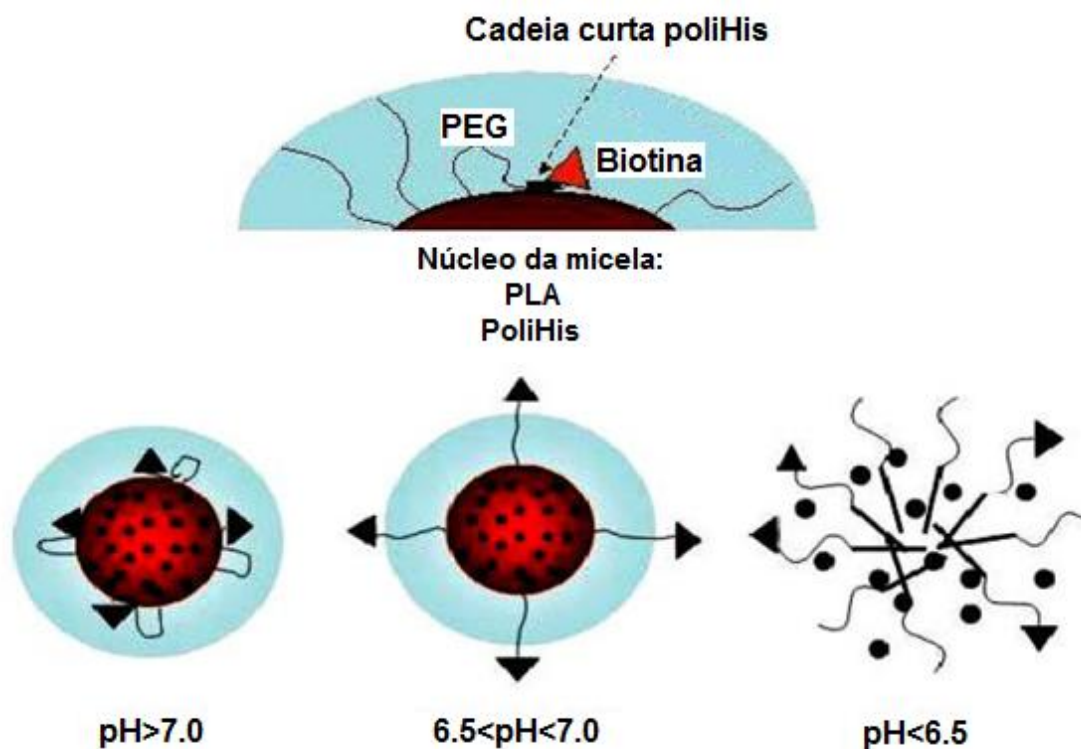


Figura 15. Diagrama esquemático representando o conceito central do posicionamento da biotina no sistema, em função do pH do meio.^[39]

Após comprovar a viabilidade destes sistemas, substituiu-se a biotina pelo gene Trans-Ativador da Transcriptase do HIV (TAT). O TAT é um péptido de penetração celular não-específica que tem uma forte capacidade de translocar micelas poliméricas para o interior das células. Na figura 16 está representada a percentagem de micelas poliméricas-TAT captadas por células da linhagem MCF-7 provenientes de um tumor mamário em função do tempo. A pH 7.0 a captação destes sistemas mostrou um aumento de trinta vezes em comparação com a percentagem de captação observada a pH 7.4, o que provavelmente se deve à expressão parcial do TAT na superfície micelar. A pH 6.8 esse aumento foi setenta vezes maior, o que indica que o TAT exposto na superfície micelar interagiu com as células. Estes sistemas provaram ser bastante efetivos para vários tumores sólidos, incluindo os que são resistentes aos fármacos, e prevê-se que venham a substituir as tecnologias de direcionamento da libertação de fármaco à base de anticorpos e outros ligandos.^[12, 39]

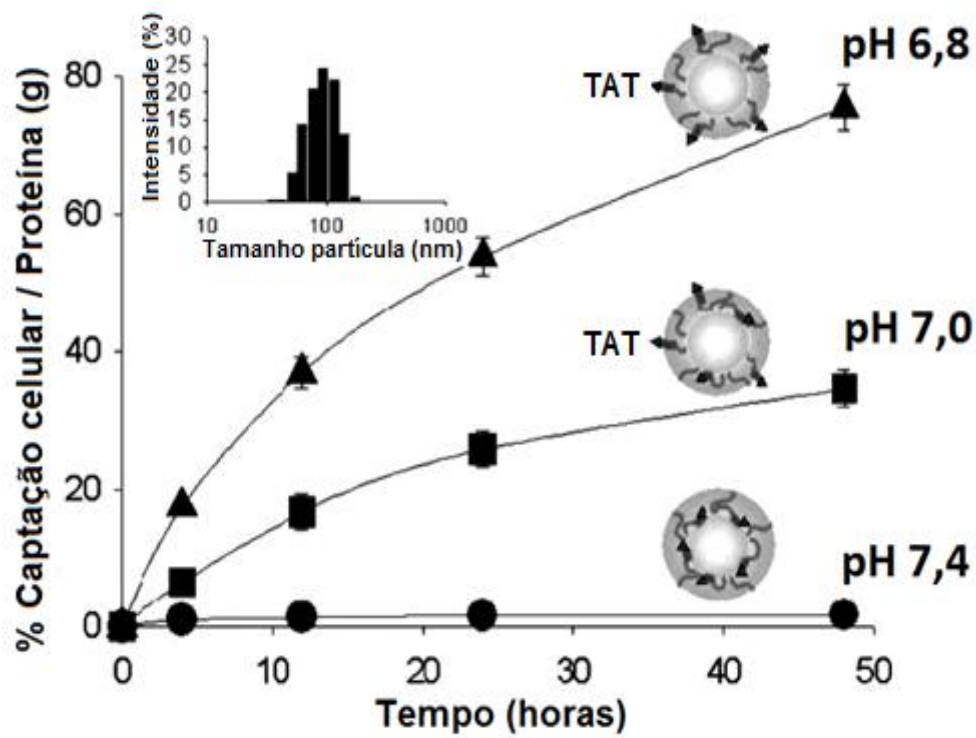


Figura 16. Gráfico da porcentagem de captação celular das micelas poliméricas-TAT a diferentes pHs, em função do tempo.^[39]

6. Terapia génica: utilização de *smart polymers* no fabrico de vetores

A terapia génica tornou-se uma técnica promissora no tratamento do cancro. Define-se como sendo a técnica que visa curar doenças genéticas fornecendo ao doente uma cópia correta do gene defeituoso ou incorporando material genético que reduza a sua expressão. Doenças genéticas humanas resultam de mutações ou deleções de genes que levam à diminuição das vias metabólicas normais, desajuste dos ciclos celulares ou disfunções ligando/recetor. A ideia de adicionar a sequência de genes correta a células mutadas é viável e pode potencialmente levar à cura da doença.^[40,41]

As células cancerígenas são resistentes à apoptose e continuam a multiplicar-se de uma forma desregulada. Esta desregulação deve-se a mutações no DNA, superexpressão de genes codificantes de proteínas que promovem o crescimento celular, ou decréscimo da expressão dos genes que codificam proteínas que controlam e inibem esse mesmo crescimento. Os tratamentos antineoplásicos convencionais (cirurgia, quimioterapia, radioterapia) têm as suas vantagens mas também possuem desvantagens, como a limitada especificidade, a ocorrência de efeitos secundários e o risco de recidivas devido à erradicação incompleta do cancro. Estas limitações demonstraram a importância de desenvolver terapias alternativas que sejam efetivas, específicas e com o mínimo de reações adversas.^[40]

As terapêuticas que incluem ácidos nucleicos são de difícil execução devido à biodegradação que os mesmos enfrentam até chegarem ao seu alvo. Torna-se assim necessária a utilização de vetores que façam o transporte intracelular e direcionado da informação genética. Um vetor ideal deve manter a estabilidade dos ácidos nucleicos, deve ser capaz de libertar a sua carga genética nas células-alvo com grande especificidade e eficácia e a sua administração repetida deverá ter o mínimo de toxicidade.^[40,41]

6.1 Vetores genéticos virais e sintéticos: vantagens e desvantagens

Os primeiros ensaios no âmbito da terapia génica utilizaram vetores virais como transportadores dos transgenes. Os vírus são vetores genéticos bastante eficazes. Vários tipos de vírus têm a capacidade de encontrar determinadas populações de células, ou mesmo alguns bioligandos podem ser anexados às suas superfícies para uma libertação mais específica e eficaz. Os vírus têm desenvolvido um particular conjunto de processos para a distribuição do DNA nas células e até mesmo nos seus núcleos. No entanto, a morte de um paciente tratado com este tipo de vetores levantou sérias preocupações em relação à sua segurança e levou a reconsiderações quanto ao seu uso em ensaios clínicos nos humanos. Um dos fatores de risco dos vetores virais é o facto de por vezes integrarem o seu DNA no genoma do hospedeiro, alterando-o permanentemente. Isto pode levar à ativação de oncogenes ou à inativação de genes supressores de tumores. Os vetores virais são também limitados no tamanho da sua carga genética, têm altos custos de produção e um perfil de toxicidade inerente que pode levar à inflamação e imunogenicidade. Face a estas condicionantes, a utilização de materiais sintéticos na construção de vetores genéticos foi ganhando força. Os vetores sintéticos atualmente disponíveis são menos eficientes no transporte de genes do que os vetores virais. Por outro lado, têm uma relativa baixa imunogenicidade, menores custos de produção e podem ser facilmente moldados. Estas características levam a que os vetores sintéticos sejam encarados como boas alternativas para a terapia génica.^[40]

Os vetores sintéticos podem ser formulados a partir da conjugação de ácidos nucleicos (geralmente DNA plasmídico (pDNA) ou RNA de interferência (iRNA)) com lípidos catiónicos, formando lipoplexos, ou com polímeros catiónicos, formando poliplexos. Os radicais carregados positivamente do vetor sintético interagem com os grupos fosfato carregados negativamente do material genético, resultando na formação de poliplexos carregados positivamente (figura 17). A conjugação com ligandos reduz a possibilidade dos poliplexos interagirem com outras células que não sejam células-alvo.^[40] O pDNA é empregue quando se pretende a substituição de um gene considerado defeitoso por um outro que funcione corretamente. Já o iRNA é utilizado na

supressão da expressão de um determinado gene que, por exemplo, promova o crescimento tumoral ou o desenvolvimento de metástases. Resulta da ação catalítica da enzima *Dicer* sobre o RNA de dupla fita (dsRNA, *double-stranded RNA*) e é responsável pela ativação do complexo ribonucleoproteico *RNA-induced silence complex* (RISC). O RISC depois liga-se ao RNA mensageiro (mRNA) análogo ao iRNA e procede à sua clivagem, produzindo duas moléculas de mRNA diferentes da original. (figura 18).^[42, 43]

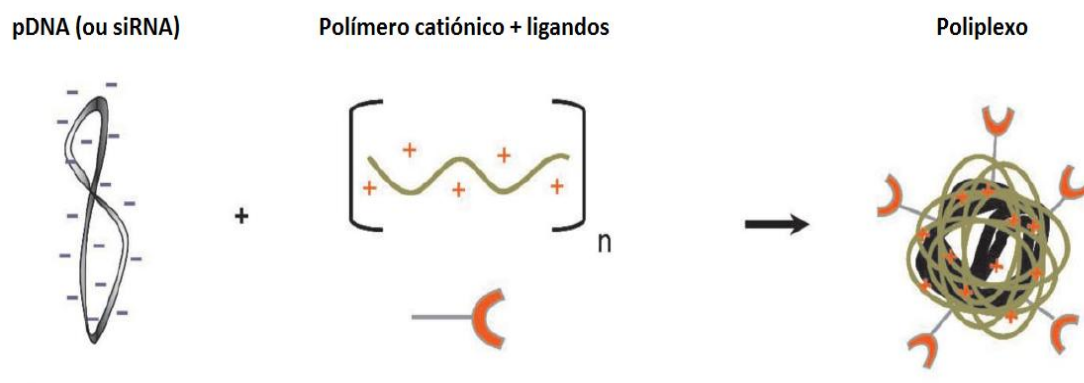


Figura 17. Esquema do processo de formação de poliplexos.^[40]

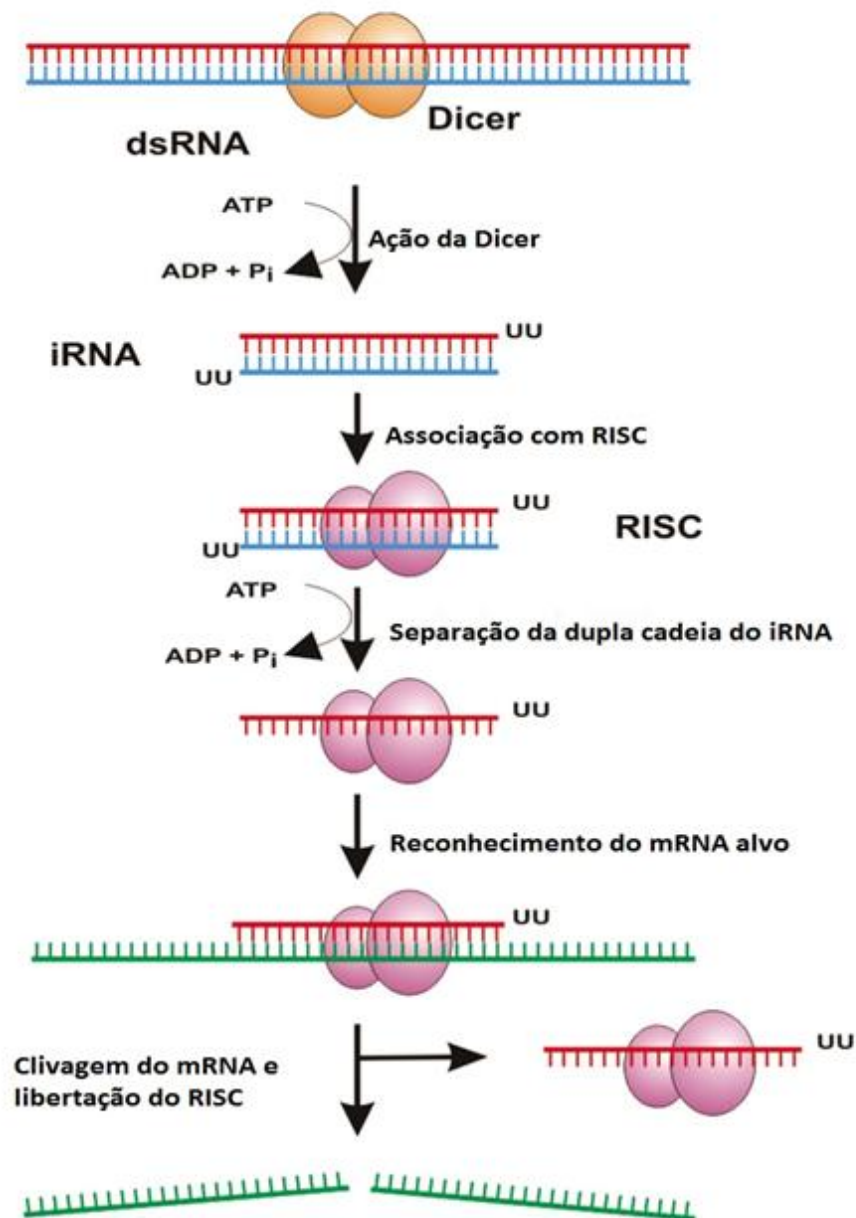


Figura 18. Mecanismo de ação do iRNA na supressão da expressão genética.^[44]

O mecanismo de ação dos poliplexos é feito por várias etapas. O facto de estarem carregados positivamente faz com que sejam atraídos eletrostaticamente pela superfície celular carregada negativamente, que é constituída por moléculas como proteoglicanos, e entram na célula por endocitose, fagocitose ou pinocitose. A interação destes complexos com a superfície celular e a entrada nas células são as primeiras barreiras que têm de

ser superadas. Depois, os poliplexos precisam de ser libertados pelos endossomas, devem migrar em direção ao núcleo e o DNA libertado intracelularmente deve penetrar a membrana nuclear e atingir o núcleo, onde será transcrito. Na figura 19 está representado um esquema que ilustra os processos celulares que envolvem os poliplexos, desde a entrada do complexo na célula à chegada do material genético ao núcleo.^[40]

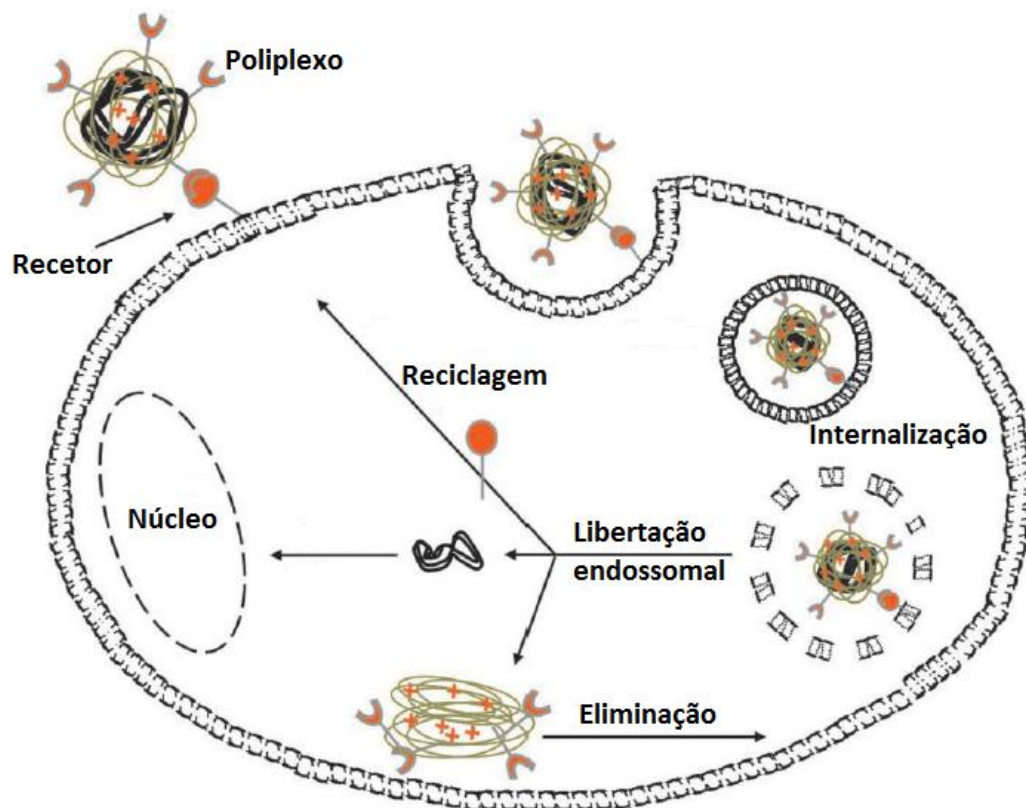


Figura 19. Esquema da entrada e processamento celular dos poliplexos.^[40]

A administração de poliplexos pode ser feita por via tópica ou por via sistémica. A aplicação tópica está limitada a apenas alguns tipos de tumores, como os melanomas. Já a administração sistémica de genes é vista como sendo mais eficiente, mas neste tipo de administração os complexos têm de resistir às condicionantes da circulação sanguínea. O tamanho das partículas pode contribuir para o sucesso da distribuição dos complexos, especialmente nos casos de circulação sanguínea de longa duração. Os complexos não

devem interagir com os componentes do sangue e devem manter-se estáveis sob condições fisiológicas. Também deve ser tido em conta a probabilidade de os políplexos interagirem com componentes da matriz extracelular ou com material celular necrótico, o que se pode traduzir numa diminuição da eficácia da transfeção.^[40]

Uma das limitações dos vetores sintéticos (como os políplexos) é a sua toxicidade, e por isso uma grande parte do estudo destes vetores tem como finalidade o desenvolvimento de transportadores cada vez menos tóxicos. Outra questão importante na arquitetura dos vetores sintéticos é a absoluta necessidade de estes libertarem com segurança o seu conteúdo no citoplasma. Os políplexos têm uma elevada eficácia nos processos de entrada na célula e de libertação endossomal, devido à sua estrutura que comprime o pDNA e forma complexos pequenos e compactos. No entanto, isto torna-se uma desvantagem na etapa seguinte, em que o vetor deve libertar o material genético no citoplasma para que a transcrição e a expressão dos genes se inicie. Estudos demonstraram que é praticamente impossível que um vetor se conjugue com material genético formando um complexo que seja coeso, e ao mesmo tempo, fácil de dissociar. Contudo, este modelo pode ser conseguido utilizando vetores que possuam simultaneamente duas funções contrárias: a formação de complexos que evitem a degradação do material genético e que confirmam uma elevada taxa de entrada na célula, e a capacidade de responderem à introdução de um determinado estímulo que irá maximizar a dissociação do complexo e a libertação do material genético. Para isso é necessária a utilização de materiais estímulo-sensíveis na construção dos vetores, como os *smart polymers*.^[41]

Um dos primeiros *smart polymers* a ser utilizado na terapia génica foi a poli(L-lisina) e os seus análogos poli(α -[4-aminobutil]-L-glicolato) (PAGA) e éster de poli(4-hidroxi)-L-prolina. A arquitetura destes polímeros é composta maioritariamente por ligações hidrolisáveis que podem ser quebradas por ação enzimática ou química, o que os torna facilmente degradáveis e contribui para a sua relativa baixa citotoxicidade. No entanto, estes compostos apresentam baixos níveis de transfeção que resultam da sua célere hidrolização, seguida de uma rápida remoção da circulação sanguínea. Devido a este motivo,

depressa se procurou o desenvolvimento de um outro vetor não-viral que fosse mais eficiente na transfeção. Uma das soluções encontradas foi a polietilenoimina (PEI) que, devido às suas características únicas, se tornou no polímero mais estudado e utilizado no âmbito da terapia génica.^[40, 45]

6.2 A polietilenoimina no fabrico de vetores genéticos

A PEI é solúvel em água e a sua estrutura pode ser ramificada ou linear (figura 20). Dado o sucesso nos estudos de transfeção, a PEI ramificada é a forma padrão da PEI utilizada em terapia génica. Esta consiste em três subunidades: uma unidade dendrítica, duas unidades lineares e uma unidade terminal, e cada uma destas subunidades consiste numa amina primária, secundária ou terciária ligada a um grupo etileno. Desde o primeiro relato da utilização da PEI como vetor não-viral que têm existido várias pesquisas focadas nos diferentes aspetos dos sistemas com PEI, como a sua qualidade de agente tamponante, peso molecular, ramificação e as suas alterações estruturais provocadas por determinadas reações. Já existe uma considerável variedade de vetores com PEI disponíveis comercialmente, o que torna a PEI num material barato para a realização de estudos genéticos.^[45]

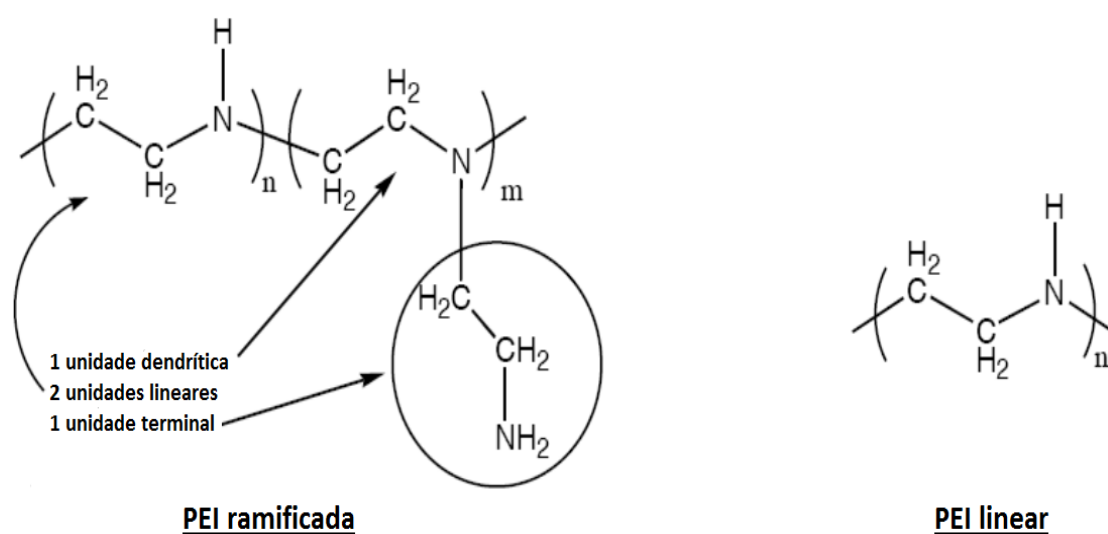


Figura 20. Estrutura da PEI ramificada e linear.^[45]

A presença de grupos amino na estrutura da PEI conferem-lhe uma elevada densidade de carga catiónica, que por sua vez leva a que este polímero tenha uma elevada afinidade para com as cargas negativas do material genético. As cargas catiónicas também se refletem na vasta gama de valores de pK_a e, conseqüentemente, na notável capacidade de tamponamento que a PEI possui. Esta capacidade tamponante faz com que a PEI liberte o material genético quando exposta a meios ácidos, como o interior dos endossomas. Os seus grupos amino atuam como “esponjas” de prótons dentro da vesícula endossomal, levando a uma dilatação osmótica que romperá a membrana endossomal e lançará o material genético no citoplasma. A destruição da membrana endossomal também se deve à interação direta entre as cargas positivas da PEI e as cargas negativas da membrana. A elevada densidade catiónica é igualmente responsável pelo perfil tóxico da PEI, pois as cargas positivas podem causar a sua agregação e reações inespecíficas com componentes do sangue. Outra desvantagem da PEI é a sua difícil eliminação e metabolização. Tudo isto pode levar a uma indesejada acumulação dos poliplexos no interior dos órgãos.^[40,45]

A toxicidade da PEI foi um dos motivos que levou à realização de um estudo que sintetizou um poliplexo resultante da conjugação de PEI com PEG com o objetivo de avaliar a sua eficácia de transfeção de iRNA da glicoproteína CD44v6. A CD44v6 é uma isoforma da glicoproteína recetora do hialuronato CD44, e tem um papel importante na progressão do tumor e das metástases do cancro gástrico. A adição de PEG aumenta a solubilidade dos poliplexos contendo PEI e diminui a sua interação com as proteínas plasmáticas, sem alterar a eficácia de transfeção da PEI.^[46]

O primeiro teste realizado foi a avaliação da citotoxicidade dos poliplexos PEG-PEI, comparativamente com poliplexos contendo apenas PEI. Para este efeito, incubaram-se células SGC7901 em diferentes concentrações de PEG-PEI e PEI durante 48 horas, e mediu-se a viabilidade celular através de um ensaio de redução de MTT. Este método avalia a atividade metabólica das células quantificando a redução metabólica do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, no que resulta a produção de cristais de formazano, intensamente

coloridos, no interior das células. Estes foram depois extraídos e dissolvidos com dimetilsulfóxido (DMSO), o que permitiu a sua quantificação através de espectrofotometria. Células incubadas sem qualquer tratamento foram consideradas como grupo controlo e os seus valores de viabilidade celular foram estabelecidos como sendo 100%. Na figura 21 está representado um gráfico que relaciona a citotoxicidade de cada poliplexo em função da sua concentração. Até à concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, a viabilidade das células tratadas com poliplexos PEG-PEI foi sempre superior aos valores de viabilidade celular dos poliplexos PEI, o que significa que os poliplexos PEG-PEI são menos citotóxicos que os poliplexos contendo apenas PEI.^[46]

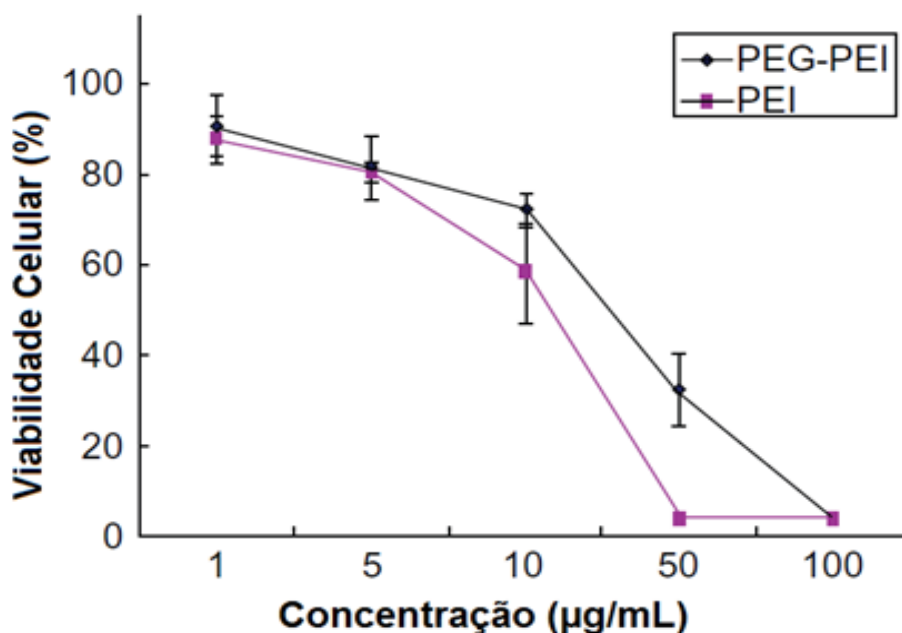


Figura 21. Gráfico da viabilidade celular das células SGC7901 tratadas com os poliplexos PEG-PEI e PEI, em função da concentração de poliplexo.^[46]

Posteriormente fez-se um ensaio de transfeção *in vitro*, cujos resultados estão dispostos na figura 22. Utilizou-se iRNA marcado com carboxifluoresceína na formação dos poliplexos, e a eficácia de transfeção foi avaliada recorrendo a um microscópio de fluorescência e a uma citometria de fluxo em células SGC7901. Poliplexos de PEI e lipoplexos contendo

Lipofectamina 2000 (liposoma catiónico utilizado como vetor na terapia génica e representado na figura 22 como “lipo”) foram usados como controlos positivos. Neste ensaio utilizaram-se poliplexos de PEG-PEI com diferentes rácios de N/P, ou seja, com diferentes quocientes de carga teóricos entre os grupos amino dos poliplexos PEG-PEI e os grupos fosfato do iRNA. Verificou-se que quanto maior o valor de N/P do poliplexo, maior a eficácia de transfeção. Isto se deve ao facto de que quanto maior o número de grupos amino, maior irá ser a afinidade do polímero com o material genético, o que levará à formação de complexos em que o iRNA ficará mais protegido da degradação enzimática. Os poliplexos PEG-PEI com valor de N/P 15 e 30 revelaram uma eficácia de transfeção superior aos lipoplexos Lipofectamina 2000 e aos poliplexos PEI. Contudo, a diferença na eficácia de transfeção entre os poliplexos N/P 15 e N/P 30 não é significativa, o que favorece a utilização de poliplexos PEG-PEI N/P 15 pois quanto maior for o quociente entre os grupos amino da PEI e os grupos fosfato do material genético, mais coeso será o sistema e mais difícil se tornará a libertação intracelular dos ácidos nucleicos.^[46]

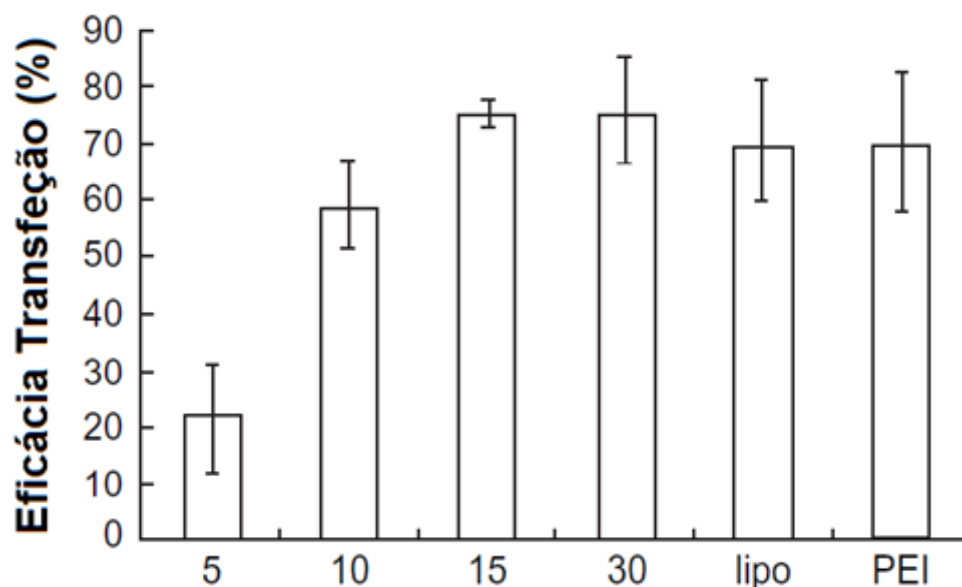


Figura 22. Gráfico da eficácia de transfeção de diferentes vetores genéticos: poliplexos PEG-PEI/iRNA com diferentes rácios N/P, Lipofectamina 2000 (“lipo”) e PEI.^[46]

Por fim, analisou-se a capacidade do iRNA em reduzir o mRNA da CD44v6 através de um *Real-Time* PCR, utilizando como vetor o políplexo PEG-PEI N/P 15 (figura 23). A expressão da CD44v6 foi afetada pelo iRNA, enquanto que o grupo controlo negativo não teve nenhum efeito óbvio na expressão da CD44v6.^[46]

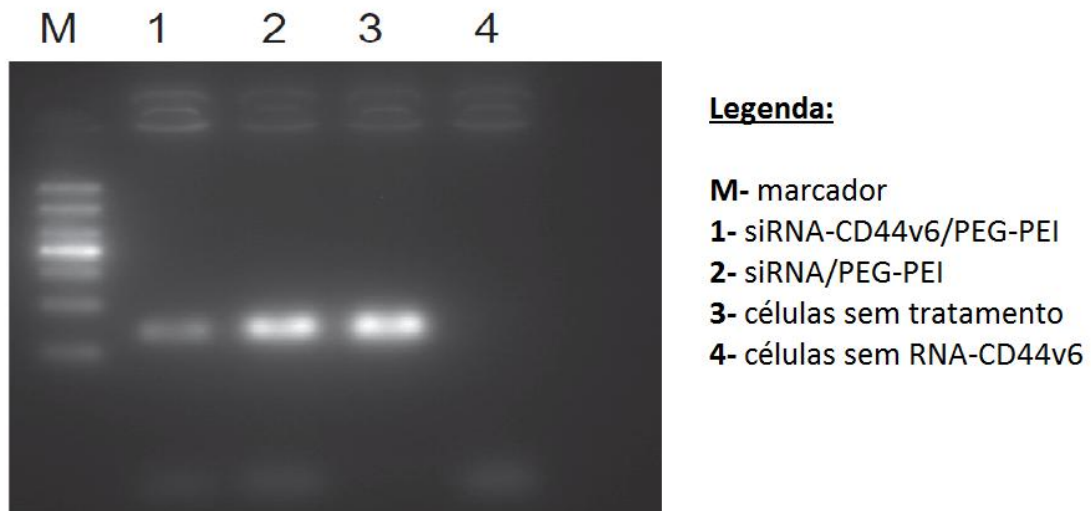


Figura 23. Resultado de um *Real-Time* PCR após transfeção com iRNA-CD44v6/PEG-PEI em células SGC7901.^[46]

7. Conclusão

Apesar de todo o desenvolvimento que houve na área da quimioterapia, o cancro continua a matar inúmeras pessoas em todo o mundo, mesmo nos países mais desenvolvidos. As propriedades estruturais das células tumorais e os mecanismos de MDR mantêm-se como obstáculos das terapias antineoplásicas, e os efeitos secundários dos fármacos oncológicos impossibilitam a utilização de determinadas dosagens, limitando assim todo o tratamento anticancerígeno. Assim, a busca de técnicas que permitam tratar o cancro de forma eficiente e segura torna-se fundamental.

Os sistemas de libertação compostos por *smart polymers* vão mostrando cada vez mais o seu potencial na quimioterapia. O facto de conseguirem contornar uma grande parte dos obstáculos das terapias anti-tumorais convencionais e de libertarem o fármaco nas células cancerígenas de forma quase exclusiva tornam estes sistemas numa das maiores promessas para o tratamento antineoplásico. Para além disso, a capacidade de resposta a diversos estímulos abre portas a várias abordagens terapêuticas diferentes, sejam elas reguladas externamente ou controladas apenas por *feedback* homeostático.

Ao longo desta dissertação verificou-se que já existe um grande número de estudos realizados com estes sistemas poliméricos. Contudo, trata-se de um conceito relativamente recente e que ainda necessita de tempo e de mais ensaios que corroborem a sua eficácia e segurança no transporte e distribuição dos fármacos oncológicos. Os fundamentos teóricos que existem sobre as utilizações dos *smart polymers* no âmbito do cancro ainda não são plenamente satisfatórios, já que os dados obtidos assentam essencialmente em experimentos feitos em animais ou culturas de células *in vitro*. Até ao momento as capacidades demonstradas pelos *smart polymers* têm sido promissoras, e só o futuro comprovará se de facto estes polímeros são uma alternativa viável para o tratamento antineoplásico.

8. Bibliografia

1. Fidler, I.; 2003; *The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited*; Nature Reviews; 3: 1-6.
2. *Fotografia do corte de um fígado com múltiplos nódulos provenientes de um cancro pancreático* - http://en.wikipedia.org/wiki/File:Secondary_tumor_deposits_in_the_liver_from_a_primary_cancer_of_the_pancreas.jpg; consultado em Maio de 2012.
3. Anand, P.; et al; 2008; *Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes*; Pharmaceutical Research; 25: 2097-2116.
4. Jemal, A.; et al; 2011; *Global Cancer Statistics*; CA - A Cancer Journal for Clinicians; 61: 69-90.
5. *World Health Organization; Cancer – World Cancer Day 2011*; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>; consultado em Maio de 2012.
6. Morrison, W.B.; 2010; *Cancer Chemotherapy: An Annotated History*; Journal of Veterinary Internal Medicine; 24: 1249-1262.
7. Papac, R.; 2001; *Origins of Cancer Therapy*; Yale Journal of Biology and Medicine; 74: 391-398.
8. Todd, D.; Kwong; Y.L.; 1997; *Delicious Poison: Arsenic Trioxide for the Treatment of Leukemia*; The American Society of Hematology; 89: 3487-3488.
9. Baker, J.R.; et al; 2001; *The Synthesis and Testing of Anti-Cancer Therapeutic Nanodevices*; Biomedical Microdevices; 3: 61-69.
10. *World Health Organization; Cancer Mortality and Morbidity*; http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer_text/en/index.html; consultado em Maio de 2012.

11. Chilkoti, A.; et al; 2002; *Targeted drug delivery by thermally responsive polymers*; Advanced Drug Delivery Reviews; 54: 613-630.
12. Lee, E.S.; et al; 2008; *Super pH-sensitive Multifunctional Polymeric Micelle for Tumor pH_e Specific TAT Exposure and Multidrug Resistance*; Journal of Controlled Release; 129: 228-236.
13. Hu, C.J.; Zhang, L.; 2009; *Therapeutic Nanoparticles to Combat Cancer Drug Resistance*; Current Drug Metabolism; 10: 836-841.
14. Meyer, U.A.; 2000; *Pharmacogenetics and adverse drug reactions*; The Lancet; 356: 1667-1671.
15. Kost, J.; Langer, R.; 2001; *Responsive polymeric delivery systems*; Advanced Drug Delivery Reviews; 46: 125-148.
16. Allen, T.M.; Cullis, P.R.; 2004; *Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream*; Science; 303: 1818-1822.
17. Torchilin, V.P.; 2007; *Targeted Pharmaceutical Nanocarriers for Cancer Therapy and Imaging*; The AAPS Journal; 9: 128-147.
18. Agnihotri, J.; et al; 2011; *Targeting: New Potential Carriers For Targetted Drug Delivery System*; International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research; 8: 117-123.
19. Brewer, E.; et al; 2011; *Emerging Technologies of Polymeric Nanoparticles in Cancer Drug Delivery*; Journal of Nanomaterials; 2011: 1-10.
20. Galaev, I.Y.; Mattiasson, B.; 1999; *"Smart polymers" and what they could do in biotechnology and medicine*"; Tibtech; 17: 335-340.
21. Hoffman, A.S.; 2000; *Bioconjugates of Intelligent Polymers and Recognition Proteins for Use in Diagnostics and Affinity Separations*; Clinical Chemistry; 46: 1478-1486.

22. Roy, I.; Gupta, M.N.; 2003; *Smart Polymeric Materials: Emerging Biochemical Applications*; Chemistry & Biology; 10: 1161-1171.
23. Al-Tahami, K.; Singh, J.; 2007; *Smart Polymer Based Delivery Systems for Peptides and Proteins*; Recent Patents on Drug Delivery & Formulation; 1: 65-71.
24. Fogueri, L.R.; Singh, S.; 2009; *Smart Polymers for Controlled Delivery of Proteins and Peptides: A Review of Patents*; Recent Patents on Drug Delivery & Formulation; 3: 40-48.
25. Tong, A.W.; et al; 2009; *Systemic Therapeutic Gene Delivery for Cancer: Crafting Paris' Arrow*; Current Gene Therapy; 9: 45-60.
26. Kumar, S.; Richards-Kortum, R.; 2006; *Optical Molecular Imaging Agents for Cancer Diagnostics and Therapeutics*; Future Medicine; 1: 23-30.
27. Kim, S.; et al; 2009; *Engineered Polymers for Advanced Drug Delivery*; European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics; 71: 420-430.
28. Yang, J.; et al; 2009; *Smart Drug-Loaded Polymer Gold Nanoshells for Systemic and Localized Therapy of Human Epithelial Cancer*; Advanced Materials; 21: 1-4.
29. Herrero-Vanrell, R.; et al; 2005; *Self-assembled particles of an elastin-like polymer as vehicles for controlled drug release*; Journal of Controlled Release; 102: 113-122.
30. *Fotografia de uma câmara dorsal implantada num rato nu* - <http://www.kmu.edu.tw/~clife/tlife/tbics2005-abstract.htm>; consultado em Maio de 2012.
31. Li, W.; et al; 2011; *Gold Nanocages Covered with Thermally-responsive Polymers for Controlled Release by High-intensity Focused Ultrasound*; Nanoscale; 3: 1724-1730.
32. Sakeena, M.H.F.; et al; 2010; *Formulation and in vitro Evaluation of Ketoprofen in Palm Oil Esters Nanoemulsion for Tropical Delivery*; Journal of Oleo Science; 59: 223-228.

33. Yavuz, M.; et al; 2009; *Gold Nanocages Covered by Smart Polymers for Controlled Release With Near-infrared Light*; Nature Materials; 8: 935-939.
34. Griffiths, J.R.; 1991; *Are cancer cells acidic?*; British Journal of Cancer; 64: 425-427.
35. Sutton, D.; et al; 2007; *Functionalized Micellar Systemas for Cancer Targeted Drug Delivery*; Pharmaceutical Research; 24: 1029-1046.
36. Henry, S.; et al; 2006; *pH-Responsive Poly(Styrene-alt-maleic Anhydride) Alkylamide Copolymers for Intracellular Drug Delivery*; Biomacromolecules; 7: 2407-2414.
37. Chaterji, S.; et al; 2007; *Smart Polymeric Gels: Redifining the Limits of Biomedical Devices*; Progress in Polymer Science; 32: 1083-1122.
38. Schneider, H.; Strongin, R.; 2009; *Supramolecular Interactions in Chemomechanical Polymers*; Accounts of Chemical Research; 42: 1489-1500.
39. Lee, E.; Bae, Y.; 2008; *Recent Progress in Tumor pH Targeting Nanotechnology*; Journal of Controlled Release; 132: 164-170.
40. Halama, A.; et al; 2009; *Polymer-based Non-viral Gene Delivery as a Concept for the Treatment of Cancer*; Pharmacological Reports; 61: 993-999.
41. Dinçer, S.; et al; 2005; *Intelligent Polymers as Nonviral Vectors*; Gene Therapy; 12: 139-145.
42. Chiu, Y.; Rana, T.; 2003; *siRNA Function in RNAi: a Chemical Modification Analysis*; RNA; 9: 1034-1048.
43. Leuschner, P.; et al; 2006; *Cleavage of the siRNA Passenger Strand During RISC Assembly in Human Cells*; EMBO Reports; 7: 314-320.
44. *Mecanismo de ação do iRNA na supressão da expressão genética* - <http://arthritis-research.com/content/6/2/78/figure/F1?highres=y>; consultado em Maio de 2012.

45. Skidmore, S.C.; 2010; *Temperature and pH Responsive Polyethylenimine Systems as Potential Nonviral Gene Vectors*; Tese de Mestrado, Departamento de Química, Universidade Wright State, Fairborn, Estados Unidos da América.

46. Wu, Y.; et al; 2010; *The Investigation of Polymer-siRNA Nanoparticle for Gene Therapy of Gastric Cancer in vitro*; International Journal of Nanomedicine; 5: 129-136.