

**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

***Nanotecnologia na terapêutica do cancro do pulmão  
de não pequenas células: A aplicação de lipossomas***

**João André Martins Rico**

Dissertação  
Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:  
Doutora Ana Margarida Grenha

2018

**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**  
Faculdade de Ciências e Tecnologia

***Nanotecnologia na terapêutica do cancro do pulmão  
de não pequenas células: A aplicação de lipossomas***

**João André Martins Rico**

Dissertação  
Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:  
Doutora Ana Margarida Grenha

Faro

2018

**Título:** Nanotecnologia na terapêutica do cancro do pulmão de não pequenas células: A aplicação de lipossomas

**Declaração de autoria de trabalho**

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

Copyright © 2018 João André Martins Rico. Todos os direitos reservados.

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

## Agradecimentos

Em primeiro lugar, à Professora Doutora Ana Margarida Grenha agradeço o apoio e a confiança depositada, ao ter aceite o desafio de orientar esta dissertação. Também pelo rigor manifestado no decurso deste trabalho, bem como a disponibilidade, apoio e esclarecimento de dúvidas.

Agradeço também a todos os docentes que contribuíram com a sua dedicação e conhecimentos para a minha formação tanto a nível pessoal como profissional.

À equipa dos Serviços Farmacêuticos do Centro Hospitalar Universitário do Algarve – Unidade de Faro e da Farmácia Pacheco, agradeço por toda a disponibilidade, conhecimentos que me foram transmitidos para o meu enriquecimento profissional, bem como pela integração na equipa e companheirismo demonstrado.

À minha família, e em especial aos meus pais e ao meu irmão, agradeço por toda a dedicação, apoio, orgulho e confiança que depositaram em mim, bem como pela força que sempre me transmitiram, impulsionando-me sempre a alcançar os meus sonhos.

Aos meus amigos, os de sempre e os que se tornaram ao longo deste percurso, agradeço por toda a amizade e apoio, pelos bons momentos e memórias que me têm proporcionado.

A todos os que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu mais sincero agradecimento.

# Resumo

---

Hoje em dia o cancro é um dos principais problemas de saúde a nível mundial, apresentando elevadas taxas de incidência e mortalidade, sendo o cancro do pulmão considerado a segunda neoplasia mais comum e a mais mortífera em todo o mundo. A grande maioria dos cancros do pulmão corresponde a carcinomas, os quais se dividem essencialmente em dois grandes grupos, carcinoma pulmonar de pequenas células e carcinoma pulmonar de não pequenas células, representando o último cerca de 80 a 85% do total de casos de cancro do pulmão diagnosticados.

A investigação na área oncológica tem evoluído consideravelmente nos últimos anos, procurando desenvolver técnicas que possibilitem um diagnóstico precoce e intervenções terapêuticas mais seguras e eficazes, com o intuito de colmatar as falhas associadas às formas de tratamento convencionais. Neste sentido, o desenvolvimento de novas estratégias permitiu a aplicação da nanotecnologia nesta área, isto é, a utilização de estruturas e sistemas à escala nanométrica, com propriedades únicas que visam obter uma maior seletividade dos fármacos anticancerígenos para as células tumorais. Esta abordagem garante um transporte adequado e uma elevada biodisponibilidade no local, o que contribui para melhores resultados terapêuticos, com consequente aumento da qualidade de vida dos doentes.

Entre os vários nanossistemas, os lipossomas têm sido cada vez mais estudados enquanto veículos de fármacos para as células tumorais, evidenciando o seu impacto positivo no tratamento de tumores, nomeadamente, do carcinoma pulmonar de não pequenas células. A encapsulação de fármacos nos lipossomas conduz a uma alteração das suas propriedades farmacocinéticas e de biodistribuição, que passam a depender também das propriedades físico-químicas dos lipossomas, alterando igualmente a sua toxicidade original e eficácia terapêutica.

Ao longo da presente dissertação serão abordados, de forma genérica e introdutória, os aspetos relacionados com o cancro do pulmão, em particular com o cancro do pulmão de não pequenas células. O foco será colocado na nanotecnologia e na utilização de lipossomas para vetorização de fármacos anticancerígenos e de outras moléculas com aplicação no tratamento desta neoplasia, destacando as propostas

terapêuticas mais recentes descritas na literatura como alternativa às terapêuticas convencionais, procurando contornar as suas limitações.

**Palavras-chave:** cancro do pulmão de não pequenas células, lipossomas, nanotecnologia, vetorização de fármacos.

# Abstract

---

Nowadays, cancer is one of the main health problems worldwide, revealing increased rates of incidence and mortality, with lung cancer being the second most common neoplasia and the deadliest in the world. The majority of lung cancers are carcinomas, which are divided essentially in two large groups: small cell lung cancer and non-small cell lung cancer, with the last representing 80 to 85% of the overall diagnosed lung cancer's cases.

The investigation in the oncologic area has evolved considerably over the last years, seeking to develop techniques that may allow an early diagnosis and safer and more effective therapeutic interventions, aiming to fill the gaps in the conventional treatment procedures. Thus, the development of new strategies enabled the use of nanotechnology in this field, namely using structures and systems in nanometric scales, with unique properties in order to have anti-cancer drugs more selective to tumor cells. This approach guaranties an adequate transport and a high bioavailability in locus, contributing to increase the patient's quality of life.

Amongst the different nanosystems, the liposomes have been continuously studied as drug's vehicles for tumoral cells, enhancing their positive impact in the treatment of tumors, mainly from non-small cell lung cancer. The encapsulation of drugs in liposomes leads to an alteration of the drug's pharmacokinetic properties and biodistribution, by acquiring the liposomes own physicochemical properties, and altering as well their original toxicity and therapeutic efficiency.

Throughout this dissertation the aspects related to lung cancer, particularly those to non-small cell lung cancer, will be addressed in a general and introductory way. The main focus will be nanotechnology and the use of liposomes for vectorization of anti-cancer drugs and other molecules relevant in the treatment of this neoplasia, highlighting the most recent therapeutic proposals described in literature as an alternative to the conventional therapies, attempting to overcome their limitations.

**Keywords:** liposomes, nanotechnology, non-small cell lung cancer, vectorization of anti-cancer drugs.

# Índice

---

1. Introdução .....	1
2. Metodologia .....	4
3. <b>O Cancro do Pulmão</b> .....	5
3.1. Epidemiologia .....	7
3.2. Etiologia .....	9
3.2.1. Fatores Genéticos .....	9
3.2.2. Fatores Comportamentais.....	11
3.2.3. Fatores Ambientais.....	11
3.2.3.1. Agentes Biológicos .....	11
3.2.3.2. Agentes Químicos .....	12
3.2.3.3. Agentes Físicos .....	12
3.3. Sinais e Sintomas.....	13
3.4. Diagnóstico.....	14
3.5. Estadiamento .....	15
3.6. Terapêutica Convencional .....	15
3.6.1. Cirurgia.....	16
3.6.2. Radioterapia .....	16
3.6.3. Quimioterapia.....	17
3.6.4. Imunoterapia.....	18
3.6.5. Terapias-Alvo.....	18
4. <b>Nanotecnologia: Uma realidade em pequena escala</b> .....	20
4.1. Nanossistemas .....	22
4.1.1. Lipossomas.....	22
4.1.2. Nanopartículas Lipídicas Sólidas .....	26
4.1.3. Transportadores Lipídicos Nanoestruturados.....	27
4.1.4. Nanopartículas Poliméricas.....	27
4.1.5. Micelas .....	29
4.1.6. Dendrímeros .....	29
4.1.7. Hidrogéis .....	30
4.1.8. Conjugados polímero-fármaco .....	31
4.1.9. Nanotubos de Carbono .....	31

4.1.10. Nanopartículas Metálicas .....	32
4.1.11. Nanopartículas Virais .....	33
4.2. Vantagens e Desvantagens dos Nanossistemas .....	34
4.3. Princípios para a Vetorização de Fármacos .....	35
4.3.1. Vetorização Passiva.....	36
4.3.2. Vetorização Ativa.....	37
4.4. Vias de Administração de Terapêuticas com Nanossistemas .....	38
4.4.1. Via Oral .....	38
4.4.2. Via Intravenosa .....	39
4.4.3. Via Pulmonar.....	40
4.5. Toxicidade associada aos Nanossistemas.....	41
<b>5. Os lipossomas e a sua aplicação na terapêutica do Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células.....</b>	<b>43</b>
5.1. Interação com as células.....	44
5.2. Exemplos de moléculas vetorizadas por lipossomas na terapêutica do Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células .....	46
5.2.1. Doxorubicina.....	47
5.2.2. Cisplatina.....	50
5.2.3. Paclitaxel .....	53
5.2.4. Docetaxel.....	56
5.2.5. Tecemotide .....	58
5.2.6. TUSC2.....	61
5.2.7. Outras moléculas vetorizadas por lipossomas.....	63
6. Conclusão.....	64
7. Referências Bibliográficas .....	67

# Índice de Figuras

---

Figura 1.1 – Representação esquemática do processo carcinogénico.....	1
Figura 3.1 – Anatomia do aparelho respiratório.....	6
Figura 3.2 – Representação esquemática dos tipos de efeitos da radiação ionizante.....	13
Figura 4.1 – Correlação de dimensões com a escala nanométrica.....	21
Figura 4.2 – Representação esquemática da estrutura de um lipossoma.....	23
Figura 4.3– Representação esquemática dos diversos tipos de lipossomas, de acordo com as dimensões e o número de bicamadas fosfolipídicas constituintes.....	24
Figura 4.4 – Representação esquemática da estrutura de uma nanocápsula e de uma nanoesfera.....	28
Figura 4.5 – Representação esquemática da estrutura de nanotubos de carbono.....	31
Figura 4.6 – Representação esquemática do efeito EPR.....	36
Figura 5.1 – Comparação da captação celular da formulação lipossomal de DOX não modificada e modificada com octa-arginina por citometria de fluxo.....	50
Figura 5.2 – Comparação da taxa geral de resposta entre os pacientes tratados com uma combinação de cisplatina lipossomal e PTX (grupo A) e os pacientes tratados com cisplatina convencional associada a PTX (grupo B).....	52
Figura 5.3 – Curva de eliminação intrapleural do paclitaxel para os pacientes tratados com a formulação lipossomal e com o fármaco na sua forma livre.....	55
Figura 5.4 – Metabolismo in vitro de DTX livre e DTX encapsulado em lipossomas em diferentes homogeneizados de tecido do modelo experimental utilizado no estudo.....	57
Figura 5.5 – Resultados obtidos no estudo desenvolvido por Ma J. et al.....	58
Figura 5.6 – Análise da taxa de sobrevida, ao longo dos 53 meses de acompanhamento, para os 65 pacientes no estágio IIIB.....	60
Figura 5.7 – Comparação da curva de sobrevivência de Kaplan-Meier ao longo do tempo após o início do estudo nos pacientes tratados com tecemotide e nos tratados com um placebo.....	61
Figura 5.8 – Resultados obtidos num ensaio pré-clínico desenvolvido em ratinhos xenotransplantados com células A549.....	62

# Índice de Tabelas

---

Tabela 3.1 – Indicadores de mortalidade do tumor maligno da traqueia, brônquios e pulmão, por género em Portugal (2011 a 2015).....	9
Tabela 5.1 – Exemplos de moléculas com atividade antitumoral que se encontram em ensaios clínicos e pré-clínicos para vetorização por lipossomas com aplicação no CPNPC.....	64

# Lista de Abreviaturas

---

- ADN** – Ácido desoxirribonucleico
- ALK** – Cinase de linfoma anaplásico
- APC** – Células apresentadoras de antígenos
- ARN** – Ácido ribonucleico
- ATP** – Adenosina trifosfato
- CMC** – Concentração Micelar Crítica
- CNT** – Nanotubos de Carbono
- CPNPC** – Carcinoma Pulmonar de Não Pequenas Células
- CPPC** – Carcinoma Pulmonar de Pequenas Células
- DGS** – Direção-Geral da Saúde
- DODAP** – 1,2-dioleoil-3-dimetilamónio-propano
- DOTAP** – 1,2-dioleil-3-trimetilamónio-propano
- DOX** – Doxorrubicina
- DPOC** – Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica
- DTX** – Docetaxel
- EGFR** – Recetor do Fator de Crescimento Epidérmico
- EPR** – Efeito de Permeabilidade e Retenção
- FDA** – *Food and Drug Administration*
- GST** – Glutathione-S-Transferase
- GUV** – Vesículas Unilamelares Gigantes
- IV** – Intravenosa
- KRAS** – *Kirsten rat Sarcoma Viral Oncogene Homologue*
- LDH** – Lactato Desidrogenase
- LUV** – Vesículas Unilamelares Grandes
- MHC** – Complexo principal de histocompatibilidade
- MLV** – Vesículas Multilamelares
- MUC1** – Mucina 1
- MVV** – Vesículas Multivesiculares
- MWCNTs** – Nanotubos de Carbono de Parede Múltipla
- NLC** – Transportadores Lipídicos Nanoestruturados
- nm** – Nanómetro

**OMS** – Organização Mundial da Saúde  
**OR** – *Odds ratio*  
**PAMAM** – Poliamidoamina  
**PEG** – Polietilenoglicol  
**PEHAM** – Poliéterhidroxilamina  
**PPI** – Polipropilenoimina  
**PTX** – Paclitaxel  
**QT** – Quimioterapia  
**Rb** – Retinoblastoma  
**RES** – Sistema Reticuloendotelial  
**RQT** – Radioquimioterapia  
**RT** – Radioterapia  
**SLN** – Nanopartículas Lipídicas Sólidas  
**SUV** – Vesículas Unilamelares Pequenas  
**SWCNTs** – Nanotubos de Carbono de Parede Única  
**TAC** – Tomografia Axial Computorizada  
**TP53** – Proteína Tumoral 53  
**TUSC2** – *Tumor Suppressor Candidate 2*  
**ULV** - Vesículas Unilamelares  
**VIH** – Vírus da Imunodeficiência Humana  
**VPH** – Vírus do Papiloma Humano  
**µm** – Micrómetro

# 1. Introdução

---

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o termo cancro representa não apenas uma doença, mas um conjunto de doenças caracterizadas por um crescimento anormal e descontrolado de células que podem invadir os tecidos circundantes e/ou disseminar-se para outros órgãos, formando metástases. A nível mundial, surgem cerca de 14.1 milhões de novos casos de cancro a cada ano e este representa uma das principais causas de morbilidade e mortalidade, tendo sido responsável por 8.8 milhões de mortes em 2015.<sup>1,2</sup>

Nos tecidos normais, existem mecanismos de controlo e regulação celular que permitem assegurar um equilíbrio entre a divisão, renovação e morte celular (por envelhecimento ou danificação). Quando estes mecanismos falham, pode-se iniciar o processo carcinogénico, isto é, o processo no qual as células normais se transformam em cancerígenas (Figura 1.1). Este envolve três fases distintas, a iniciação, a promoção e a progressão, e dura vários anos, sendo uma das razões pelas quais a incidência do cancro aumenta com a idade.<sup>3</sup>

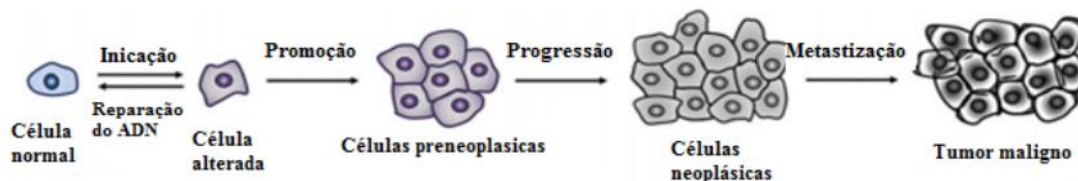


Figura 1.1 - Representação esquemática do processo carcinogénico. [Adaptado de (4)].

A fase inicial deste processo começa com a ocorrência de mutações no ácido desoxirribonucleico (ADN) de uma determinada célula, resultante da exposição a agentes carcinogénicos biológicos, físicos ou químicos. Estas mutações podem causar diversas alterações, tais como a ativação de proto-oncogenes (que estão envolvidos no crescimento e na divisão das células normais), inativação dos genes supressores de tumores (que estão envolvidos no controlo do crescimento e divisão celular) e dos genes responsáveis pela reparação do material genético (que influenciam a capacidade de reparação de mutações ocorridas noutros genes), bem como alterações nos genes reguladores da apoptose (que controlam o processo de morte celular programada).<sup>1,5,6</sup>

Na segunda fase do processo carcinogénico, denominada promoção, ocorre o crescimento e a proliferação celular. Nesta, um estímulo contínuo por parte dos agentes carcinogénicos permite que as células mutadas, transformadas em malignas, progridam de uma forma lenta e gradual, formando uma pequena massa tumoral constituída por células cancerígenas.<sup>7</sup>

A terceira e última fase do processo, a progressão tumoral, caracteriza-se pela multiplicação descontrolada e irreversível das células malignas, bem como pelo surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença. Esta representa a etapa onde as células malignas se tornam mais agressivas, demonstram uma maior heterogeneidade, cada uma com características genéticas e funcionais diferentes, e é onde se verifica um rápido crescimento tumoral. Contudo, para que esse crescimento prossiga é fundamental o aporte de oxigénio e nutrientes, que é assegurado através da corrente sanguínea. Assim, o tumor cresce junto aos vasos sanguíneos até atingir os 2 mm<sup>3</sup>, valor a partir do qual ocorre hipóxia, sendo necessário induzir a angiogénese, isto é, a formação de novos vasos sanguíneos. Este processo compreende várias etapas, iniciando com a degradação da membrana extracelular de um vaso sanguíneo pré-existente, permitindo a migração de células endoteliais para o espaço intersticial. Por sua vez, estas células multiplicam-se e formam novos vasos na direção do tumor, culminando com a reorganização da membrana extracelular. Os novos vasos apresentam características distintas dos restantes capilares normais, uma vez que possuem uma elevada permeabilidade e uma forma não linear, com curvaturas.<sup>1,5,8</sup>

A neovascularização tem um efeito duplo no crescimento tumoral. Por um lado, fornece os nutrientes e o oxigénio necessários e, por outro lado, as células endoteliais recém-formadas libertam fatores de crescimento, estimulando o crescimento de células tumorais adjacentes. Além disso, a angiogénese é essencial para a invasão e metastização, pois sem vascularização, as células tumorais não conseguem disseminar-se com facilidade para outros locais do organismo.<sup>1,5,8</sup>

Genericamente, todos os órgãos podem ser afetados por um processo cancerígeno. O cancro do pulmão é a principal causa de morte por cancro, decorrente da sua elevada incidência, agressividade biológica, diagnóstico tardio e ausência de estratégias terapêuticas eficazes, pelo que constitui um grave problema de saúde pública em todo o mundo. Deste modo, o prognóstico é reservado na grande maioria dos casos, sendo

necessário o desenvolvimento de formulações capazes de atuar seletivamente nas células tumorais sem causar toxicidade sistêmica e um efeito destrutivo nas células vizinhas saudáveis, e ao mesmo tempo aumentar a biodisponibilidade do fármaco no local do tumor, melhorando a eficácia do tratamento. Neste sentido, a nanomedicina tem-se revelado uma estratégia com um elevado potencial para o desenvolvimento de formulações com aplicação no cancro e, em particular, no cancro do pulmão.<sup>9-11</sup>

Os nanossistemas têm dimensões reduzidas que os tornam capazes de interagir diretamente com as células e biomoléculas. Estas estruturas podem ser funcionalizadas, modificando a sua superfície com uma diversidade de ligandos, o que lhes permite aumentar o tempo em circulação, reconhecer recetores e/ou marcadores moleculares específicos presentes na superfície de determinado tipo de células, bem como controlar a libertação do fármaco e favorecer a sua penetração nas células, aumentando a concentração intracelular e, conseqüentemente, a eficácia do tratamento.<sup>12,13</sup>

Atualmente, a grande maioria dos nanossistemas utilizados como veículo de fármacos anticancerígenos para o tratamento do cancro do pulmão encontram-se em fase de investigação, ensaios pré-clínicos ou clínicos, em muitos casos com resultados auspiciosos. Um dos grupos de nanossistemas mais utilizado é o dos lipossomas, que têm demonstrado capacidade para aumentar a concentração de fármaco disponível no interior das células tumorais, contribuindo para uma maior eficácia do tratamento e redução da toxicidade associada ao mesmo.<sup>14,15</sup>

A presente dissertação tem como principais objetivos abordar, inicialmente, os aspetos relacionados com o cancro do pulmão, em particular com o carcinoma pulmonar de não pequenas células (CPNPC), focando brevemente a sua epidemiologia, etiologia, métodos de diagnóstico, estadiamento, bem como as opções terapêuticas convencionais. Posteriormente, o foco será colocado na nanotecnologia e nas potencialidades da utilização de lipossomas no tratamento desta neoplasia, apresentando os resultados obtidos por algumas formulações lipossomais enquanto veículos de fármacos anticancerígenos e de outras moléculas com aplicação na terapêutica antitumoral.

## 2. Metodologia

---

A presente dissertação de mestrado consiste numa revisão bibliográfica que visa esclarecer quais as aplicações da nanotecnologia, nomeadamente dos lipossomas, na terapêutica do CPNPC, fornecendo informação atualizada e resumida sobre o tema.

Para a sua elaboração, a metodologia utilizada consistiu numa revisão sistemática de diversas fontes bibliográficas, incluindo livros para uma pesquisa de carácter mais geral e recolha de conceitos e definições, bem como de estudos científicos, presentes em revistas nas áreas de Oncologia, Pneumologia e Nanotecnologia, obtidos através de bases de dados como o *PubMed*, *B-On*, *Science Direct*, *Web of Knowledge*, entre outras. Os termos utilizados na pesquisa foram: lipossomas, nanomedicina, nanossistemas, nanotecnologia e carcinoma pulmonar de não pequenas células. Além disso, foram consultados diversos organismos governamentais, como a *American Cancer Society*, a OMS e a Direção-Geral da Saúde (DGS), de modo a completar a informação com dados pertinentes.

De toda a informação recolhida, apenas foi selecionada para constar na presente dissertação a informação científica mais atual e/ou relevante sobre a temática, tendo esta sido posteriormente cruzada a fim de obter conclusões mais fidedignas. Por outro lado, importa referir que de entre os diversos estudos reunidos e, posteriormente, analisados para as várias terapêuticas antitumorais envolvendo lipossomas com aplicação no CPNPC, foi privilegiada a descrição de ensaios clínicos, por conduzirem a melhores conclusões, dado o facto de serem realizados em humanos portadores da patologia. Contudo, na ausência deste tipo de estudos ou de conclusões variadas e heterogéneas, procurou-se abordar alguns estudos desenvolvidos *in vivo* e *in vitro*, com o intuito de indagar acerca das estratégias que têm sido utilizadas e, conseqüentemente, retirar ilações sobre o rumo que a investigação neste área está a tomar.

### 3. O Cancro do Pulmão

---

Os pulmões são órgãos esponjosos em forma de cone, fazem parte do aparelho respiratório (Figura 3.1) e são os principais órgãos responsáveis pela respiração.<sup>16</sup> Durante o processo de inspiração, o ar entra pela boca ou pelo nariz, atravessa a faringe e a laringe e entra na traqueia, que por sua vez, se divide em dois brônquios, que entram nos pulmões e se vão dividindo em tubos cada vez mais finos, os bronquíolos, que terminam nos alvéolos. Nestes, ocorre a passagem do oxigênio (O<sub>2</sub>) presente no ar para o sangue, que posteriormente será transportado até às células, de modo a que estas possam desempenhar as suas funções normais. No processo de expiração, ocorre a passagem de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), resultante do desperdício das células do organismo, do sangue para o exterior. Assim, é fundamental que os pulmões sejam saudáveis, para serem eficazes nas trocas gasosas.<sup>17,18</sup>

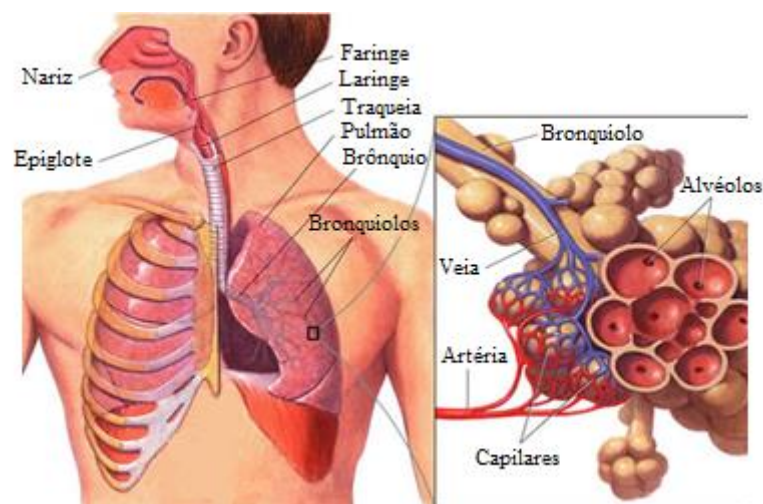


Figura 3.1 - Anatomia do aparelho respiratório. [Adaptado de (16)].

Tal como os restantes órgãos do organismo, os pulmões são compostos por células que, na sua grande maioria, morrem e são renovadas ao longo do tempo. O cancro do pulmão é um termo usado para definir os tumores com origem nas células do epitélio respiratório, ao nível dos brônquios, bronquíolos e alvéolos. O processo carcinogénico inicia-se quando ocorrem alterações nos mecanismos de controlo e regulação celular, levando à formação de células anormais que se multiplicam de uma forma descontrolada, originando o tumor primário que pode invadir os tecidos circundantes ou atingir a corrente sanguínea ou linfática e disseminar-se para outros órgãos, desenvolvendo novos tumores, as metástases. No cancro do pulmão, é principalmente no fígado, nos ossos e no cérebro que surgem metástases.<sup>19,20</sup>

A grande maioria dos cânceros do pulmão são carcinomas e dividem-se em dois grandes grupos, CPNPC e carcinoma pulmonar de pequenas células (CPPC), que crescem e metastizam-se de formas diferentes, ou seja, apresentam um comportamento distinto e conseqüentemente, são tratados de forma diferente.<sup>21,22</sup>

O CPNPC representa cerca de 80 a 85% dos carcinomas pulmonares e divide-se em três tipos, de acordo com as células que o constituem: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas ou epidermóide e carcinoma de células grandes. O adenocarcinoma, representa cerca de 40% dos CPNPC, localiza-se na zona periférica do pulmão, não provoca sintomas e rapidamente metastiza para os gânglios linfáticos e outros órgãos, sendo o tumor mais frequente nos não-fumadores. O carcinoma de células escamosas ou epidermóide, representa cerca de 25% dos CPNPC, tem uma localização mais central, provoca sintomas mais cedo e apresenta um crescimento lento, constituindo um dos tumores que permanece mais tempo localizado. O carcinoma de células grandes, o menos frequente dos CPNPC, representando apenas cerca de 10% destes, provoca tumores grandes na periferia e tem uma capacidade de metastização precoce.<sup>22-24</sup>

O CPPC representa cerca de 15 a 20% dos carcinomas pulmonares e está relacionado com o tabaco. Relativamente ao CPNPC, é clinicamente mais agressivo, muito indiferenciado, cresce mais rapidamente, está associado a uma metastização extratorácica precoce e responde relativamente bem à quimioterapia (QT) e à radioterapia (RT).<sup>22,24,25</sup>

Os tumores menos frequentes, com uma prevalência inferior a 5%, são o adenoma brônquico, que pode ou não ser canceroso, o sarcoma, que é canceroso, e o hamartoma condromatoso, que não é canceroso.<sup>25</sup>

### 3.1. Epidemiologia

---

Atualmente, o cancro do pulmão é uma importante patologia respiratória devido à sua elevada incidência e considerável taxa de mortalidade. A sobrevivência de indivíduos com cancro do pulmão depende da extensão da neoplasia no momento do diagnóstico, e apesar dos avanços na terapêutica, a taxa de sobrevivência aos cinco anos é persistentemente baixa, 10-13% na maioria dos países, o que se traduz em padrões de incidência e de mortalidade sensivelmente idênticos. Os estudos realizados demonstram

que independentemente do subtipo histológico e da faixa etária, a taxa de sobrevivência aos cinco anos é superior no género feminino comparativamente ao género masculino.<sup>26-28</sup>

A nível mundial a incidência aumenta ao ritmo de 2% ao ano, sendo a segunda neoplasia mais frequente, vencida apenas pelo cancro da próstata nos homens e pelo cancro da mama nas mulheres. Representa 13.1% de todos os cancros, 8% dos cancros do sexo feminino e 18% do sexo masculino, sendo superior neste grupo devido ao maior consumo de tabaco por parte dos homens. A incidência aumenta com a idade, sendo a idade média no momento do diagnóstico 70 anos. Em termos geográficos, a incidência é mais elevada na Europa e na América do Norte e mais baixa na América do Sul e África Subsariana, sendo que 58% dos casos ocorrem em países desenvolvidos, contudo estima-se que a sua incidência duplique nos próximos 25 anos nos países em desenvolvimento.<sup>26,29,30</sup>

Tendo em conta os dados do relatório da DGS de 2015, Portugal é um dos países da União Europeia com uma das taxas de incidência de cancro do pulmão mais baixa, cerca de 35.8/100.000 (57.7/100.000 no homem e 15.8/100.000 na mulher), sendo a quarta neoplasia com maior incidência, seguindo-se ao cancro da próstata, da mama e do cólon.<sup>31</sup>

Segundo dados da OMS, a nível mundial o cancro do pulmão é a décima causa de morte e a neoplasia mais mortífera, tendo sido responsável pela morte de 1.69 milhões de pessoas em 2015, o que corresponde a 18% de todas as mortes por cancro.<sup>32</sup> As taxas de mortalidade são mais elevadas na Europa e na América do Norte e mais baixas na América do Sul e África Subsariana. Em Portugal, o cancro do pulmão é a quinta causa de morte mais frequente e a primeira oncológica, e a diferença observada entre géneros na mortalidade por este tipo de cancro (Tabela 3.1) prende-se essencialmente com as diferenças históricas entre homens e mulheres no aumento e redução do tabagismo nos últimos 50 anos. Além disso, o facto de ser a neoplasia com maior mortalidade associada, traduz o seu prognóstico reservado e justifica a crescente preocupação com esta patologia, não só a nível nacional, como em todo o mundo.<sup>26,29,31</sup>

Tabela 3.1- Indicadores de mortalidade do tumor maligno da traqueia, brônquios e pulmão, por género em Portugal (2011 a 2015). [Adaptado de (33)].

<b>TUMOR MALIGNO DA TRAQUEIA, BRÔNQUIOS E PULMÃO</b>						
		<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>
<b>Ambos os géneros</b>	<b>Número de óbitos</b>	3,705	3,670	4,002	3,927	4,015
	<b>Taxa de mortalidade padronizada</b>	24,3	23,8	25,8	24,6	24,9
<b>Género masculino</b>	<b>Número de óbitos</b>	2,894	2,856	3,147	3,077	3,035
	<b>Taxa de mortalidade padronizada</b>	43,3	42,3	46,2	43,9	42,8
<b>Género feminino</b>	<b>Número de óbitos</b>	811	814	855	850	980
	<b>Taxa de mortalidade padronizada</b>	9,2	9,1	9,4	9,4	10,7

Nota: Taxas por 100 000 habitantes

## 3.2. Etiologia

O cancro do pulmão tem uma etiologia multifatorial, resultando da relação entre a exposição aos agentes etiológicos e a suscetibilidade individual a esses mesmos agentes. Num indivíduo geneticamente suscetível, o processo de carcinogénese pode ser desencadeado pelas lesões celulares que resultam de uma exposição prolongada aos agentes.<sup>27,34</sup>

### 3.2.1. Fatores Genéticos

A ocorrência e conseqüente acumulação de mutações em genes críticos, nomeadamente aqueles que controlam o crescimento e a divisão celular (genes supressores de tumores e reguladores da apoptose) ou reparam o material genético danificado (genes reparadores do ADN), está na base do processo de carcinogénese, permitindo que as células cresçam e se dividam incontrolavelmente para formar um tumor. Em quase todos os casos de cancro do pulmão, essas mutações ocorrem nas células somáticas e como tal não são herdadas, são adquiridas ao longo da vida de um indivíduo, estando presentes apenas em algumas células do pulmão. Em casos raros, as mutações ocorrem nas células germinais dos progenitores e são hereditárias, estando presentes em todas as células do corpo.<sup>34,35</sup>

Nos casos de CPNPC, as mutações somáticas mais comuns são as que ocorrem nos genes TP53 (proteína tumoral 53), EGFR (recetor do fator de crescimento epidérmico), KRAS (*Kirsten rat Sarcoma Viral Oncogene Homologue*) e ALK (cinase de linfoma anaplásico). O gene TP53 codifica uma proteína que se liga diretamente ao ADN, chamada p53. Esta regula o crescimento celular e a divisão ao monitorizar os danos no material genético, pois quando o ADN está danificado, esta proteína ajuda a determinar se o material genético é reparado ou se a célula entra em apoptose. Os genes EGFR, KRAS e ALK codificam proteínas da membrana celular designadas respetivamente, recetor do fator de crescimento epidérmico, K-Ras e tirosina cinase recetora de ALK. Quando estas proteínas são ativadas por outras moléculas, são desencadeadas vias de sinalização dentro das células que levam à proliferação celular.<sup>1,35-40</sup>

Mutações no gene TP53 levam à produção de uma proteína p53 anormal, que não se liga ao ADN e conseqüentemente, não regula a proliferação celular e permite que o material genético danificado se acumule nas células, que continuam a dividir-se descontroladamente, levando ao crescimento do tumor. Mutações nos genes EGFR, KRAS ou ALK levam à produção de uma proteína que é ativada constitutivamente e como tal, as células constantemente recebem sinais para proliferar, levando à formação de tumores.<sup>35,36</sup>

Contudo, ainda que com menor frequência, têm sido encontradas nas células somáticas de doentes oncológicos com CPNPC, outras mutações em genes envolvidos na regulação da expressão génica, proliferação, diferenciação celular e apoptose.<sup>34,35</sup>

Podem ocorrer mutações nos genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo dos agentes carcinogénicos de origem ambiental, como as enzimas do citocromo P450 e a Glutathione-S-Transferase (GST) que metabolizam os agentes carcinogénicos do tabaco, tornando-os ativos e disponíveis para formar aductos com o ADN, causando lesões genéticas. Variações genéticas nestes mesmos genes podem ser responsáveis por diferentes riscos de desenvolvimento de cancro do pulmão entre o género masculino e feminino e ainda entre raças.<sup>27,34</sup>

Também o aumento da idade constitui um fator de risco, pois maior é o encurtamento contínuo dos telómeros durante os repetidos ciclos de replicação celular e conseqüentemente, maior é a probabilidade de ocorrência de mutações no ADN.<sup>27,34</sup>

### 3.2.2. Fatores Comportamentais

O tabagismo é o principal fator de risco para o cancro do pulmão, verificando-se uma relação direta entre o número de cigarros consumidos e a duração dos hábitos tabágicos com esse risco. Estudos de incidência de cancro do pulmão relativamente ao estatuto socioeconómico demonstraram que existe um risco global aumentado de desenvolvimento desta neoplasia em indivíduos com níveis de escolaridade e rendimentos reduzidos. Estes resultados têm sido sustentados com a maior prevalência de tabagismo nestes grupos da população.<sup>27,41</sup>

Da dieta humana fazem parte diversas substâncias naturais mutagénicas e antimutagénicas, sendo a dieta típica do mundo ocidental à base de alimentos processados, contendo elevados níveis de gordura e sal, que acoplada à pouca prática de exercício físico por parte da população contribui para o desenvolvimento desta neoplasia.<sup>27,41</sup> Também a existência de patologias pulmonares não malignas, tais como a doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), enfisema pulmonar, asma, bronquite crónica e patologias que provocam lesões fibróticas contribuem para o aumento do risco de cancro do pulmão.<sup>27</sup>

### 3.2.3. Fatores Ambientais

#### 3.2.3.1. Agentes Biológicos

As infeções pulmonares e sistémicas causadas por agentes biológicos como vírus, bactérias e fungos podem desempenhar um papel relevante na indução de carcinogénese. Indivíduos com historial clínico de pneumonia e tuberculose apresentam valores de *odds ratio* (OR) superiores a 1 (o que indica ser um fator de risco), desconhecendo-se, contudo, se os processos inflamatórios relacionados com a infeção aumentam o risco de carcinogénese ou se existe uma fisiopatologia específica relacionada com a doença. A associação entre a infeção pelo vírus do papiloma humano (VPH) e o cancro do pulmão ainda não está comprovada, mas pensa-se que este possa induzir carcinogénese através da sobre expressão das proteínas virais E6 e E7, que se ligam, respetivamente, aos genes supressores de tumor p53 e retinoblastoma (Rb), inibindo a apoptose e ativando a proliferação celular. Tem-se verificado um aumento de cancro do pulmão e, numa idade inferior, em indivíduos infetados pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) relativamente aos indivíduos não imunodeprimidos, desconhecendo-se ainda a causa desta associação. Contudo, pensa-se que este possa resultar do facto das proteínas

envolvidas na replicação viral afetarem a expressão de determinados genes que controlam o ciclo celular do hospedeiro.<sup>27,34</sup>

#### 3.2.3.2. Agentes Químicos

A exposição a determinadas substâncias químicas carcinogénicas pode induzir o processo de carcinogénese. O fumo do tabaco é constituído por cerca de 4000 compostos químicos, dos quais 60 são carcinogénicos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, de que é exemplo o benzopireno. Estes compostos provocam stress oxidativo nas células, através da formação de radicais livres de oxigénio e da indução de resposta inflamatória. Além disso, são responsáveis pela peroxidação lipídica das membranas celulares, desordens lipometabólicas e lesões oxidativas em moléculas como o ADN, promovendo efeitos mutagénicos.<sup>27,34,41</sup>

Dos poluentes gasosos provenientes da combustão de combustíveis fósseis, a exposição ao dióxido de carbono está associada a um aumento do risco de cancro do pulmão. Também a exposição ao fumo resultante do óleo de cozinha e da queima de combustíveis sólidos, como o carvão, aumentam esse risco. A exposição ocupacional a metais pesados como o crómio, níquel e arsénio, ao amianto, sílica e radónio também, dado que originam radicais livres e que dada a sua natureza eletrofílica, vão reagir com os locais nucleofílicos da célula, provocando lesões nos seus alvos: ADN, ácido ribonucleico (ARN) e proteínas celulares, sendo a formação de aductos com o ADN, o principal mecanismo de indução da carcinogénese.<sup>27,34,41</sup>

#### 3.2.3.3. Agentes Físicos

A elevada exposição a agentes carcinogénicos físicos como a radiação ionizante também constitui um fator de risco para o desenvolvimento de cancro do pulmão. Radiação ionizante é toda e qualquer tipo de energia que se propaga através de ondas eletromagnéticas (raios X e raios  $\gamma$ ) ou partículas (prótons, neutrões,  $\alpha$  ou  $\beta$ ) que é capaz de arrancar eletrões de átomos ou moléculas com as quais interage. Pode derivar da radiação cósmica ou do decaimento de elementos radioativos, como o radónio, um gás radioativo inerte que resulta do decaimento do urânio, pois a sua desintegração espontânea liberta energia que poderá resultar na emissão de radiação ionizante. Esta possui diversos efeitos a nível celular (Figura 3.2), que podem ser diretos (durante a irradiação, as cadeias de ADN podem sofrer quebras, alterando-se a estrutura da dupla hélice) ou indiretos (produção de espécies de oxigénio reativas que poderão lesar o

material genético, oxidando-o), aumentando a probabilidade de ocorrência de mutações genéticas.<sup>29,34,41,42</sup>

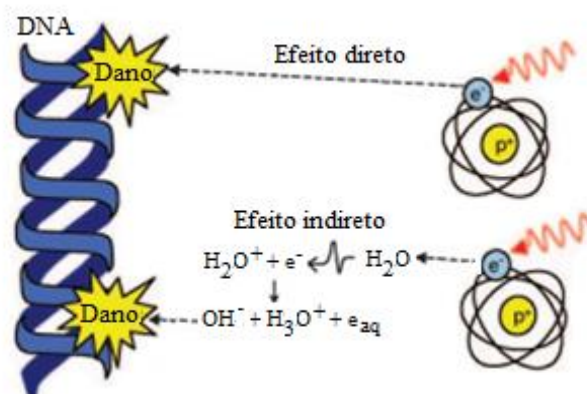


Figura 3.2 – Representação esquemática dos tipos de efeitos da radiação ionizante. [Adaptado de (43)].

### 3.3. Sinais e Sintomas

Numa fase inicial, o cancro do pulmão pode não apresentar quaisquer sinais ou sintomas, que nos estadios mais avançados variam consoante a localização do tumor, isto é, se é circunscrito ao pulmão ou se existem metástases. A principal sintomatologia inclui tosse persistente, dores no tórax, dispneia, sibilância, hemoptise (expulsão de sangue com origem no aparelho respiratório acompanhada de tosse), cansaço, rouquidão, alterações na voz, perda de peso sem uma causa conhecida, pneumonias ou bronquites recorrentes e derrame pleural (efusão pleural). Além destes, existem outros sintomas que se verificam essencialmente quando ocorrem metástases, nomeadamente, perda de apetite, fraqueza, atrofia muscular, fadiga, dores de cabeça, ósseas e articulares, fraturas ósseas não associadas a lesões acidentais, sangramento e sintomas neurológicos (perda de memória ou marcha instável).<sup>41,44-46</sup>

Entre os vários sintomas, embora a tosse seja o mais comum, na maioria das vezes é desvalorizada por estar associada a muitas outras patologias e aos fumadores, que geralmente associado ao tabagismo apresentam tosse. Por outro lado, devido à consciência da população para a gravidade da presença de sangue nas secreções, a hemoptise é o sintoma que mais preocupa os doentes e que os leva a dirigir-se a uma consulta médica.<sup>41,47</sup>

## 3.4. Diagnóstico

---

O processo de diagnóstico é fundamental para saber o tipo histológico e o grau de extensão anatômica da doença, bem como o estado fisiológico do doente. A metodologia diagnóstica deve ser rápida, a menos dispendiosa e agressiva, mas conclusiva sobre o estado de saúde do doente. Deve englobar um cuidadoso exame físico, a avaliação dos antecedentes pessoais, comorbidades, história familiar de cancro, histórico de fumador ou de exposição ambiental ou ocupacional a determinadas substâncias nocivas e ainda o estudo analítico e imagiológico, recorrendo à radiografia torácica, estudos com radioisótopos, ressonância magnética ou tomografia axial computadorizada (TAC), que delinea o tamanho e forma das lesões, a sua localização e a relação com estruturas vizinhas, como vasos, coração, parede torácica e esófago.<sup>48,49</sup>

Contudo, na suspeita de cancro do pulmão é necessária a confirmação diagnóstica cito-histológica. Para tal, recorre-se a métodos como a citologia da expetoração (análise de amostras de expetoração espontâneas ou induzidas por soro hipertónico, sendo a falta de localização da lesão a principal desvantagem), broncofibroscopia (técnica que permite a observação da traqueia e brônquios através da utilização de um tubo rígido ou flexível – um broncofibroscópio – que tem na extremidade um dispositivo para captura de imagens e possui canais que permitem a passagem de instrumentos para aspirar secreções para estudos das células e realizar biópsias em qualquer área suspeita), aspiração transtorácica por agulha (técnica que permite, com a utilização de uma agulha fina, aspirar secreções e realizar biópsias de áreas suspeitas não acessíveis ao broncofibroscópio, requerendo um conhecimento prévio da anatomia da árvore brônquica através de TAC torácica). Além dos métodos anteriores, existe também a sonografia endobrônquica (técnica que consiste na inserção, via broncofibroscópio, de um dispositivo capaz de converter um tipo de energia em outro – um transdutor – nos brônquios permitindo detetar e localizar lesões extra-brônquicas), mediastinoscopia (incisão cervical anterior permitindo o acesso às estruturas adjacentes à traqueia e veia cava superior), mediastinotomia (método cirúrgico mais extenso que o anterior, possibilitando o estudo das áreas inacessíveis a essa técnica), toracocentese (método cirúrgico que permite a colheita de líquido pleural) e toracoscopia (técnica cirúrgica que permite a visualização da cavidade torácica).<sup>48-50</sup>

Quanto mais cedo for realizado o diagnóstico de cancro do pulmão melhor será o prognóstico, contudo, em 80% dos casos de CPNPC a apresentação clínica e imagiológica ocorre apenas nos estadios III e IV, o que dificulta um diagnóstico precoce e diminui a possibilidade de cura.<sup>24</sup>

### 3.5. Estadiamento

---

Em conjunto com o diagnóstico histológico, o estadiamento no cancro do pulmão é essencial para ajudar o clínico no planeamento da abordagem terapêutica, fornecer indicações de prognóstico para cada estágio e auxiliar na avaliação dos resultados do tratamento implementado. Este divide-se em dois componentes principais, o estadiamento fisiológico e o estadiamento anatómico.<sup>51</sup>

O estadiamento fisiológico consiste na avaliação da capacidade de um indivíduo suportar determinado tratamento antitumoral. Outras comorbilidades não-neoplásicas (como anemias, desequilíbrios hidroeletrólíticos, infeções, arritmias) podem condicionar a abordagem terapêutica e como tal devem ser investigadas, e se possível tratadas, com o intuito de melhorar a condição do doente, que deve ter uma função pulmonar que lhe permita uma vida ativa após a realização do tratamento.<sup>46,49</sup>

O estadiamento anatómico consiste na determinação da localização e extensão do tumor e possíveis locais de metastização. Esta avaliação é baseada no sistema internacional de estadiamento TNM, em que T é determinado pelo tamanho, localização e extensão do tumor primário, N especifica o envolvimento dos gânglios linfáticos regionais e M descreve a presença ou ausência de metástases à distância. Da avaliação destes três descritores surgem quatro estadios clínicos, divididos de I a IV, com prognóstico e possibilidade de cura decrescentes.<sup>47,52,53</sup>

### 3.6. Terapêutica Convencional

---

As principais formas de tratamento do cancro do pulmão incluem a cirurgia, RT, QT, imunoterapia e terapias-alvo, ou associações entre estas. A escolha da modalidade terapêutica deve ter em conta as preferências do doente e a relação benefício-risco, de

modo a selecionar a opção mais adequada para o doente, tendo em consideração as características do tumor (estadio da doença, histologia e potenciais mudanças moleculares dentro do tumor), bem como, a idade, condição física e comorbilidades do doente.<sup>48,54,55</sup>

### **3.6.1. Cirurgia**

A cirurgia consiste na remoção da porção pulmonar afetada pelo tumor, recorrendo a métodos invasivos. Consoante a extensão real do tumor e a necessidade de preservação da função pulmonar, há três tipos de cirurgia que podem ser realizados em doentes com cancro do pulmão: ressecção segmentar (segmentectomia), lobectomia e pneumonectomia. Na ressecção segmentar ocorre a remoção de uma pequena parte do lóbulo que contém o tumor, podendo esta ser a escolha quando o doente não tem uma função pulmonar suficiente para resistir à remoção de todo o lóbulo. A lobectomia consiste na remoção do lóbulo que contém o tumor e é a cirurgia mais utilizada para o tratamento desta neoplasia se os pulmões do doente forem suficientemente saudáveis, uma vez que pode aumentar a probabilidade de cura do cancro. A pneumonectomia corresponde à remoção total do pulmão, podendo ser necessária caso o tumor esteja perto do centro do tórax. Qualquer que seja o método escolhido pelo cirurgião, este deve ser acompanhado da dissecação dos gânglios linfáticos mediastínicos.<sup>48,55-57</sup>

Constitui o tratamento de escolha nos doentes que se encontram nos estadios I, II e IIIA do CPNPC, ou seja, em tumores localizados. Nos estadios II e IIIA, a cirurgia pode ser complementada com RT ou QT adjuvante na redução do risco de recidivas, com o objetivo de eliminar as células cancerígenas remanescentes e, conseqüentemente, prolongar a sobrevivência do doente. Em alguns casos, pode-se recorrer à QT ou RT, previamente ao procedimento cirúrgico, com o intuito de reduzir as dimensões da massa tumoral e converter um tumor não operável em operável.<sup>46,49,55,56,58</sup>

### **3.6.2. Radioterapia**

A radioterapia consiste na utilização de feixes de alta energia com o objetivo de provocar lesões no material genético das células cancerígenas, destruindo-as e, conseqüentemente, erradicando o tumor. Afeta também as células normais dos tecidos circundantes, causando efeitos adversos indesejados que incluem a fadiga, náuseas, vômitos, perda de apetite e mudanças de pele na área tratada. No tórax, a RT pode levar a efeitos como a esofagite e pneumonite, causando tosse e dispneia, durante o tratamento.<sup>55,59</sup>

Este procedimento pode ser utilizado em todos os estádios de desenvolvimento do CPNPC. No estádio I pode ser uma alternativa à cirurgia, essencialmente se o tumor for inoperável devido ao seu tamanho ou local, ou se o estado de saúde do doente não permitir a cirurgia. Por sua vez, nos estádios II, IIIA e IIIB pode ser utilizada em protocolos combinados com a cirurgia e/ou QT, pois nos estádios mais avançados desempenha um papel relevante no controlo local da doença, além de reduzir o desenvolvimento de metástases. A radiação pode ainda ser usada como um tratamento paliativo, aliviando os sintomas e melhorando a qualidade de vida do doente no caso de a doença estar avançada e/ou disseminada para outros órgãos, ou seja, no estádio IV.<sup>46,48,59</sup>

### **3.6.3. Quimioterapia**

A quimioterapia consiste na administração por via oral, sobre a forma de comprimidos, ou por via intravenosa (IV), através de uma injeção direta na veia ou através de um cateter (tubo colocado numa veia), de fármacos anticancerígenos com o intuito de eliminar as células tumorais do organismo. Estes fármacos podem ser classificados em agentes alquilantes, antibióticos antitumorais, antimetabolitos, alcalóides e taxanos. Os agentes alquilantes (como a cisplatina e carboplatina) formam ligações com as cadeias de ADN, impedindo a sua replicação; os antibióticos antitumorais (como o etoposido) inserem-se nas cadeias de ADN e quebram a ligação da molécula ou inibem a síntese de ARN; os antimetabolitos (como a gemcitabina e o pemetrexede) inibem a biossíntese dos componentes essenciais dos ácidos nucleicos; os alcalóides (como a vinblastina) e os taxanos (como o paclitaxel (PTX) e o docetaxel (DTX)) interferem com os microtúbulos que formam os fusos acromáticos necessários para que ocorra a divisão celular.<sup>60,61</sup>

Os fármacos utilizados na QT atuam nas células que se dividem rapidamente, sendo por isso as células tumorais muito vulneráveis. Contudo, outras células do organismo, como as da medula óssea (onde são sintetizadas novas células sanguíneas), do epitélio gastrointestinal e dos folículos pilosos, têm uma elevada taxa de divisão, tornando-as, igualmente, alvo desses fármacos. Por esta razão, esta opção terapêutica tem uma elevada toxicidade e é realizada em ciclos com períodos de descanso entre estes, com o intuito de minimizar os efeitos secundários (como leucopénias, anemia, alopecia, náuseas, vômitos, diarreia, entre outros) ao permitir a recuperação das células normais e do tecido hematopoiético.<sup>60,62</sup>

A QT é indicada para os estadios mais avançados de CPNPC, nomeadamente, quando já existem metástases (estadio IV).<sup>61</sup> Apesar de poder ser utilizada isoladamente, normalmente é utilizada em associação terapêutica. Pode ser administrada antes da cirurgia ou RT com o objetivo de reduzir as dimensões do tumor (terapia neoadjuvante), como terapia adjuvante para reduzir a taxa de recidivas, em terapia concomitante com RT para tumores inoperáveis e ainda no tratamento paliativo, melhorando a qualidade de vida dos doentes com tumores incuráveis.<sup>48,55,60</sup>

#### **3.6.4. Imunoterapia**

A imunoterapia consiste na estimulação do sistema imunitário do doente para combater o cancro. Determinadas células cancerosas apresentam características das células saudáveis para que o sistema imunitário não as consiga diferenciar e assim evitem ser destruídas. Alguns fármacos, como o Nivolumab, Pembrolizumab e Atezolizumab, têm o objetivo de impedir esse mecanismo de defesa das células tumorais, ou seja, que essas células apresentem à superfície as moléculas características das células saudáveis, permitindo assim que o sistema imune as reconheça como estranhas ao organismo.<sup>55,63</sup>

Estes fármacos são administrados por infusão IV a cada duas ou três semanas, causando diversos efeitos adversos, tais como fadiga, tosse, náuseas, erupções cutâneas, perda de apetite, diarreia e, com menor frequência, o sistema imune pode atacar outras partes do próprio organismo, levando a pneumonites, hepatites, colites, tiroidites, entre outros.<sup>63</sup>

A imunoterapia é o tratamento indicado em casos de CPNPC localmente avançado ou metastático, em que houve crescimento tumoral após um tratamento prévio de QT.<sup>55,63,64</sup>

#### **3.6.5. Terapias-Alvo**

O reconhecimento da importância de biomarcadores moleculares específicos na patogenia do CPNPC levou à aplicação de terapias-alvo, isto é, à administração de fármacos ou anticorpos monoclonais contra alvos específicos, cujo objetivo é fornecer o fármaco correto ao doente certo, procurando aumentar assim a resposta ao tratamento. Os doentes nos estadios avançados são submetidos a testes para mutações em genes específicos responsáveis pela iniciação e manutenção da doença, sendo que as mais estudadas incluem o EGFR e o ALK, permitindo que o tratamento de primeira linha para

indivíduos com resultado positivo para estas mutações envolva uma terapêutica dirigida, enquanto o tratamento preferível nos indivíduos sem mutações nestes genes seja a QT.<sup>48,55,64,65</sup>

Para inibir a via de sinalização do EGFR pode-se impedir a ligação do ligando ao domínio extracelular do recetor com um anticorpo monoclonal, como o Cetuximab e o Panitumumab, que promovem a degradação do recetor, ou pode-se bloquear a ligação da molécula de adenosina trifosfato (ATP) ao local catalítico do domínio da tirosina cinase do EGFR, inibindo a sua autofosforilação, com o Erlotinib e o Gefitinib, entre outros. Por outro lado, o Crizotinib e o Ceritinib são inibidores competitivos do ATP no domínio da tirosina cinase do ALK, sendo úteis no tratamento do CPNPC em doentes com uma mutação no gene que codifica esta proteína.<sup>48,55,64,66</sup>

## 4. Nanotecnologia: Uma realidade em pequena escala

---

A nanotecnologia consiste no desenvolvimento de estruturas e sistemas à escala nanométrica (Figura 4.1), onde pelo menos uma dimensão se encontra na gama de 1-100 nanómetros (nm), correspondendo um nanómetro a  $1 \times 10^{-9}$  do metro. As nanopartículas possuem determinadas propriedades únicas que lhes conferem uma vasta gama de aplicações nas áreas da Ciência, Engenharia e, especialmente, da Medicina. Exemplo dessas propriedades são a elevada razão entre área superficial/volume, alta energia superficial, propriedades mecânicas, térmicas, elétricas, magnéticas e óticas, bem como a interação biológica com as biomoléculas, cujas dimensões se encontram dentro da mesma ordem de grandeza, como é o caso das proteínas que têm aproximadamente um tamanho entre 3 e 10 nm.<sup>12,67,68</sup>

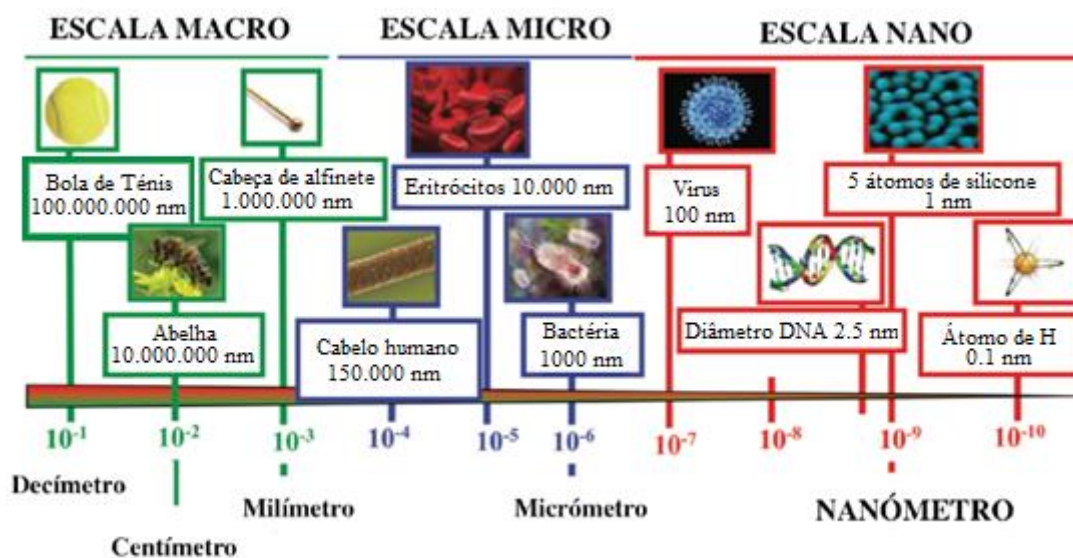


Figura 4.1 – Correlação de dimensões com a escala nanométrica. [Adaptado de (69)].

No campo da Medicina, a aplicação de nanotecnologia designa-se por nanomedicina e procura abordar alguns desafios e deficiências médicas enfrentados pela medicina convencional, que incluem a toxicidade sistémica e orgânica, baixa biodisponibilidade e falta de especificidade para os alvos terapêuticos, entre outros. As principais aplicações da nanotecnologia neste campo são os sistemas de libertação controlada de fármacos para diagnóstico e tratamento, através do fornecimento de substâncias ativas a um determinado alvo específico; o tratamento do cancro, através da deteção e destruição do tumor; e a restauração de órgãos humanos e aplicação de implantes com maior biocompatibilidade. Assim, de uma forma geral, a nanomedicina pode ser utilizada na prevenção, monitorização, diagnóstico, controlo e tratamento de algumas patologias. Dados os avanços desta tecnologia, verificam-se já alguns casos

reportados de combinação das várias abordagens. Neste contexto, sobressaem os trabalhos na área do teranóstico, em que se utiliza um sistema que desempenha simultaneamente as suas funções ao nível do diagnóstico e do tratamento.<sup>12,68</sup>

## 4.1. Nanossistemas

---

Os nanossistemas são um termo genérico que engloba uma diversidade de estruturas nanométricas, com diferentes formas, tamanhos, composição e capacidade de armazenamento/transporte.<sup>67,70</sup> Embora o conceito de nanotecnologia, de acordo com a norma ISO 80004-1, considere que os nanossistemas são estruturas de tamanhos variando de 1 a 100 nm em pelo menos uma dimensão, o prefixo “nano” é habitualmente utilizado na nanomedicina para partículas com dimensões na ordem das centenas de nanómetros, até 1000 nm.<sup>14,69,71</sup>

A literatura descreve vários nanossistemas que são utilizados no campo da medicina como ferramentas terapêuticas e desenhados para se acumularem especificamente nos locais do organismo onde são necessários, com o intuito de aumentar a eficácia terapêutica e simultaneamente minimizar a toxicidade associada. Alguns desses nanossistemas têm inúmeras aplicações na área do cancro, quer no diagnóstico quer na terapêutica e encontram-se descritos abaixo.<sup>70</sup> Será dada mais ênfase aos lipossomas por constituírem os sistemas alvo deste trabalho.

### 4.1.1. Lipossomas

Os lipossomas foram os primeiros nanossistemas a serem investigados como transportadores de fármacos. São vesículas esféricas constituídas por uma ou várias bicamadas concêntricas de fosfolípidos (moléculas compostas por uma cabeça hidrofílica e duas caudas hidrofóbicas) e esteróis. Desde que a concentração de lípido seja suficiente, os lipossomas formam-se espontaneamente em ambiente aquoso através de interações hidrofílicas e hidrofóbicas entre os fosfolípidos, de modo a que as cabeças hidrofílicas fiquem orientadas para o meio aquoso enquanto as caudas ficam orientadas umas para as outras. Desta forma, os lipossomas possuem um núcleo hidrofílico delimitado por uma dupla membrana hidrofóbica e com uma superfície hidrofílica (Figura 4.2), permitindo a encapsulação, transporte e libertação de moléculas solúveis em água ou em lípidos.<sup>12,69,72,73</sup>

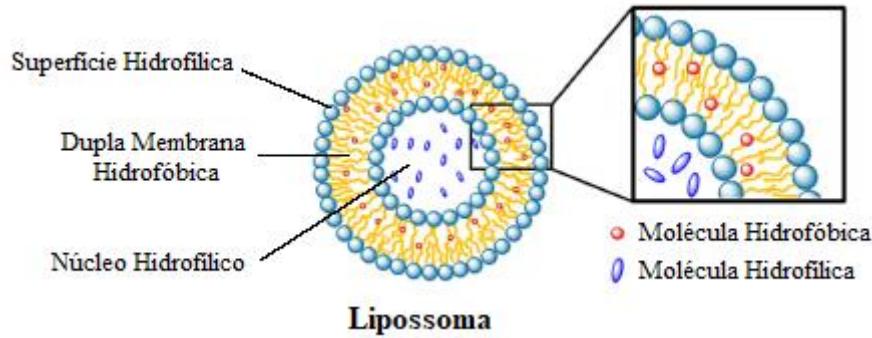


Figura 4.2 – Representação esquemática da estrutura de um lipossoma. [Adaptado de (73)].

Os fosfolípidos podem ser de origem natural ou sintética, sendo os mais utilizados a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilglicerol. Além destes, os lipossomas possuem na sua composição esteróis, com o intuito de diminuir a fluidez da membrana, reduzindo a permeabilidade das moléculas hidrossolúveis através da mesma e aumentando a sua estabilidade em fluidos biológicos. O esterol mais utilizado na preparação de lipossomas é o colesterol.<sup>74,75</sup>

Este tipo de nanossistema pode ser classificado tendo em conta o método de preparação ou as suas dimensões e o número de bicamadas fosfolipídicas que possui na sua constituição. Cada bicamada lipídica designa-se por lamela e os lipossomas podem ser divididos em vesículas unilamelares (ULV), constituídas apenas por uma bicamada, vesículas multilamelares (MLV), quando contêm várias bicamadas, ou vesículas multivesiculares (MVV), quando contêm várias vesículas confinadas no interior de uma maior (Figura 4.3). Os lipossomas do tipo multilamelar e multivesicular apresentam normalmente dimensões compreendidas entre 1 e 5 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ), enquanto os lipossomas do tipo unilamelar podem ainda ser subdivididos em vesículas unilamelares pequenas (SUV), vesículas unilamelares grandes (LUV), e vesículas unilamelares gigantes (GUV), com um tamanho inferior a 100 nm, entre 100 e 1000 nm e superior a 1000 nm, respetivamente.<sup>69,76-78</sup>

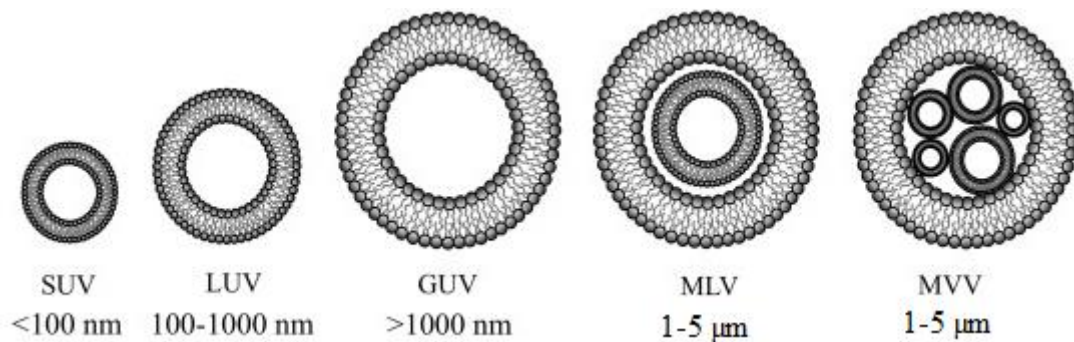


Figura 4.3 – Representação esquemática dos diversos tipos de lipossomas, de acordo com as dimensões e o número de bicamadas fosfolipídicas constituintes. [Adaptado de (79)].

Além disso, os lipossomas podem também ser classificados quanto à sua composição. Os lipossomas convencionais, considerados os de primeira geração, são constituídos, normalmente, por fosfolípidos e colesterol. Podem ser neutros ou carregados negativamente. A sua principal característica, que se traduz na maior desvantagem, é um tempo de circulação plasmática muito curto dada a inexistência de modificações na sua superfície, o que faz com que após a sua administração, estes sejam reconhecidos pelo sistema reticuloendotelial (RES) e, conseqüentemente, sejam rapidamente removidos da circulação sanguínea. Os lipossomas com longo tempo de circulação plasmática, considerados os de segunda geração, tal como indicado pelo nome, surgiram para colmatar a principal desvantagem associada aos congêneres de primeira geração. Podem também ser designados por lipossomas estabilizados estericamente. Estas estruturas caracterizam-se pela presença de substâncias hidrofílicas na sua superfície, por exemplo polímeros, que previnem a adsorção de componentes em circulação à superfície dos lipossomas, diminuindo assim a sua opsonização e conseqüente eliminação pelo RES, aumentando o seu tempo em circulação. Existem também os lipossomas catiónicos, facilmente distinguíveis dos restantes pela presença na sua composição de lípidos catiónicos, como o 1,2-dioleoil-3-dimetilamónio-propano (DODAP). Estes têm sido utilizados essencialmente como transportadores de material genético, mas dada a facilidade de ligação com o endotélio vascular e locais inflamados, podem ser aplicados noutras vertentes da oncologia. Por último, tem-se os lipossomas direcionados, que possuem ligandos de reconhecimento acoplados à sua superfície, permitindo direcionar seletivamente o fármaco encapsulado na estrutura para o local alvo, onde existe uma sobre expressão de recetores específicos para esses ligandos, tais como anticorpos (imunolipossomas), péptidos, polissacarídeos e proteínas virais, entre outros.<sup>74,80,81</sup>

Existem múltiplos métodos de preparação de lipossomas que levam à formação de diferentes tipos de vesículas, que diferem nas suas dimensões e no número de camadas que se obtêm. A escolha do método mais apropriado depende de diversos fatores, nomeadamente, das características físico-químicas dos constituintes do lipossoma e da molécula a encapsular, da sua toxicidade e concentração, do tipo de meio no qual estas estruturas se dispersam, das dimensões e tempo de semivida desejada para que a aplicação seja bem-sucedida, bem como dos custos associados e da reprodutibilidade em larga escala. A hidratação de um filme lipídico é uma das técnicas de preparação de lipossomas mais utilizadas, iniciando-se com a dissolução de lípidos num solvente orgânico, seguido da sua evaporação, formando-se o filme lipídico. A hidratação deste com água ou solução tampão, com agitação magnética, promove a formação de MLV, podendo o fármaco ser incorporado na solução aquosa, caso seja hidrofílico, ou dissolvido nos lípidos, caso seja hidrofóbico.<sup>74,77,78</sup>

Com o intuito de produzir ULV pequenas e grandes a partir dessas MLV, podem ser aplicados processos mecânicos, eletrostáticos ou químicos. Entre os processos mecânicos destacam-se a extrusão (processo que consiste na passagem forçada das MLV através de poros com dimensões bem definidas, induzindo a formação de ULV) e a sonicação (processo que consiste na formação de ULV após a incidência de ondas ultrassónicas sobre as MLV). Entre os processos químicos destaca-se o método de injeção de um solvente orgânico, que consiste na dissolução dos lípidos em etanol ou éter, seguido da sua injeção numa solução aquosa aquecida, com conseqüente evaporação do solvente.<sup>74,77,78</sup>

A eficiência da encapsulação dos fármacos nos lipossomas depende de vários fatores que provêm das propriedades tanto dos lipossomas como dos fármacos encapsulados. Em relação aos fármacos encapsulados, a eficiência da encapsulação é afetada pelas suas propriedades hidrofílicas, lipofílicas ou anfipáticas, ou seja, a sua distribuição nestas estruturas varia em função do seu coeficiente de partilha octanol:água ( $\log P_{oct}$ ). Quanto às propriedades dos lipossomas, o volume aquoso, rigidez da membrana, área superficial e os métodos de preparação influenciam a eficiência da encapsulação. De um modo geral, as substâncias hidrofílicas (coeficiente de partilha octanol:água reduzido) não interagem com os lípidos da bicamada lipídica, sendo encapsulados no núcleo interno aquoso dos lipossomas. As substâncias lipofílicas (coeficiente de partilha octanol:água elevado) distribuem-se na zona hidrofóbica da

bicamada, enquanto as substâncias anfipáticas (coeficiente de partilha intermédio) são distribuídas entre a bicamada lipídica e a fase aquosa que a rodeia.<sup>82,83</sup>

Neste contexto, é possível distinguir dois mecanismos de incorporação de fármacos em lipossomas: a encapsulação passiva e a encapsulação ativa. A encapsulação passiva é um processo físico simples que se aplica a fármacos com características hidrofóbicas e hidrofílicas. No caso de fármacos hidrofóbicos, estes são dissolvidos no solvente orgânico onde se realiza a mistura dos componentes lipídicos. Após a fase de secagem, essa mistura é submetida a uma hidratação em solução aquosa que permite a formação espontânea de lipossomas e a consequente incorporação desses fármacos no interior da bicamada fosfolipídica. No caso de fármacos hidrofílicos, estes são solubilizados num meio aquoso que posteriormente é utilizado para hidratar um filme lipídico seco, sendo que a encapsulação ocorre na sequência desse processo de hidratação e durante a formação espontânea dos lipossomas. Por outro lado, a encapsulação ativa é um processo aplicado a fármacos que sejam ácidos/bases fracas, como a doxorrubicina (DOX) e a vincristina. A existência de um gradiente crescente de pH ou de iões capazes de gerar esse gradiente (como o sulfato de amónio) do exterior para o interior dos lipossomas, permite que os fármacos, na sua forma neutra, atravessem a bicamada lipídica dos lipossomas pré-formados e, no seu interior, devido à diferença de pH, adquiram carga elétrica que impede a sua difusão através da bicamada, permanecendo encapsulados nos lipossomas.<sup>83-85</sup>

A aplicação de lipossomas na terapêutica antitumoral, nomeadamente, no tratamento do CPNPC será abordada com maior detalhe no capítulo 5.

#### **4.1.2. Nanopartículas Lipídicas Sólidas**

As nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) surgiram com o intuito de colmatar as falhas verificadas nos lipossomas, continuando a reunir as principais vantagens encontradas nestes últimos. São partículas esféricas com dimensões de 10-1000 nm, constituídas por uma matriz lipídica sólida, ou seja, por lípidos sólidos à temperatura ambiente e corporal, como os mono-, di-, triglicéridos, ácidos gordos e ceras, estabilizada por um ou vários agentes tensioativos. Estas nanopartículas, consoante o seu método de preparação, podem ser utilizadas para encapsular fármacos hidrofóbicos ou hidrofílicos.

<sup>12,69,86</sup>

Promovem uma libertação prolongada do fármaco, permitindo um aumento da sua estabilidade e diminuição da degradação química após administração por vias parentéricas e não parentéricas. Apresentam ainda como vantagens a elevada biodegradabilidade e biocompatibilidade, bem como a reduzida citotoxicidade. Contudo, a utilização de lípidos com elevado grau de cristalinidade leva à formação de cristais perfeitos, isto é, de estruturas muito ordenadas, pelo que as SLN têm como principais limitações a baixa capacidade de carga e a facilidade de expulsão do fármaco durante o armazenamento.<sup>54,69,87</sup>

### **4.1.3. Transportadores Lipídicos Nanoestruturados**

Na tentativa de minimizar as limitações apresentadas pelas SLN surgiu uma segunda geração de nanopartículas lipídicas, os transportadores lipídicos nanoestruturados (NLC). São constituídos por uma combinação de lípidos sólidos e líquidos (óleos) à temperatura ambiente, resultando numa estrutura cristalina menos ordenada ou numa estrutura sólida amorfa. A incorporação de lípidos líquidos na matriz lipídica sólida leva a uma maior distância entre as cadeias constituintes dos lípidos da matriz. Deste modo, para além das vantagens descritas para as SLN, estas estruturas apresentam uma maior capacidade de carga e libertação controlada dos fármacos à medida que estes se dissolvem no óleo e simultaneamente são encapsuladas na matriz lipídica sólida.<sup>88,89</sup>

A escolha dos lípidos utilizados na formulação de NLC depende das propriedades físico-químicas do fármaco veiculado e da via de administração pretendida. Os lípidos líquidos mais utilizados são os triglicéridos dos ácidos cáprico, caprílico, caproico, bem como o esqualeno e a vitamina E. Por sua vez, o ácido esteárico, palmitoestearato de glicerol e o palmitato de cetilo são alguns dos lípidos sólidos mais utilizados nestas formulações.<sup>88,89</sup>

### **4.1.4. Nanopartículas Poliméricas**

As nanopartículas poliméricas são partículas sólidas, coloidais, cujas dimensões são aceites genericamente no intervalo entre 10 e 1000 nm. De acordo com a sua composição, o que também limita os métodos aplicados na preparação, podem obter-se dois tipos de nanopartículas poliméricas, as nanoesferas e as nanocápsulas, que apresentam propriedades distintas para a vetorização dos fármacos (Figura 4.4). As nanoesferas são partículas com matriz polimérica compacta, na qual o fármaco pode ser

dissolvido, adsorvido, encapsulado ou conjugado com esta. As nanocápsulas são sistemas do tipo reservatório, nas quais o fármaco se encontra numa cavidade interna rodeada por uma membrana polimérica.<sup>70,86</sup>

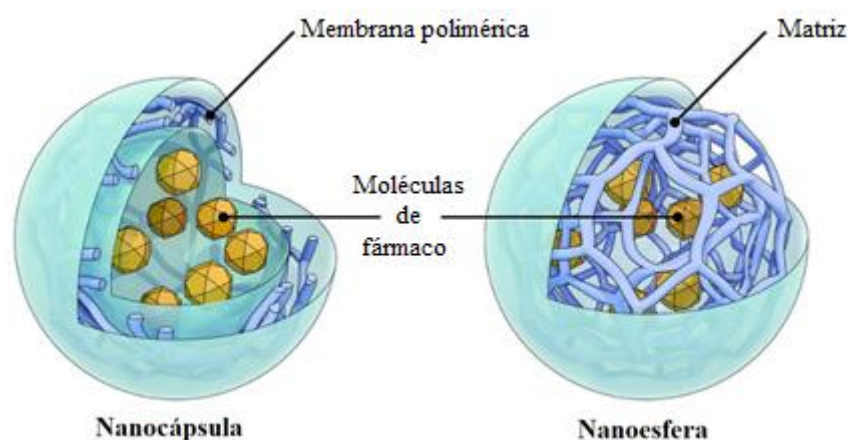


Figura 4.4 – Representação esquemática da estrutura de uma nanocápsula e de uma nanoesfera. [Adaptado de (90)].

Estas estruturas são produzidas a partir de polímeros naturais, como o quitosano, albumina, gelatina, alginato e colagénio, ou sintéticos, como o ácido polilático, a policaprolactona, o poliácrlato e o ácido polilático-co-glicólico. Em alguns casos, as nanopartículas poliméricas são revestidas com tensioativos não iónicos, como os ésteres de sorbitano e os polissorbitatos, de modo a reduzir as interações intermoleculares entre os grupos químicos da superfície destas partículas, bem como as interações imunológicas que as envolvem. A cobertura da superfície com estes tensioativos não iónicos promove uma estabilidade estérica, ao formar-se uma barreira mecânica que constitui um obstáculo à aproximação das proteínas plasmáticas, impedindo o fenómeno de opsonização e a captura destas estruturas pelas células fagocitárias. Isto deve-se essencialmente ao facto das principais causas do efeito de opsonização e eliminação das nanopartículas pelo sistema fagocitário serem a polaridade da superfície, o tamanho das partículas e a presença de cadeias longas.<sup>69,73,91</sup>

As nanopartículas poliméricas são excelentes transportadores de fármacos com utilidade no diagnóstico e/ou terapêutica. Em comparação com outros nanossistemas, nestas estruturas é possível controlar a libertação dos fármacos através da manipulação dos polímeros que as constituem. Além disso, apresentam endocitose celular eficiente, têm a capacidade de transportar um elevado número de fármacos distintos e a

possibilidade de modificação das propriedades da superfície permite aumentar o seu tempo de circulação na corrente sanguínea.<sup>12,73,92</sup>

Relativamente aos polímeros utilizados na constituição das nanopartículas poliméricas, os de origem natural conferem maior propensão para elevada biocompatibilidade, baixa toxicidade e são facilmente degradados do organismo através das vias metabólicas naturais. Contudo, antes de serem utilizados, têm de ser submetidos a um processo de purificação para minimizar a possibilidade de provocarem reações imunológicas.<sup>12,92</sup>

#### **4.1.5. Micelas**

As micelas são vesículas esféricas, com diâmetro entre 10 e 100 nm, que resultam da organização espontânea em meio aquoso de moléculas copoliméricas anfifílicas. A concentração dessas moléculas no meio tem de ser superior à concentração micelar crítica (CMC), pois abaixo desse valor não ocorre formação de micelas. Possuem um núcleo com propriedades hidrofóbicas, tornando-o um reservatório para fármacos pouco solúveis em água, através de interações não específicas ou covalentes com o domínio hidrofóbico dos copolímeros, ou para macromoléculas hidrofílicas que possuem carga (como os ácidos nucleicos, péptidos e proteínas) por meio de interações eletrostáticas com os domínios de carga oposta do polímero. Por sua vez, a superfície é constituída por polímeros hidrofílicos, como o polietilenoglicol (PEG), estabilizando o interior hidrofóbico.<sup>70,91</sup>

Estas estruturas aumentam a biodisponibilidade de fármacos com baixa solubilidade, protegendo-os da degradação *in vivo*, e proporcionam uma libertação controlada do fármaco incorporado, minimizando a sua toxicidade e efeitos adversos. Além disso, a conjugação de ligandos, tais como pequenas moléculas orgânicas, péptidos e anticorpos monoclonais na superfície das micelas, permite uma vetorização destas para determinados alvos específicos, como é o caso das células tumorais, aumentando não só a sua acumulação, como também a captação celular através de endocitose mediada por um recetor.<sup>73,93</sup>

#### **4.1.6. Dendrímeros**

Dendrímeros são moléculas poliméricas e sintéticas de dimensões nanométricas, compostas por um núcleo central a partir do qual emergem, de uma forma ordenada e

simétrica, múltiplas unidades funcionais (monómeros) altamente ramificadas. À medida que são introduzidas novas ramificações, a camada em redor do núcleo central aumenta e, conseqüentemente, aumenta a geração.<sup>70,94</sup> Estas estruturas podem ser obtidas por dois métodos distintos, o divergente e o convergente. Segundo a abordagem divergente, a mais utilizada, os dendrímeros são formados a partir do núcleo central, sendo posteriormente introduzidas sucessivas camadas de ramificações, ao passo que numa abordagem convergente, diversos segmentos de dendrímeros são preparados individualmente e apenas são ligados entre si no passo final.<sup>93,95</sup>

A biocompatibilidade, o controlo do tamanho, peso molecular, forma, composição química, bem como a possibilidade de modificação das moléculas da superfície são as principais propriedades deste tipo de nanossistema. Estas tornam-no útil para a veiculação de fármacos, que podem ser encapsulados na estrutura interna dos dendrímeros, nomeadamente quando são lábeis, tóxicos ou pouco solúveis, ou que podem ligar-se covalentemente à superfície dos mesmos.<sup>70,69,86</sup>

Os dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM), polipropilenoimina (PPI) e poliéterhidroxilamina (PEHAM) são alguns exemplos deste tipo de nanossistema, sendo o PAMAM o mais utilizado como matriz para a conjugação com fármacos.<sup>86,94</sup>

#### **4.1.7. Hidrogéis**

Os hidrogéis são estruturas poliméricas tridimensionais, hidrofílicas, sendo a capacidade de absorção de elevadas quantidades de água ou fluidos biológicos a sua propriedade principal. Os componentes dos polímeros hidrofílicos são reticulados numa rede por interações covalentes e não covalentes, sendo a reticulação fundamental para proporcionar estabilidade dimensional ao hidrogel e para evitar a dissolução das cadeias hidrofílicas, enquanto o alto teor de solvente proporciona propriedades de transporte semelhantes a fluidos.<sup>70,95,96</sup>

Estas estruturas podem ser produzidas a partir de polímeros naturais, como o quitosano, ácido hialurónico, dextrano, alginato, colagénio e gelatina, ou sintéticos, como o álcool polivinílico, polietilenoimina e polivinilpirrolidona, entre outros. Normalmente, os hidrogéis são sintetizados na ausência de fármaco, e posteriormente são carregados com este através de mecanismos que envolvem interações não covalentes entre o fármaco e a matriz polimérica. Isto resulta numa capacidade de carga de fármaco relativamente elevada que, aliando às restantes propriedades dos hidrogéis que podem ser manipuladas,

tais como a flexibilidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e a elevada capacidade de absorção de água, tornam estas estruturas interessantes enquanto veículos de fármacos à escala nanométrica.<sup>91,95,96</sup>

#### 4.1.8. Conjugados polímero-fármaco

Os conjugados polímero-fármaco consistem na ligação de polímeros macromoleculares hidrossolúveis a fármacos pouco solúveis em água, através de uma ligação química reversível. Os polímeros usados para o efeito podem ser naturais, como a albumina e o quitosano, ou sintéticos, como o PEG, ácido poli-L-glutâmico, N-(2-hidroxipropil)-metacrilamida e o poliestireno-co-anidrido maleico.<sup>93,97</sup>

Estes conjugados têm dimensões entre 5 e 20 nm e um peso molecular elevado, permitindo um maior tempo de semivida do complexo em circulação, e uma maior acumulação em determinados locais do organismo, nomeadamente nos tecidos tumorais. Adicionalmente, permitem a ausência de resposta imune e uma maior solubilidade e biodisponibilidade do fármaco, bem como uma libertação controlada deste, aumentando a eficácia terapêutica e minimizando os efeitos secundários, ou seja, a sua toxicidade.<sup>91,97-99</sup>

#### 4.1.9. Nanotubos de Carbono

Os nanotubos de carbono (CNT) são estruturas cilíndricas de carbono compostas por anéis benzénicos, podendo as suas dimensões variar da escala nanométrica à micrométrica. Tendo em conta a sua estrutura, podem ser divididos em nanotubos de parede única (SWCNTs), formados por uma camada cilíndrica simples, ou nanotubos de parede múltipla (MWCNTs), formados por várias camadas cilíndricas (Figura 4.5).<sup>69,86,93</sup>

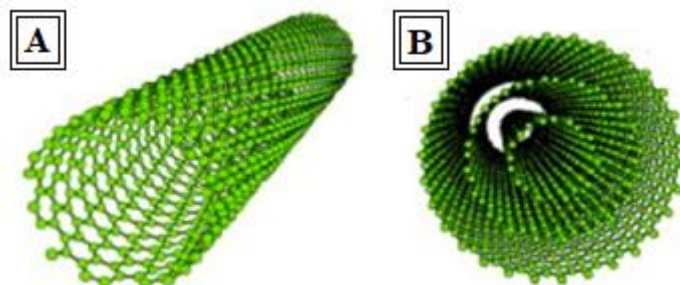


Figura 4.5 – Representação esquemática da estrutura de nanotubos de carbono. A: Nanotubo de parede única. B: Nanotubo de parede múltipla. [Adaptado de (100)].

A estrutura dos CNT permite que estes tenham diversas aplicações biomédicas, como a veiculação de fármacos, uma vez que consoante os objetivos pretendidos, pode-se promover a adsorção de fármacos na sua superfície ou encapsular fármacos na região interna. Esta última apresenta como principais vantagens a proteção do fármaco, prevenindo a sua degradação durante o transporte e promovendo a sua libertação apenas em determinadas condições específicas. Outras vantagens são as dimensões e geometria, que favorecem a entrada dos CNT nas células por difusão passiva, através da bicamada lipídica, ou por endocitose, onde ocorre internalização dos CNT após a sua ligação à membrana, bem como a possibilidade de modificação química da sua superfície, permitindo melhorar a sua biocompatibilidade, biodisponibilidade e biodegradação, diminuindo a toxicidade no organismo.<sup>12,68,69,98</sup>

#### **4.1.10. Nanopartículas Metálicas**

As nanopartículas metálicas são um sistema nanoparticulado inorgânico. Comparativamente às restantes nanopartículas, estas têm dimensões menores, entre 5 e 40 nm, e não possuem uma estrutura flexível, apresentando diversas potencialidades na área da medicina, nomeadamente ao nível da imagiologia e veiculação de fármacos para tratamento de tumores.<sup>87,93,99</sup>

Entre as diversas nanopartículas metálicas, destacam-se pelas propriedades óticas e eletrónicas as que apresentam na sua composição metais nobres, tais como o ouro e a prata. As nanopartículas de ouro não são tóxicas, são inertes e constituídas por uma parte central de átomos de ouro e por uma superfície que pode ser funcionalizada através da adição de grupos que contêm tiol, controlando a estabilidade e solubilidade das partículas, bem como as suas interações com o meio biológico. Têm a capacidade de veiculação de fármacos altamente tóxicos, reduzindo a sua toxicidade sistémica, sendo a sua principal aplicação a nível oncológico a hipertermia. Nesta, através da absorção de energia e da sua conversão em calor, as nanopartículas de ouro levam à ablação das células cancerígenas, destruindo as membranas celulares. As nanopartículas de prata são estáveis em solução aquosa, têm uma distribuição precisa, são biocompatíveis e têm a capacidade de entrar nas células tumorais e inibir a sua viabilidade, através da indução da apoptose. Deste modo, para além das suas propriedades antimicrobianas, que derivam da elevada citotoxicidade para uma grande diversidade de microrganismos, tais como bactérias e

fungos, estas nanopartículas são também utilizadas no tratamento de alguns tumores.<sup>68,91,94</sup>

As nanopartículas magnéticas são um subtipo de nanopartículas metálicas e normalmente consistem em cristais de magnetita, isto é, num mineral magnético formado pelos óxidos de ferro II e III. Estas permitem a veiculação de fármacos, e são utilizadas no diagnóstico como agentes de contraste para ressonância magnética. Para este efeito são administradas por via IV, intra-arterial ou intraperitoneal, enquanto através da aplicação de um magneto é criado um campo magnético externo na região alvo, de modo a que estas nanopartículas, quando se encontrarem em circulação, sejam atraídas para essa região. A superfície destas partículas pode ser funcionalizada através da ligação de moléculas orgânicas e inorgânicas permitindo atingir uma zona específica, proteger as propriedades magnéticas do núcleo, além de aumentar a biocompatibilidade e reduzir a toxicidade destas estruturas. Comparativamente a outros sistemas de veiculação de fármacos, apresentam ainda outras vantagens, tais como a capacidade de resposta eficaz ao campo magnético externo aplicado, a relativa segurança e a sua versatilidade.<sup>68,69,94,101</sup>

#### **4.1.11. Nanopartículas Virais**

Os vírus evoluíram naturalmente para fornecer ácidos nucleicos às células hospedeiras e, como tal, podem ser úteis na veiculação de outras moléculas com aplicação biomédica, pelo que os vírus que infetam bactérias, mamíferos ou plantas são utilizados para produzir nanopartículas à base de vírus.<sup>86,102,103</sup> De acordo com a literatura, essas nanopartículas tanto podem ser designadas por nanopartículas virais, como por *virus-like particles*. São sistemas dinâmicos de automontagem, que formam estruturas altamente simétricas, polivalentes e monodispersas. Além disso, estas estruturas são robustas, podendo ser produzidas em grande quantidade num curto espaço de tempo. Apresentam várias vantagens comparativamente aos nanomateriais sintéticos, como a biocompatibilidade e biodegradabilidade. Em relação às nanopartículas que derivam de mamíferos, as que derivam de vírus de plantas e bacteriófagos são particularmente vantajosas dada a menor propensão de serem patogénicas em seres humanos e, conseqüentemente, de induzirem efeitos adversos.<sup>86,104</sup>

A estrutura básica destas partículas pode ser manipulada, permitindo que a cavidade interna seja utilizada para o armazenamento de moléculas, como fármacos e agentes de contraste para a imagiologia. Por outro lado, à superfície da cápside (isto é, do

invólucro de origem proteica dos vírus) podem ser adicionadas moléculas, como a transferrina, ácido fólico e anticorpos monoclonais, através de processos genéticos ou químicos, que permitem o direcionamento específico da nanopartícula para determinado local no organismo, como as células tumorais.<sup>102,103</sup>

## 4.2. Vantagens e Desvantagens dos Nanossistemas

---

Comparativamente aos agentes moleculares convencionais, devido às suas dimensões nanométricas, os nanossistemas permitem superar a resistência oferecida pelas barreiras biológicas do organismo humano. Têm a capacidade de incorporar fármacos hidrofílicos e lipofílicos, o que aumenta conseqüentemente a estabilidade e solubilidade dos fármacos hidrofóbicos em meio aquoso, promovendo assim um maior tempo de semivida destes na corrente sanguínea. Deste modo, um aumento do tempo de permanência do fármaco no sangue, conduzirá a uma maior concentração de fármaco no alvo terapêutico.<sup>12,93</sup>

Para obter a segurança requerida, os materiais utilizados na preparação dos nanossistemas devem ser biocompatíveis e biodegradáveis, minimizando os possíveis danos causados ao organismo humano. Além disso, a libertação do fármaco pode ser controlada, levando a que esta ocorra apenas na presença de determinadas enzimas ou sob condições específicas, tais como as alterações no ambiente fisiológico em termos de temperatura, pH ou osmolaridade, garantindo deste modo uma maior ação ao nível do alvo terapêutico.<sup>12,69</sup>

A possibilidade de funcionalização da superfície dos nanossistemas permite uma vetorização não apenas para órgãos/tecidos específicos, como para células com determinadas características concretas, como as células cancerígenas. Assim, ao contrário da administração dos fármacos livres, que facilmente se disseminam por todo o organismo, estes sistemas possibilitam uma acumulação do fármaco apenas no alvo terapêutico, aumentando a eficácia terapêutica e diminuindo os efeitos adversos associados, bem como a resistência do organismo aos fármacos, o que é particularmente relevante no que se refere à terapêutica anticancerígena.<sup>12,93,97</sup> Além disso, reforça a proteção dos fármacos encapsulados nestas estruturas da degradação por diversos

mecanismos de defesa endógenos. Esses mecanismos incluem a degradação enzimática, as reações imunológicas e ainda a sua eliminação antes deste atingir o seu alvo terapêutico, nomeadamente, ao nível da corrente sanguínea.<sup>12,93,105</sup>

Apresentam ainda uma grande capacidade de carga de fármaco, devido à elevada razão entre a área de superfície e o volume das partículas. É inclusivamente possível associar fármacos diferentes no mesmo nanossistema, e se estes atuarem por mecanismos de ação distintos, pode obter-se uma resposta terapêutica sinérgica.<sup>12,93,97</sup>

Embora as vantagens anteriormente descritas sejam significativas, existem desvantagens que devem ser consideradas. Entre elas, destacam-se o difícil e complexo manuseamento dos materiais à escala nanométrica, devido às forças e interações que podem ocorrer e afetar a utilidade dos produtos, a possível ausência de biocompatibilidade desses materiais, bem como a dificuldade de aplicação dos métodos de produção de nanossistemas à escala industrial. Outro aspeto importante a ter em conta, são os custos associados à matéria-prima e à produção, pois ao serem demasiado elevados, tornam estes medicamentos mais caros e, conseqüentemente, mais inacessíveis à maioria da população.<sup>54,106</sup>

Além disso, a toxicidade associada aos nanossistemas também constitui uma desvantagem, devido ao elevado tempo de permanência no organismo. Embora este seja benéfico para melhorar a biodisponibilidade do fármaco e aumentar a eficácia terapêutica, as suas reduzidas dimensões e elevada área superficial aumentam a sua toxicidade, podendo provocar conseqüências desconhecidas a longo prazo.<sup>15,69</sup> Esta desvantagem será abordada em maior detalhe, na secção 4.5, relativa à toxicidade associada aos nanossistemas.

### 4.3. Princípios para a Vetorização de Fármacos

---

Com base no conhecimento sobre os diversos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de tumores e na sua propagação, é possível idealizar estratégias que sejam direcionadas para essas vias. Associando estes conhecimentos a novas tecnologias, como a nanotecnologia, é possível favorecer a acumulação de fármaco no alvo

terapêutico, verificando-se uma diminuição dos efeitos adversos e um aumento da eficácia do tratamento. Neste sentido, começa a surgir o conceito de vetorização de fármacos.<sup>69,94</sup>

Os nanossistemas, pelas suas características vantajosas, mencionadas anteriormente, surgem como os principais candidatos para a vetorização de fármacos. O elevado tempo de permanência no organismo e a possibilidade de funcionalização da superfície são algumas dessas características que permitem o direcionamento do fármaco para o local alvo. Contudo, para obter as características farmacocinéticas desejadas, é necessário manipular determinados parâmetros dos nanossistemas, tais como o peso molecular, o tamanho e a composição.<sup>107</sup>

A vetorização de fármacos através de nanossistemas pode ser classificada em dois mecanismos distintos, vetorização passiva ou ativa.<sup>94</sup>

#### 4.3.1. Vetorização Passiva

A vetorização passiva é baseada essencialmente no efeito de permeabilidade e retenção (EPR) aumentada, uma característica específica dos tumores sólidos. Durante o desenvolvimento do tumor, a rápida angiogénese leva à formação de vasos sanguíneos cuja estrutura apresenta uma redução na sua integridade, resultando numa maior permeabilidade local. Os tumores são também caracterizados por uma drenagem linfática disfuncional, permitindo aumentar a retenção de substâncias no tecido tumoral (Figura 4.6).<sup>12,94,107</sup>

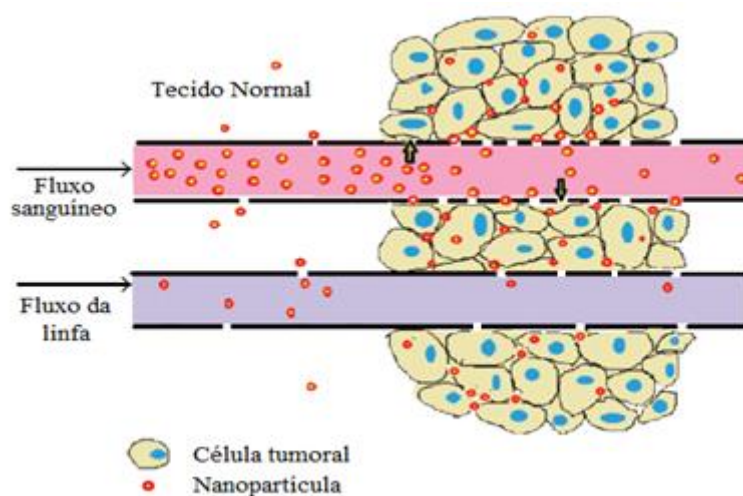


Figura 4.6 – Representação esquemática do efeito EPR. No tecido tumoral, ocorrem malformações na vascularização e na drenagem linfática, que permitem o extravasamento dos nanossistemas, aumentando a sua permeabilidade e retenção, enquanto no tecido normal o extravasamento dos nanossistemas é impedido por junções celulares. [Adaptado de (15)].

Estas propriedades permitem que os nanossistemas com dimensões entre 50 e 200 nm, ao atingirem a região tumoral, sejam extravasados para o tecido tumoral, onde se acumulam. As estruturas cujo tamanho é inferior a 50 nm não ficam retidas nas células e retornam por difusão à circulação sanguínea, enquanto as que apresentam dimensões superiores a 200 nm, por sua vez, não conseguem atravessar os poros da região tumoral.<sup>15,108</sup> Os tecidos saudáveis apresentam uma rede vascular com baixa permeabilidade e uma drenagem linfática funcional, pelo que os fármacos citotóxicos não se acumulam nesta região com tanta facilidade, contribuindo assim para a redução dos seus efeitos adversos.<sup>109,110</sup>

Como já foi referido, esta estratégia de vetorização de fármacos depende essencialmente da vasculatura dos tumores, sendo muito útil em tumores sólidos como o CPNPC, devido à elevada rede vascular ao nível da região pulmonar, permitindo dessa forma uma maior acumulação de fármaco na zona do tumor.<sup>97,109,111</sup>

#### **4.3.2. Vetorização Ativa**

A vetorização ativa tem como base a funcionalização da superfície dos nanossistemas com ligandos que serão reconhecidos por marcadores moleculares específicos, existentes na superfície das células que constituem a massa tumoral, que por estarem ausentes ou em pequenas quantidades nas células normais, permitem a distinção entre os dois tipos de células.<sup>68,94,108</sup> Esses ligandos podem incluir anticorpos, fragmentos de anticorpos monoclonais manipulados, proteínas (como a transferrina e lectinas), péptidos, resíduos de açúcares (como a galactose), pequenas moléculas (como o folato e a tiamina) e aptâmeros.<sup>112</sup>

Os ligandos possuem elevada afinidade e seletividade para os recetores específicos das células tumorais, pelo que a interação entre ambos é limitada pela concentração e respetiva disponibilidade de recetores. Além disso, os ligandos têm de ter a capacidade de induzir a internalização dos nanossistemas para o interior das células cancerígenas. Esse processo ocorre por endocitose mediada pelos recetores, o que favorece a acumulação de fármaco no interior da célula tumoral relativamente ao fluido intersticial, melhorando a eficácia terapêutica e, simultaneamente, minimizando os efeitos adversos.<sup>15,94</sup> Malarvizhi *et al.* estudaram a situação anteriormente mencionada, investigando a eficácia dos nanossistemas com ligandos em comparação com os nanossistemas sem ligandos. Foram preparados dois nanossistemas para veiculação

combinada de DOX e sorafenib, em que a superfície de um deles foi modificada, adicionando-se moléculas de transferrina. Verificou-se que o nanossistema modificado com as moléculas de transferrina demonstrou melhores resultados no *uptake* celular e uma atividade antitumoral mais eficaz (92%) em comparação com o nanossistema sem ligando (63%).<sup>113</sup>

A conjugação dos ligandos pode ocorrer através de ligações covalentes ou não covalentes, sendo que as ligações não covalentes são mais fracas, apresentando a possibilidade de substituição competitiva por compostos presentes no sangue. Deste modo, as ligações covalentes são mais comuns, nomeadamente, as ligações amida e tioéster.<sup>114,115</sup>

## 4.4. Vias de Administração de Terapêuticas com Nanossistemas

---

A veiculação de fármacos através de nanossistemas permite um direcionamento específico e eficiente para o local alvo. De uma forma geral, este objetivo pode ser atingido por diferentes vias de administração, como a oral, sublingual, pulmonar, nasal, ocular, tópica, subcutânea, retal, intramuscular e IV, entre outras.<sup>91,105,108</sup> No tratamento do CPNPC, os nanossistemas são administrados maioritariamente por via IV, mas também por via pulmonar e oral.<sup>14,54,116</sup> As características inerentes a estas vias são detalhadas abaixo.

### 4.4.1. Via Oral

A via oral é a via de administração de fármacos mais utilizada pelos doentes, devido ao facto de não ser invasiva, não causar dor e ser conveniente para o doente, segura e simples, permitindo a autoadministração. Contudo, esta via apresenta como principal desvantagem a influência que determinados fatores podem ter nos processos de absorção, distribuição, metabolização e eliminação dos fármacos. A absorção é afetada pelas propriedades físico-químicas dos fármacos, forma farmacêutica, bem como pela presença de alimentos e outros fármacos. Os fármacos podem originar irritação na mucosa gástrica e intestinal, bem como ser instáveis no trato gastrointestinal, podendo ser degradados pela acidez do estômago ou por enzimas digestivas. Além disso, através desta via, os fármacos

podem sofrer um efeito de primeira passagem antes de serem absorvidos para a corrente sanguínea, que ocorre essencialmente ao nível do intestino delgado, devido à elevada área de superfície e irrigação sanguínea desta região.<sup>117-119</sup>

O efeito de primeira passagem consiste na metabolização precoce do fármaco antes de atingir a circulação sistémica. Este processo ocorre no fígado e altera as propriedades do fármaco, tornando-o mais hidrofílico e, conseqüentemente, mais facilmente eliminável pelos rins. Desta forma, muitos tratamentos podem-se mostrar ineficazes, como resultado de doses subterapêuticas incapazes de gerar o efeito terapêutico pretendido.<sup>118,119</sup>

A administração de fármacos por via oral através dos métodos convencionais tem-se demonstrado ineficaz no tratamento do CPNPC, essencialmente devido à incapacidade de os fármacos penetrarem os locais tumorais no pulmão e atingirem concentrações passíveis de originar um efeito terapêutico. Desta forma, os nanossistemas têm sido extensivamente investigados enquanto veículos de fármacos para administração por via oral, demonstrando um aumento na absorção oral dos fármacos. Estes resultados devem-se ao facto dos nanossistemas permitirem a redução da exposição dos fármacos às condições adversas do trato gastrointestinal, minimizando a ação das enzimas digestivas e do pH sobre estes, contribuïrem para um aumento do tempo de permanência na zona gástrica através da sua adesão à mucosa, e ainda por favorecerem a entrada dos fármacos para as células e tecidos.<sup>15,117,120</sup>

#### **4.4.2. Via Intravenosa**

A administração de fármacos por via IV trata-se de um procedimento invasivo que envolve a perfuração de uma veia, podendo ocorrer em bólus ou por infusão contínua. Em bólus, o fármaco é administrado por um período muito curto, aproximadamente um minuto, enquanto por infusão contínua, o fármaco é instilado durante várias horas. Esta via caracteriza-se por uma biodisponibilidade total, permitindo um efeito rápido e sistémico. Além disso, permite a administração de grandes volumes e um controlo da dose administrada.<sup>118,121</sup>

Contudo, a administração envolve procedimentos dolorosos e que requerem profissionais especializados e material adequado, pelo elevado risco de inflamação, infeção, flebite ou trombose. Permite apenas a administração de soluções aquosas e diluídas, respeitando outros parâmetros, tais como a neutralidade, isotonia e esterilidade.

Quanto ao tamanho, as partículas administradas podem ter um valor máximo de 5  $\mu\text{m}$ , dado que valores superiores podem provocar embolias pulmonares.<sup>97,117</sup>

Pelo facto de permitir a injeção direta do fármaco na corrente sanguínea, contornando as barreiras do processo de absorção epitelial, consiste na via mais utilizada para administração de fármacos veiculados por nanossistemas. Para o transporte de fármacos que atuam sobre as células tumorais, como referido anteriormente na secção relativa à vetorização passiva, os nanossistemas devem apresentar dimensões compreendidas entre 50 e 200 nm, permitindo deste modo o extravasamento da corrente sanguínea para o alvo terapêutico e a sua acumulação neste.<sup>95,97</sup>

Esta é a via mais utilizada para a administração de nanossistemas para o tratamento do CPNPC, dado que ao administrar os nanossistemas diretamente na circulação sanguínea é possível evitar o seu metabolismo de primeira passagem e isso, consequentemente, conduz a um aumento da biodisponibilidade dos fármacos encapsulados nessas estruturas. Acrescentando a possibilidade de modificação da superfície dos nanossistemas, que permite um direcionamento seletivo para os pulmões, verifica-se que esta é a via de administração mais eficaz no tratamento desta patologia, dado que leva a uma maior acumulação de fármaco no alvo terapêutico, obtendo-se concentrações passíveis de exercer o efeito pretendido.<sup>121,122</sup>

#### **4.4.3. Via Pulmonar**

A via pulmonar permite uma administração não invasiva e cómoda dos fármacos, tendo os pulmões como alvo. A administração pulmonar permite a autoadministração e evita o efeito de primeira passagem, possibilitando um elevado efeito a nível local, que é útil para o tratamento de doenças respiratórias, bem como um efeito sistémico, permitindo tratar outras patologias.<sup>14,117</sup>

Um dos fatores que influenciam a eficácia deste tipo de administração é a dose de fármaco que atinge os alvos no pulmão, sendo que os mecanismos mais importantes de deposição de partículas no trato respiratório são o impacto inercial, a sedimentação gravitacional e a difusão. As partículas maiores ( $> 10 \mu\text{m}$ ) e intermédias (2 - 10  $\mu\text{m}$ ) ficam retidas nas zonas mais anteriores das vias respiratórias por impacto inercial, enquanto as partículas pequenas (0,5 - 2  $\mu\text{m}$ ) são depositadas nas pequenas vias aéreas e alvéolos por sedimentação gravitacional. Por outro lado, cerca de 80% das partículas com dimensões inferiores a 0,5  $\mu\text{m}$ , como consequência da difusão, não se depositam e são expelidas após

a expiração; ainda assim, os nanossistemas com dimensões próximas de 100 nm são capazes de se depositar em quantidades aceitáveis na região alveolar.<sup>12,123</sup>

A aerossolização é um método eficaz para administrar agentes terapêuticos ao pulmão. Este processo requer a utilização de um dispositivo, existindo diversos tipos, como os nebulizadores, inaladores de pó seco e inaladores pressurizados com válvula doseadora. Os inaladores de pó seco são os mais utilizados, permitindo uma entrega de fármaco mais conveniente, por ser livre de propulsor, quimicamente estável e fácil de utilizar pelos doentes. Ainda assim, os fármacos e os nanossistemas necessitam de passar por etapas adicionais de formulação para se tornarem adequados para a administração através de qualquer um dos tipos de inaladores.<sup>123</sup>

Após a entrada na cavidade respiratória, os nanossistemas necessitam de superar diversos obstáculos até libertarem o fármaco e promoverem o seu efeito terapêutico. A camada de muco que protege a região traqueobrônquica é o principal obstáculo para aceder ao epitélio e em determinadas patologias, como a fibrose cística e a DPOC, esta camada é mais espessa, dificultando por isso a ação dos fármacos inalados, que após deposição, ficam retidos por forças eletrostáticas. Além disso, na zona periférica dos pulmões, existem células epiteliais que produzem e libertam surfactante. Este, é essencial para reduzir a tensão superficial dos pulmões, prevenir o colapso alveolar no processo de expiração e possui componentes capazes de opsonizar as partículas inaladas, marcando-as para fagocitose.<sup>14,124</sup>

A veiculação de fármacos através de nanossistemas para o tratamento do CPNPC utilizando esta via de administração ainda se encontra numa fase muito inicial, sendo necessário ter em consideração diversos aspetos relacionados com a farmacologia, toxicologia e imunologia.<sup>54</sup>

## 4.5. Toxicidade associada aos Nanossistemas

---

Embora as promessas da aplicação dos nanossistemas no campo da Medicina sejam muitas, importa considerar os seus potenciais riscos para o organismo humano. Nos últimos anos surgiu uma nova disciplina de estudo, a Nanotoxicologia, que tem como principal objetivo o estudo dos efeitos indesejáveis associados aos nanossistemas.<sup>12,99,125</sup> Estes efeitos prejudiciais devem-se essencialmente às propriedades físicas, químicas e

biológicas dos nanossistemas, que são distintas de sistemas de maior dimensão, e que lhes permitem interferir nas funções celulares vitais. Devido às suas dimensões, estas estruturas são capazes de atravessar as barreiras biológicas, não são eliminadas por depuração renal e em alguns casos conseguem escapar à ação dos macrófagos do RES, podendo-se acumular durante longos períodos no organismo. Além disso, por serem estruturas com um tamanho reduzido, têm uma área superficial elevada, o que aumenta a sua reatividade e, conseqüentemente, a sua toxicidade para o organismo humano. Têm a capacidade de interagir com as moléculas biológicas, originando radicais livres, que podem conduzir a efeitos adversos cujas conseqüências a longo prazo são ainda desconhecidas. Contudo, através de modificações na superfície da estrutura é possível reduzir essa toxicidade associada.<sup>69,99</sup>

Tal como muitas outras substâncias, os nanossistemas apresentam uma concentração biológica limiar, acima da qual se tornam tóxicas. Portanto, é de extrema importância a definição dos seus valores de LD<sub>50</sub> (concentração de nanossistemas que causa a morte em 50% das células) em sistemas biológicos, que dependem essencialmente da sua composição, hidrofobicidade/hidrofilia superficial, carga, afinidade por biomoléculas específicas, cinética de degradação, produtos de degradação, bem como do tempo de exposição e da via de administração escolhida, entre outras.<sup>12,106</sup>

A existência de muitas variáveis dificulta a caracterização toxicológica completa destas estruturas. A toxicidade aguda compreende essencialmente processos como a ativação do complemento, hemólise, inflamação, stress oxidativo e comprometimento da função mitocondrial, enquanto a toxicidade crónica é mais exigente e requer ainda mais estudos, uma vez que os dados existentes são escassos.<sup>99</sup>

Deste modo, verifica-se que é necessário realizar uma vasta gama de testes para obter resultados concretos e fidedignos sobre a toxicidade associada aos nanossistemas. A sua ausência tem sido o grande obstáculo à aprovação de mais nanossistemas pelas agências regulamentares responsáveis por este processo. Além disso, é importante ter em consideração que cada caso é um caso, e como tal é necessário realizar uma avaliação concreta da toxicidade para cada binómio nanossistema – via de administração, pois como foi mencionado anteriormente, este é um dos parâmetros que influencia os efeitos indesejados que estas estruturas podem provocar no organismo humano.<sup>99</sup>

## 5. Os lipossomas e a sua aplicação na terapêutica do Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células

---

Como mencionado anteriormente na secção sobre os lipossomas, estes são estruturas esféricas fechadas onde os fosfolípidos e o colesterol formam uma ou mais bicamadas lipídicas em torno de um núcleo aquoso. Devido às características anfipáticas, permitem o armazenamento, a veiculação e libertação de moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas, através da sua encapsulação no núcleo aquoso e integração na bicamada lipídica, respetivamente.<sup>72,126</sup>

Ao longo das últimas cinco décadas, muitos têm sido os estudos realizados utilizando os lipossomas como veículos de fármacos, sendo considerados um dos nanossistemas mais eficazes para o transporte prolongado e libertação progressiva e controlada dos fármacos anticancerígenos, facilitando a sua absorção intratumoral.<sup>72,81</sup> Estas estruturas podem ser constituídas por lípidos que fazem parte do organismo humano, apresentando conseqüentemente uma elevada segurança e biocompatibilidade dada a reduzida toxicidade que originam.<sup>127</sup>

Contudo, os lipossomas não modificados superficialmente são rapidamente eliminados da circulação sanguínea pelas células fagocitárias do RES. É possível contornar esta desvantagem através do revestimento da superfície destas estruturas com polímeros com propriedades que permitam o seu escape ao RES. Um exemplo desses polímeros, como já mencionado anteriormente, é o PEG. Além disso, a adição de moléculas na superfície destas estruturas permite o direcionamento específico para as células tumorais.<sup>76,81,86</sup>

Desta forma, o principal objetivo do tratamento de tumores utilizando os lipossomas como veículos de fármacos, consiste em melhorar a eficácia dos fármacos antitumorais, reduzir a sua toxicidade e minimizar outras limitações. Para atingir este objetivo, diferentes abordagens têm sido estudadas, incluindo diversas formulações de fármacos e modificações nos lipossomas, como mudanças na composição lipídica, carga, revestimento de superfície e ligandos.<sup>76</sup>

## 5.1. Interação com as células

---

A eficiência da interação entre os lipossomas e as células alvo depende tanto da afinidade dos ligandos acoplados à superfície destas estruturas para os respetivos recetores na superfície das células, como da densidade dos mesmos. Posteriormente,

ocorre a internalização destas estruturas mediada por endocitose.<sup>72,81</sup> No interior das células, a libertação dos fármacos transportados pelos lipossomas pode acontecer em resposta a determinados estímulos. Este conceito de sensibilidade a estímulos baseia-se em certas características específicas do microambiente tumoral relativamente às células normais, incluindo o menor pH, alta temperatura e sobre expressão de várias enzimas proteolíticas, entre outros.<sup>128</sup>

Como referido anteriormente, as células tumorais caracterizam-se por um pH ligeiramente ácido, podendo variar entre 5 e 6.8. Deste modo, para tornar os lipossomas sensíveis a estes valores de pH, é possível introduzir na sua superfície polímeros capazes de reagir às diferenças de pH, tais como o ácido polimetacrílico, polidietilaminoetil metacrilato, poliácridamida e o ácido poliacrílico, que garantem a estabilidade destas estruturas ao pH fisiológico do sangue (pH = 7.4) e provocam a sua destabilização a valores de pH característicos das zonas tumorais, com a consequente libertação do fármaco encapsulado.<sup>81,128</sup>

Os tecidos tumorais apresentam também uma temperatura elevada em comparação com os tecidos normais. Neste sentido, podem preparar-se lipossomas sensíveis à temperatura a partir de lípidos termossensíveis, como a dipalmitoilfosfatidilcolina, ou polímeros com uma temperatura crítica de solução mínima, como a poli(N-isopropilacrilamida). Acima dessa temperatura, como é o caso das regiões tumorais, as ligações de hidrogénio entre as moléculas de água do meio e os grupos amida das cadeias dos polímeros tornam-se mais fracas, levando à sua precipitação, rompendo os lipossomas com consequente libertação do fármaco.<sup>128,129</sup>

Determinadas enzimas encontram-se com níveis de expressão elevados nas células tumorais quando comparados com os níveis nas células normais. Assim, é possível desenvolver lipossomas sensíveis a essas enzimas, com o intuito de libertarem nas células cancerígenas o fármaco encapsulado. As metaloproteinases de matriz, fosfolipase A2, fosfatase alcalina, transglutaminase ou fosfolipase C específica de fosfatidilinositol são algumas dessas enzimas.<sup>128</sup> Assim, incorporando ligandos peptídicos que sejam substratos destas enzimas, entre os lípidos da estrutura lipossomal e os polímeros acoplados à superfície, consegue-se que os lipossomas estejam intactos, garantindo as condições adequadas para a sua internalização, havendo apenas a clivagem desse ligando no microambiente tumoral, na presença de concentrações mais altas dessas enzimas.<sup>76,128</sup>

Além disso, as células cancerígenas podem tornar-se resistentes aos fármacos anticancerígenos. Esta resistência está associada a diversos mecanismos intrínsecos ou adquiridos pelas células tumorais. São exemplos desses mecanismos os processos de reparação do material genético danificado pelos citotóxicos; as alterações ao nível da metabolização e destoxificação dos fármacos, através da presença de enzimas destoxificantes; as alterações ao nível da apoptose celular, através de proteínas antiapoptóticas; aumento do número de transportadores de efluxo de fármacos, responsáveis pela expulsão do fármaco do citoplasma; entre outros. Os fármacos, na sua forma livre, entram nas células por difusão passiva ou através dos transportadores membranares, o que permite que sejam reconhecidos pelos transportadores de efluxo e que rapidamente sejam expulsos, não se acumulando no citoplasma. Por sua vez, os lipossomas são incorporados em vesículas, através do processo de endocitose, o que impede o seu reconhecimento pelos transportadores de efluxo. Assim, verifica-se que a veiculação de fármacos através de lipossomas permite contornar os mecanismos de resistência das células cancerígenas aos fármacos citotóxicos, levando a um aumento da sua concentração intracelular e, conseqüentemente, a um maior efeito antitumoral.<sup>14,111</sup>

## 5.2. Exemplos de moléculas vetorizadas por lipossomas na terapêutica do Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células

---

Até aos dias de hoje, os lipossomas têm sido alvo de uma intensa investigação tendo em vista a sua aplicação em terapêuticas anticancerígenas, antibióticas, anti-inflamatórias, anestésicas, antifúngicas e de entrega de genes. Esta investigação resultou na publicação de milhares de estudos e no desenvolvimento de ensaios clínicos com várias formulações de fármacos e outras moléculas transportadas em lipossomas, das quais apenas cerca de 5% foram aprovadas e, conseqüentemente, introduzidas no mercado.<sup>130</sup>

A nível de aplicação clínica, os lipossomas ocupam uma posição de destaque, sendo que nos últimos anos cresceu o número de ensaios clínicos utilizando estas estruturas para veiculação de fármacos anticancerígenos e de outras moléculas para o tratamento de tumores, nomeadamente, do CPNPC. Contudo, neste momento ainda não existem formulações lipossomais aprovadas pelas entidades competentes para utilização

clínica com esta finalidade.<sup>130,131</sup> Seguidamente, serão abordados alguns ensaios clínicos e estudos desenvolvidos, *in vitro* e *in vivo*, de terapêuticas antitumorais envolvendo lipossomas com aplicação no CPNPC. De modo a facilitar a organização do documento, estes foram divididos por molécula.

### 5.2.1. Doxorrubicina

A DOX é um fármaco antineoplásico pertencente à classe das antraciclina. Foi isolado pela primeira vez na década de sessenta, a partir de culturas de *Streptomyces peucetius var. caesius*. Este fármaco é utilizado para o tratamento de vários tumores sólidos, essencialmente devido aos seus mecanismos de ação. Por um lado, a DOX inibe a atividade da topoisomerase II, uma enzima essencial durante o processo de replicação celular, ao aliviar a tensão resultante do desenrolamento da hélice. Esta enzima, após o corte temporário da dupla hélice de ADN, trespassa a outra dupla hélice através desse local de corte e por último, volta a ligar a dupla cadeia anteriormente cortada. Assim, a DOX inibe a atividade desta enzima estabilizando o complexo ADN-topoisomerase II, que impossibilita a junção da cadeia e, conseqüentemente, impede a conclusão do ciclo celular. Por outro lado, este fármaco forma complexos com as cadeias de ADN por intercalação entre pares de bases, impedindo que tanto a ARN como a ADN polimerase se liguem ao material genético. Ao impedir esta ligação, não ocorre a síntese de novas cadeias de ADN e, conseqüentemente, suspende-se o crescimento celular. Além disso, o efeito citotóxico deste fármaco está também associado à formação de radicais livres, que podem levar a fenómenos de stress oxidativo e peroxidação lipídica.<sup>132,133</sup>

Contudo, à semelhança dos restantes fármacos, também a DOX não é inócua. A sua administração pode conduzir a vários efeitos adversos, sendo a cardiotoxicidade severa o principal, uma vez que leva a insuficiência cardíaca congestiva.<sup>133</sup> Esta cardiotoxicidade parece resultar do mecanismo de ação deste fármaco, essencialmente, da formação de radicais livres que provocam stress oxidativo nas células. Dada a reduzida concentração de enzimas antioxidantes no músculo cardíaco, este acaba por ser mais afetado. Além disso, a DOX provoca arritmias e pode levar à diminuição da expressão de genes que codificam proteínas envolvidas na contração muscular (como a miosina e a troponina-I). Esta diminuição pode conseqüentemente conduzir a miólise (destruição das fibras musculares) e à redução do processo de contração do miocárdio.<sup>134</sup>

A nível hematológico, provoca uma depressão da medula óssea, especialmente dos neutrófilos e das plaquetas. Desencadeia igualmente efeitos sintomáticos, tais como, náuseas, vômitos, úlceras no trato gastrointestinal, alopecia e alterações na pigmentação da pele. Também o aparelho urinário é afetado pela administração deste fármaco, principalmente ao nível renal, dado o facto deste causar tanto um aumento da permeabilidade glomerular, bem como a atrofia dos glomérulos.<sup>135</sup>

Com o intuito de minimizar os efeitos adversos associados à DOX, mantendo a sua eficácia terapêutica, surgiu a DOX lipossomal, isto é, a encapsulação deste fármaco na estrutura do lipossoma. O Doxil<sup>®</sup>, também designado por Caelyx<sup>™</sup>, foi a primeira preparação lipossomal de DOX peguilada a ser aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) com indicação para o tratamento do cancro do ovário, sarcoma de Kaposi, cancro da mama e mieloma múltiplo. Um ensaio clínico de fase I realizado em indivíduos com CPNPC avançado ou metastático previamente tratado com platina, demonstrou a eficácia do Doxil<sup>®</sup> no tratamento desta patologia. A 17 pacientes foram administrados, por infusão IV, 45 mg/m<sup>2</sup> a cada 21 dias, tendo esses pacientes recebido, em média, 2 ciclos de tratamento. Verificou-se que em 5 pacientes houve estabilização da doença, e que noutro paciente houve mesmo uma regressão parcial do tumor. Além disso, demonstrou-se um perfil de toxicidade favorável, o que contribuiu para o suporte da possibilidade de utilização desta formulação em pacientes com CPNPC.<sup>126,136</sup>

No tratamento desta patologia podem associar-se diversas opções terapêuticas, como a RT e a QT, originando a radioquimioterapia (RQT). Esta modalidade permite aumentar a eficácia terapêutica e é o tratamento-padrão para pacientes com CPNPC localmente avançados. Num estudo, Tsoutsou e os seus colaboradores avaliaram a viabilidade da RT acelerada hipofracionada com citoproteção em combinação com vinorelbina e DOX lipossomal. Catorze pacientes foram submetidos a RT durante 4 semanas consecutivas, a DOX lipossomal foi administrada numa dose de 20 mg/m<sup>2</sup> a cada 2 semanas, durante 3 ciclos consecutivos e, por último, a vinorelbina foi administrada em 3 níveis (20 mg/m<sup>2</sup> por semana, 25 mg/m<sup>2</sup> três vezes a cada 2 semanas e 30 mg/m<sup>2</sup> três vezes a cada 2 semanas). Observou-se uma resposta parcial (isto é, uma redução de 65% do volume do tumor) em 9 pacientes, uma resposta mínima (correspondente a uma redução do volume tumoral entre 30-50%) em 2, e nos restantes 2 pacientes verificou-se uma estabilização da doença. Deste modo, conclui-se que a combinação de DOX lipossomal e vinorelbina com RT é viável para doentes com CPNPC, proporcionando

altas taxas de resposta.<sup>126,137</sup> Num ensaio clínico de fase I, Varveris *et al.* avaliaram a eficácia da combinação de Doxil<sup>®</sup> com cisplatina simultaneamente com RT em 18 pacientes, entre os quais, 9 com CPNPC. A dose inicial desta preparação lipossomal foi de 7 mg/m<sup>2</sup> uma vez por semana e foi aumentada em intervalos de 5 mg/m<sup>2</sup> para cada 3 pacientes. A dose padrão de cisplatina administrada foi 20 mg/m<sup>2</sup> uma vez por semana e os pacientes foram ainda submetidos a 7 semanas de RT. Devido ao facto de se terem observado algumas situações de toxicidade na dose de 17 mg/m<sup>2</sup>, definiu-se 12 mg/m<sup>2</sup> como a dose máxima tolerada de Doxil<sup>®</sup>. Ao longo de 18 meses, os pacientes foram sujeitos a exames com o intuito de avaliar as alterações nas dimensões do tumor e verificou-se uma redução de, pelo menos, 50% da massa tumoral em 16 dos 18 pacientes envolvidos no estudo. Estes resultados demonstraram a potencial inclusão de Doxil<sup>®</sup> em esquemas de RT e QT concomitantes para o tratamento de tumores sólidos, como o CPNPC.<sup>126,138</sup>

Para além destes, outros ensaios clínicos de fase I utilizando a DOX lipossomal no tratamento do CPNPC têm sido desenvolvidos, obtendo-se resultados de eficácia e segurança semelhantes aos apresentados nos ensaios descritos anteriormente e, por conseguinte, reforçando a possível utilização desta formulação no tratamento desta patologia. Contudo, a par com estes ensaios, diversos estudos *in vitro* e *in vivo* são realizados, procurando avaliar outras estratégias de intervenção no CPNPC, tal como a utilização de determinados ligandos específicos para as células cancerígenas. Neste sentido, Biswas *et al.*, avaliaram a eficácia da DOX lipossomal peguilada com octa-arginina (um péptido sintético, curto, carregado positivamente e semelhante à sequência peptídica do péptido VIH-1TAT, que tal como este na fase de infeção de VIH, demonstrou propriedades de transporte celular eficientes) conjugada à sua superfície. A análise *in vitro* em células A549, uma linha celular de CPNPC humano, nomeadamente de adenocarcinoma do pulmão, confirmou a eficiente acumulação celular desta formulação face à preparação lipossomal Doxil<sup>®</sup> sem qualquer modificação (Figura 5.1). Além disso, observou-se também uma maior citotoxicidade, evidenciada pelo aumento dos níveis de secreção da enzima lactato desidrogenase (LDH), que é um marcador de morte celular. Assim, este sistema demonstrou uma maior eficácia na entrega da DOX, suportando a sua potencial utilidade no tratamento do cancro, em particular, no CPNPC.<sup>133</sup>

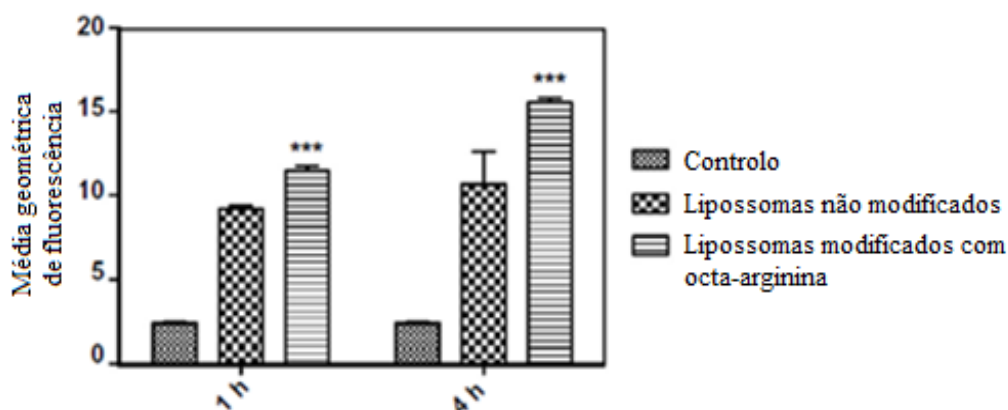


Figura 5.1 – Comparação da captação celular da formulação lipossomal de DOX não modificada e modificada com octa-arginina, por citometria de fluxo. As células A549 foram incubadas com as formulações durante 1h e 4h, após a qual se realizou essa análise. [Adaptado de (133)].

Num outro estudo, Cheng *et al.* investigaram a possibilidade de funcionalização de lipossomas contendo DOX com GE11 (um péptido com elevada afinidade para o EGFR, que se encontra presente em elevadas quantidades na maioria dos CPNPC). Para tal prepararam os lipossomas acoplando à superfície este ligando e, *in vitro*, demonstraram que o efeito citotóxico dos lipossomas carregados com DOX em células A549 estava intimamente relacionado com a densidade de GE11, dado que os lipossomas contendo elevadas concentrações de ligando na sua superfície conduziram a uma maior atividade antitumoral. Estes resultados permitiram acreditar que este ligando foi capaz de facilitar a captação celular dos lipossomas através de endocitose mediada por EGFR. Consequentemente, com o intuito de verificar esta hipótese, realizaram uma experiência de imagiologia *in vivo*, em ratinhos xenotransplantados com células tumorais com sobre expressão de EGFR, constatando que a modificação dos lipossomas com GE11 aumenta a sua acumulação e prolonga a sua retenção no local do tumor, tornando-o um transportador promissor para a entrega de fármacos e outras moléculas no CPNPC.<sup>139</sup>

### 5.2.2. Cisplatina

A cisplatina, também designada por cis-diaminodicloroplatina (II), é um fármaco antineoplásico pertencente à classe dos agentes alquilantes. Embora tenha sido sintetizada pela primeira vez em 1844 por Michel Peyrone, só a partir de 1960, com os trabalhos desenvolvidos por Barnett Rosenberg, é que se descobriu a sua atividade antitumoral. Assim, devido ao seu mecanismo de ação, a cisplatina é utilizada para o tratamento de vários tipos de cancro, incluindo sarcomas, alguns carcinomas, linfomas e tumores nas células germinativas.<sup>140</sup>

Após a entrada na célula, ao sofrer o processo de hidrólise, a cisplatina torna-se um composto altamente reativo, com a capacidade de introduzir grupos alquilo em locais nucleofílicos dos componentes celulares, tal como o ADN. Este complexo liga-se covalentemente aos átomos de azoto das bases da dupla hélice (preferencialmente aos N7 da guanina) e podem originar aductos monofuncionais, onde o complexo faz apenas uma ligação ao ADN, ou aductos bifuncionais, onde o complexo se liga em duas posições ao ADN. Estas ligações podem ocorrer na mesma cadeia (alquilação intra-cadeia) ou, com menor frequência, em cadeias diferentes (alquilação inter-cadeia), distorcendo a estrutura terciária do ADN e inibindo a ação da maquinaria celular durante os processos de replicação e transcrição.<sup>140,141</sup>

A cisplatina tem sido associada a diversos efeitos adversos. Os efeitos renais, que são os mais significativos, são relacionados com a indução de danos ao nível dos túbulos proximais, dado que a cisplatina é eliminada pelo rim por filtração glomerular e secreção tubular, e como tal, uma acumulação excessiva deste citotóxico nas células parenquimatosas renais contribui para uma diminuição da capacidade de filtração dos rins. Além disso, têm sido descritos alguns eventos cardíacos, incluindo alterações eletrocardiográficas, miocardite, arritmias, cardiomiopatia e insuficiência cardíaca congestiva; alterações a nível hepático, como a diminuição da concentração de enzimas antioxidantes, devido ao stress oxidativo que, por sua vez, resulta da formação de espécies reativas de oxigénio; bem como, náuseas, vômitos, neuropatia periférica e mielossupressão.<sup>140,142</sup>

Lipoplatin<sup>TM</sup> é uma formulação lipossomal de cisplatina desenhada com o objetivo de reduzir a toxicidade sistémica e permitir uma libertação lenta do fármaco enquanto o lipossoma é degradado. Alguns estudos pré-clínicos desenvolvidos permitiram demonstrar a eficácia antitumoral desta formulação, com concentrações intratumorais até cinquenta vezes superiores às verificadas nos tecidos normais, e uma menor toxicidade renal em comparação com a cisplatina convencional.<sup>126,143</sup> Na última década, têm sido desenvolvidos múltiplos estudos da sua aplicação no tratamento do CPNPC. Um estudo de fase I realizado em pacientes com CPNPC avançado teve como principal objetivo determinar a dose máxima tolerada desta formulação lipossomal de cisplatina em combinação com uma dose fixa de gemcitabina. Para tal, durante 6 ciclos de 3 semanas cada, aos dias 1 e 8, era administrada a dose fixa de gemcitabina e aumentada, em 10%, a partir de 100 mg/m<sup>2</sup> a dose de Lipoplatin<sup>TM</sup>. Observou-se que a

dose de 120 mg/m<sup>2</sup> desta formulação lipossomal, no regime posológico mencionado anteriormente, ainda é bem tolerada pelo organismo e que permitiu o controlo da doença em 3 dos 13 pacientes envolvidos no estudo.<sup>144,145</sup>

Os resultados satisfatórios obtidos neste estudo foram indutores de mais estudos com o intuito de demonstrar a aplicação desta formulação no tratamento desta patologia. Neste sentido, Mylonakis *et al.*, desenvolveram um estudo randomizado de fase II com 88 pacientes com CPNPC nos estádios IIIB/IV. Desses, 47 pacientes receberam durante 6 ciclos de 21 dias, Lipoplatin<sup>TM</sup> (aos dias 1, 8 e 15 de cada ciclo) em associação com gemcitabina (nos dias 1 e 8), enquanto os restantes 41 pacientes receberam durante o mesmo número de ciclos, cisplatina (no dia 1) e gemcitabina (aos dias 1 e 8). Obtiveram-se taxas de controlo da doença para o grupo tratado com esta formulação lipossomal e para o tratado com cisplatina, respetivamente, de 70,7% e 56,4%. Além disso, verificou-se que o primeiro grupo apresentou uma menor toxicidade, principalmente, a nível renal.<sup>146</sup>

Um estudo multicêntrico de fase III desenvolvido por Stathopoulos *et al.*, em pacientes com CPNPC inoperável e sem qualquer tratamento quimioterápico anterior, demonstrou que, embora a combinação de cisplatina lipossomal com PTX (grupo A) seja menos tóxica que a associação de cisplatina convencional com PTX (grupo B), a eficácia é semelhante, uma vez que as taxas gerais de resposta (sobrevivência global e tempo para progressão tumoral) entre os 2 grupos de tratamento não foram, em termos estatísticos, significativamente diferentes (Figura 5.2).<sup>147,148</sup>

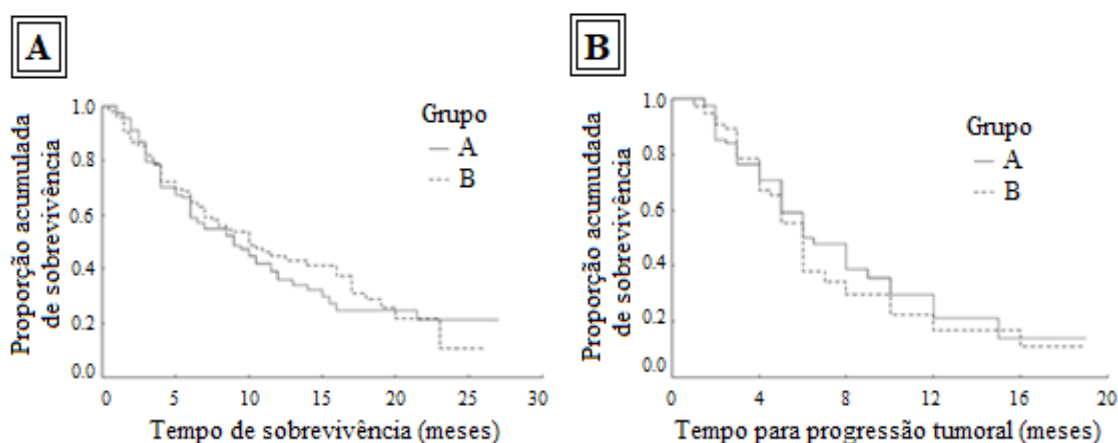


Figura 5.2 – Comparação da taxa geral de resposta entre os pacientes tratados com uma combinação de cisplatina lipossomal e PTX (grupo A) e os pacientes tratados com cisplatina convencional associada a PTX (grupo B). A: Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier. B: Curva do tempo de progressão tumoral de Kaplan-Meier. [Adaptado de (147)].

Esta formulação lipossomal também tem sido estudada em regime de monoterapia para o tratamento desta patologia. Stathopoulos *et al.*, avaliaram a administração de 200 mg/m<sup>2</sup> de Lipoplatin<sup>TM</sup>, nos dias 1 e 2 de 6 ciclos de 2 semanas cada, em 21 pacientes. Oito desses pacientes (38.1%) obtiveram uma resposta parcial, 9 (42.9%) uma estabilização da doença e nos restantes 4 (19%), verificou-se uma progressão da doença. Apenas foi observada uma ligeira toxicidade em 6 pacientes, caracterizada predominantemente, por náuseas e vômitos.<sup>149</sup> Assim, é possível verificar que os ensaios de fase I, II e III têm demonstrado e confirmado que a cisplatina lipossômica apresenta não só uma eficácia semelhante à cisplatina no tratamento do CPNPC, como uma redução significativa da toxicidade associada a este fármaco.<sup>144</sup>

Por outro lado, SPI-077 é uma formulação de lipossomas estabilizados estericamente que também encapsula a cisplatina e se encontra atualmente na fase II de ensaios clínicos. Comparativamente com a cisplatina livre, demonstrou nos modelos pré-clínicos uma melhoria significativa no atraso do crescimento do tumor pulmonar, bem como um aumento da estabilidade e do tempo de circulação do fármaco. No entanto, em ensaios clínicos, embora a preparação seja bem tolerada pelo organismo, conduzindo apenas a situações de toxicidade ligeira, como náuseas e vômitos, demonstra somente uma modesta atividade antitumoral em pacientes com CPNPC num estadio avançado.<sup>150-</sup>

152

### 5.2.3. Paclitaxel

O PTX é um fármaco com atividade antineoplásica pertencente à classe dos agentes estabilizadores dos microtúbulos, os taxanos. Foi descoberto em 1967, quando Monroe Wall e Mansukh Wani o isolaram de um extrato de casca do teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*). Ao contrário da maioria dos fármacos citotóxicos, o PTX não interage diretamente com os ácidos nucleicos nem interfere com a sua síntese, uma vez que atua ao nível dos microtúbulos, durante a fase mitótica do ciclo celular. Os microtúbulos são um dos principais componentes do citoesqueleto das células eucarióticas e desempenham inúmeras funções vitais, tanto na manutenção da forma das células, como no transporte intracelular de organelos, sinalização celular e na formação do fuso mitótico durante a divisão celular. O PTX tem a capacidade de se ligar com grande afinidade a um dos componentes dos microtúbulos, a  $\beta$ -tubulina, estimulando a sua polimerização que, conseqüentemente, estabiliza os microtúbulos. Deste modo, este fármaco suprime a

dinâmica dos microtúbulos, impedindo a sua despolimerização e, por fim, a separação dos cromossomas. Nas células tumorais, ao evitar este processo, bloqueia a mitose e conduz à apoptose, impedindo o crescimento do tumor.<sup>153</sup>

Este fármaco pode provocar reações de hipersensibilidade, que incluem hipotensão, dispneia com broncoespasmo, urticária e erupções cutâneas. Estas devem-se, essencialmente, à baixa solubilidade do PTX em água, facto que obriga à utilização de outros solventes, como o óleo de rícino polietoxilado (Cremophor<sup>®</sup> EL), que são os principais responsáveis por estas reações. Com o intuito de as minimizar, recorre-se a medidas de profilaxia, como a utilização de anti-histamínicos e corticosteroides. A nível hematológico, o PTX induz a mielossupressão que, por sua vez, está na origem de diversas infeções, principalmente nas vias urinárias e no aparelho respiratório superior. A longo prazo, tem efeito no desenvolvimento de neuropatia periférica, sendo esta uma das principais toxicidades limitantes da dose de PTX.<sup>154</sup>

Lipusu<sup>®</sup> é uma preparação que contém lipossomas encapsulados com PTX liofilizado, aprovada nos Estados Unidos da América e na China, que demonstrou atividade no tratamento de diversos tumores sólidos, como no cancro do ovário, da mama e no CPNPC.<sup>155</sup> Wang H & Zhang X, num estudo realizado em pacientes com CPNPC não tratados previamente com QT, demonstraram que a eficácia do tratamento na redução do tamanho tumoral ao fim de 2 ciclos com 175 mg/m<sup>2</sup> desta formulação lipossomal é semelhante à obtida no tratamento com a mesma dose de PTX na sua forma convencional, mas que a utilização de lipossomas na encapsulação deste fármaco permite reduzir os seus efeitos secundários, tanto ao nível hematológico e gastrointestinal, como no que concerne a reações de hipersensibilidade.<sup>156,157</sup>

Em indivíduos com CPNPC num estadió avançado é frequente a ocorrência de derrames pleurais malignos. Deste modo, Zhou J. *et al.*, num ensaio clínico de fase I procuraram investigar a viabilidade, farmacocinética, eficácia e toxicidade da administração de Lipusu<sup>®</sup> por oposição ao PTX convencional, em pacientes nesta situação clínica. Em 15 pacientes, 12 foram tratados com a formulação lipossomal e 3 com o PTX na sua forma livre. Verificou-se que a toxicidade da formulação lipossomal foi inferior à do PTX convencional, com dor torácica, anemia, neutropenia e hepatotoxicidade mínimas. A nível farmacocinético, concluiu-se que o fármaco na formulação lipossomal foi eliminado mais lentamente que o fármaco livre do líquido pleural (Figura 5.3), o que

permitiu obter taxas de controlo do derrame pleural superiores no final do primeiro, segundo, terceiro e sexto mês após o início do tratamento. Com estes resultados, demonstrou-se que a encapsulação de PTX em lipossomas parece ser útil no tratamento de efusões pleurais malignas, sendo necessária a realização de estudos de fase II, isto é, com um maior número de indivíduos, para confirmar esta mesma possibilidade.<sup>158</sup>

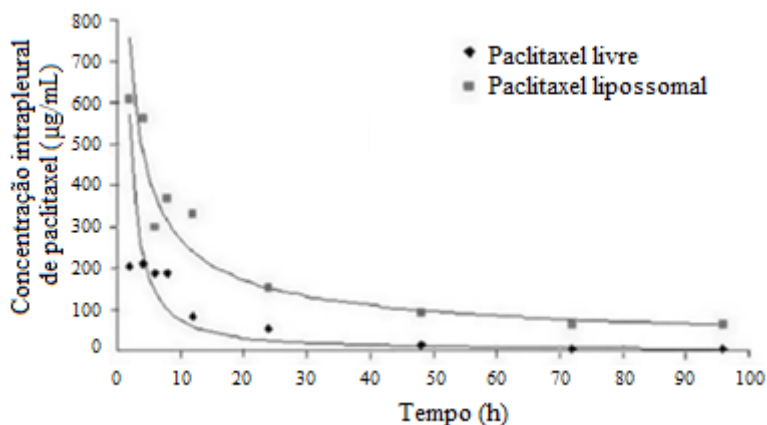


Figura 5.3 – Curva de eliminação intrapleurar do paclitaxel para os pacientes tratados com a formulação lipossomal e com o fármaco na sua forma livre. [Adaptado de (158)].

Como já foi mencionado, as células tumorais podem tornar-se resistentes a múltiplos fármacos devido a diversos mecanismos intrínsecos ou adquiridos. Esta situação, leva a que os resultados da QT sejam insatisfatórios, pelo que, numa tentativa de contornar esta limitação, Ju R. e os seus colaboradores procuraram desenvolver um tipo de lipossomas com PTX encapsulado, que têm acoplados à superfície péptidos de penetração celular, isto é, pequenos péptidos que facilitam a captação celular de várias estruturas moleculares, como nanossistemas. Os estudos foram realizados *in vitro*, em células LLC1, uma linha celular de CPNPC de rato, nomeadamente de carcinoma pulmonar, e em células LLC1 resistentes à DOX, e *in vivo*, em ratinhos com CPNPC resistente à DOX. Os resultados *in vitro* demonstraram que esta modificação na estrutura dos lipossomas aumenta significativamente a sua captação celular em células LLC1 e LLC1 resistentes, inibindo o crescimento celular e induzindo a apoptose destes dois tipos de células. *In vivo*, os estudos desenvolvidos nos ratinhos com células LLC1 resistentes demonstraram que os lipossomas aumentaram de forma excepcional a eficácia do PTX. Assim, é possível concluir que o acoplamento de péptidos de penetração celular à superfície dos lipossomas com PTX aparenta ser uma estratégia promissora no tratamento

do CPNPC resistente, sendo ainda necessários mais estudos, principalmente em humanos, para comprovar esta possibilidade.<sup>159</sup>

#### 5.2.4. Docetaxel

O DTX é um análogo semissintético do PTX descoberto e patenteado em 1986 por Nicholas J. Sisti e Charles S. Swindell. É produzido a partir das agulhas do teixo europeu (*Taxus baccata*), tendo sido aprovado em 1995 para o tratamento de diversos tumores sólidos, incluindo o cancro da mama, do ovário e o CPNPC, devido ao seu mecanismo de atuação, que tal como mencionado anteriormente no PTX, passa por promover a agregação da  $\beta$ -tubulina em microtúbulos estáveis e inibir a sua dissociação. Deste modo, este fármaco interrompe a rede microtubular nas células, que é essencial para determinadas funções celulares vitais, como a mitose e interfase.<sup>160,161</sup>

Os efeitos adversos associados à administração deste fármaco são os mesmos que foram descritos para o PTX. A utilização de lipossomas também tem vindo a ser solução de recurso para superar esses efeitos adversos e manter a eficácia terapêutica do DTX. Neste contexto, Fitch R. *et al.* avaliaram a utilização de MNK-010, uma formulação lipossomal de um pró-fármaco de DTX, comparativamente ao DTX livre, em dois modelos de xenotransplante de CPNPC em ratinhos imunodeficientes. Neste estudo, concluiu-se que em comparação com o DTX livre, a administração desta formulação por via IV permitiu uma libertação lenta e contínua do fármaco na circulação sanguínea e aumentou a sua acumulação nos tecidos tumorais, verificando-se uma redução das dimensões do tumor até valores inferiores aos níveis de quantificação após 9 dias de tratamento. Estes resultados sugerem que esta formulação é altamente tóxica para as células cancerígenas de CPNPC e que a vetorização poderá ser necessária para aumentar ainda mais a sua eficácia terapêutica.<sup>162</sup>

ATI-1123 é uma preparação lipossomal de DTX com aplicação no tratamento de diversos tumores sólidos. Em modelos pré-clínicos, comparativamente com o DTX livre, esta preparação aumentou o tempo de permanência em circulação e a exposição ao fármaco, conduzindo a uma maior atividade antitumoral. Por outro lado, demonstrou menor toxicidade sistémica relativamente ao DTX livre. Estes resultados promissores incentivaram a realização de ensaios clínicos em humanos. Neste sentido, com o objetivo de avaliar a segurança, tolerabilidade, farmacocinética e a eficácia desta preparação, 29 pacientes com tumores sólidos avançados, incluindo 9 que tiveram uma exposição

anterior ao DTX livre, foram recrutados para um ensaio de fase I envolvendo 2 centros de estudo. Neste, os pacientes foram submetidos a doses crescentes de ATI-1123 (entre 15 e 110 mg/m<sup>2</sup>), por via IV, a cada 3 semanas, tendo a preparação lipossomal demonstrado um perfil farmacocinético favorável e uma tolerabilidade aceitável até à dose de 90 mg/m<sup>2</sup>. Esta foi considerada a dose máxima tolerada, dado o facto de ter sido a dose mais alta a induzir apenas efeitos de toxicidade ligeira nos indivíduos. Além disso, em 22 pacientes observou-se uma estabilização da doença ao fim de 3 meses e, num paciente com CPNPC, verificou-se uma resposta parcial, com redução de 61% da massa tumoral.<sup>163,164</sup>

Num outro estudo, Wang J. *et al.* analisaram o metabolismo e a excreção de lipossomas com DTX encapsulado cujo alvo são os pulmões, em comparação com DTX livre, utilizando modelos experimentais animais *in vitro* e *in vivo*. Verificou-se que tanto a formulação lipossomal como o DTX livre foram degradados de forma semelhante *in vitro* e *in vivo* por homogeneizados de fígado e microsomas, mas que não foram metabolizados por um homogeneizado de pulmão (Figura 5.4). Por outro lado, a formulação lipossomal mostrou uma excreção significativamente reduzida nas fezes e na urina dos animais utilizados no estudo em comparação com a excreção de DTX livre. Deste modo, é possível concluir que a veiculação de DTX em lipossomas não altera o metabolismo do fármaco *in vitro* e *in vivo*, e que a diminuição da sua eliminação pode contribuir para o aumento da eficácia terapêutica e redução da toxicidade sistémica deste fármaco para o tratamento do CPNPC.<sup>160</sup>

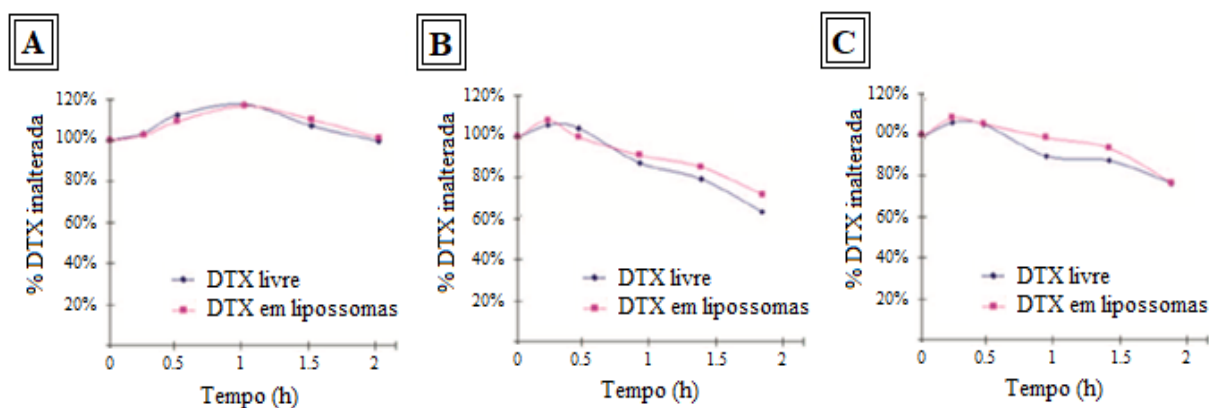


Figura 5.4 – Metabolismo *in vitro* de DTX livre e DTX encapsulado em lipossomas em diferentes homogeneizados de tecido do modelo experimental utilizado no estudo. A: Percentagem de DTX incubado num homogeneizado de pulmão a diferentes tempos. B: Percentagem de DTX incubado num homogeneizado de fígado a diferentes tempos. C: Percentagem de DTX incubado com microsomas de fígado do modelo experimental a diferentes tempos. [Adaptado de (160)].

O antígeno CD133 é um marcador que se encontra expresso nas células estaminais cancerígenas dos tumores sólidos, tal como o CPNPC. Dado que as células estaminais cancerígenas que expressam o antígeno CD133 possuem uma capacidade de autorrenovação, proliferação, diferenciação e formação de tumores *in vivo* nos ratinhos superior à observada nas células que não o expressam, eliminar essas células estaminais pode aumentar a eficácia terapêutica dos fármacos antineoplásicos. Neste sentido, Ma J. *et al.* prepararam um novo sistema de lipossomas com DTX encapsulado modificados com um aptâmero que se liga especificamente a este antígeno e analisaram a sua eficácia e toxicidade. Os resultados *in vivo* demonstraram que este sistema conduz a uma redução significativa da toxicidade sistémica e a uma elevada inibição do crescimento tumoral em ratinhos xenotransplantados com células tumorais A549, ou seja, com CPNPC (Figura 5.5).<sup>165</sup>

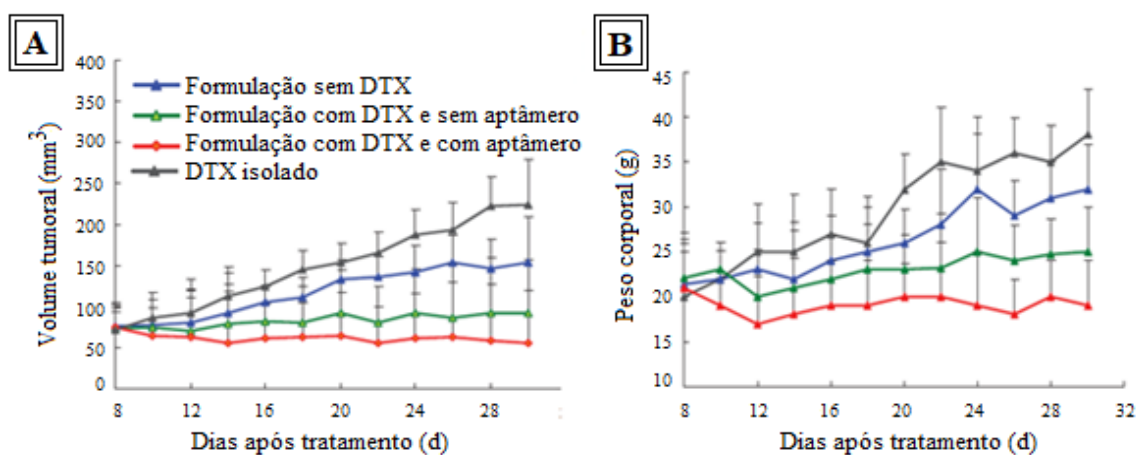


Figura 5.5 – Resultados obtidos no estudo desenvolvido por Ma J. *et al.* A: Inibição do crescimento tumoral em ratinhos xenotransplantados com células A549 por DTX em diferentes formulações. B: Peso corporal do animal. Os pesos corporais dos animais tratados foram continuamente monitorizados para investigar a citotoxicidade sistémica do DTX em diferentes formulações. [Adaptado de (165)].

### 5.2.5. Tecemotide

O tecemotide, também designado por BLP25, é um lipopéptido sintético desenvolvido em 1998 por Babita Agrawal, Mark J. Krantz, Mark A. Reddish e B. Michael Longenecker, e patenteado pela Oncothyreon Inc., cuja aplicação na terapêutica antitumoral tem sido investigada devido à sua capacidade de estimular a atividade das células T contra a mucina 1 (MUC1), uma glicoproteína cujos níveis de expressão são bastante elevados em determinados cancros, incluindo aproximadamente 86% dos adenocarcinomas e 74% dos restantes tipos de CPNPC.<sup>166</sup>

A MUC1 encontra-se expressa tanto em tecidos normais como em tecidos tumorais. Nos tecidos normais, habitualmente essa expressão é restrita à superfície apical das células epiteliais polarizadas secretoras de mucinas. Contudo, nas células tumorais, além da sobre expressão verifica-se também a perda dessa polaridade de expressão, bem como uma redução acentuada da sua glicosilação, com o encurtamento das cadeias laterais dos hidratos de carbono, que expõem os epítomos (porção do antígeno com potencial de originar uma resposta imune) do núcleo peptídico ou formam novos epítomos. Além disso, nos tecidos tumorais, esta glicoproteína está envolvida em interações anormais com recetores de tirosina quinase e outros recetores da superfície celular. Essas interações anormais desencadeiam a ativação inapropriada das vias de sinalização intracelular, promovendo o crescimento, proliferação e sobrevivência das células tumorais. O longo domínio extracelular da MUC1 confere ainda propriedades antiadesivas, que impedem a adesão celular e favorecem a metastização. Deste modo, é possível constatar que vários fatores tornam a MUC1 um excelente alvo para imunoterapia nos indivíduos com CPNPC, incluindo a sobre expressão na superfície celular e a sub-glicosilação, com a consequente exposição dos epítomos antigénicos.<sup>166-168</sup>

Stivumax<sup>®</sup>, também designado por L-BLP25, é uma vacina lipossómica que consiste num lipopéptido sintético de 25 aminoácidos derivados da região de sequências repetitivas do ADN da glicoproteína MUC1, juntamente com o lípido monofosforil A, que tem o intuito de funcionar como adjuvante na indução de uma resposta imune celular, e três outros lípidos diferentes. A utilização de lipossomas como sistema de libertação pretende facilitar a captação do lipopéptido antigénico por células apresentadoras de antígenos (APC), para posterior apresentação ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I. Esta apresentação conduz a uma resposta imunitária de células T específicas para o antígeno que atua nos tumores que expressam a MUC1, tal como é o caso do CPNPC.<sup>167,168</sup> Nos estudos pré-clínicos desenvolvidos em roedores, Stivumax<sup>®</sup> induziu uma resposta imune celular caracterizada por proliferação de células T específicas para o antígeno. Estes resultados conduziram à realização de ensaios de fase I e II para avaliar a eficácia e a segurança desta vacina.<sup>168</sup> Num ensaio de fase I realizado com o objetivo de avaliar a segurança e imunogenicidade desta vacina em indivíduos com CPNPC nos estadios IIIB ou IV, Palmer *et al.* demonstraram que a vacina

L-BLP25 pode ser administrada com um mínimo de toxicidade, dado que esta foi bem tolerada e induziu uma resposta imune celular nesses indivíduos.<sup>169</sup>

Um ensaio aberto e randomizado de fase II recrutou 171 pacientes com CPNPC nos estadios IIIB e IV, previamente submetidos a QT de primeira linha, de 17 centros no Canadá e no Reino Unido. Estes foram aleatoriamente divididos em 2 grupos: um que recebeu apenas terapia de suporte, isto é, medidas que visam a prevenção e o controlo dos efeitos adversos do próprio cancro e do tratamento; e um outro grupo, que para além da terapia de suporte, recebeu uma dose única IV de ciclofosfamida (para aumentar o efeito da imunoterapia), seguida de 8 imunizações semanais por via subcutânea de Stivumax® e imunizações de manutenção a cada 6 semanas a partir de então. Após os 53 meses de acompanhamento, os resultados obtidos para todos os pacientes envolvidos no estudo demonstraram apenas uma taxa de sobrevida média ligeiramente superior no grupo tratado com Stivumax® em comparação com o outro grupo (17.4 vs. 13.0 meses), ao passo que nos 65 pacientes no estadio IIIB, a média da taxa de sobrevida no grupo tratado com esta vacina foi muito superior à verificada para o outro grupo (30.6 vs. 13.3 meses) (Figura 5.6). Deste modo, é possível constatar que a administração de Stivumax® pode prolongar a sobrevivência dos pacientes com CPNPC no estadio IIIB.<sup>168,170</sup>

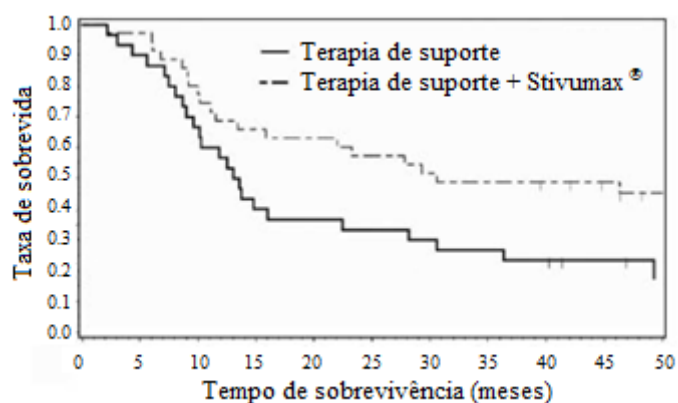


Figura 5.6 – Análise da taxa de sobrevida, ao longo dos 53 meses de acompanhamento, para os 65 pacientes no estadio IIIB. Verificou-se um aumento significativo da taxa de sobrevida nos pacientes tratados com Stivumax®, face aos pacientes submetidos apenas a uma terapia de suporte. [Adaptado de (167)].

Charles Butts e os seus colaboradores desenvolveram um ensaio duplo-cego, internacional e randomizado de fase III, denominado START. Para este estudo foram recrutados 1513 pacientes com CPNPC num estadio III inoperável, alguns deles previamente submetidos a RT e QT simultânea ou sequencialmente. Desses pacientes,

274 foram excluídos e, aleatoriamente, 410 foram alocados para receber o placebo enquanto os restantes 829, foram alocados para receber o tecemotide semanalmente durante 8 semanas, seguido da administração a cada 6 semanas até progressão ou regressão da doença. Através dos resultados obtidos, foi possível concluir que a terapia de manutenção com Stivumax® no CPNPC no estadio III foi bem tolerada, mas não prolongou significativamente a sobrevida global, tendo-se verificado apenas uma melhoria notável da sobrevida global nos pacientes que receberam o Stivumax® após serem submetidos a tratamentos com RT e QT em simultâneo (Figura 5.7).<sup>166</sup>

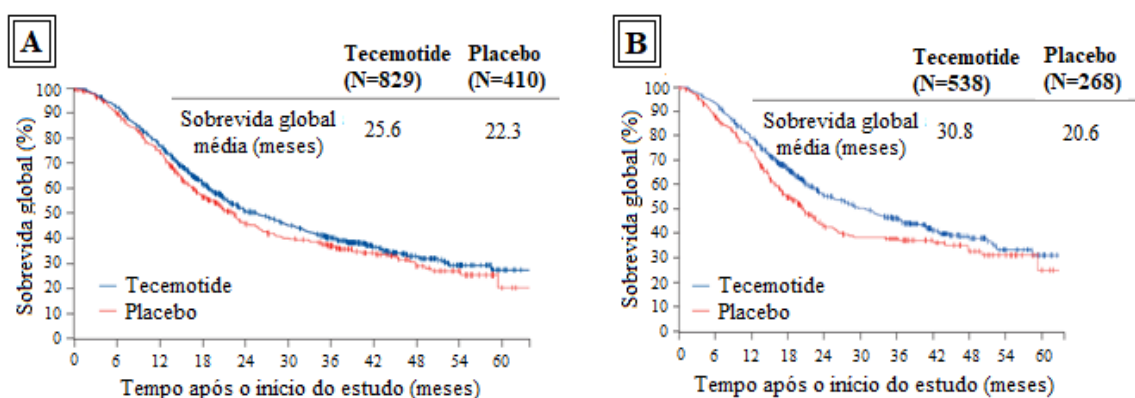


Figura 5.7 – Comparação da curva de sobrevivência de Kaplan-Meier ao longo do tempo após o início do estudo nos pacientes tratados com tecemotide e nos tratados com um placebo. A: Sobrevida global em todos os pacientes envolvidos no estudo. B: Sobrevida global nos pacientes que receberam o fármaco após RT e QT em simultâneo. [Adaptado de (166)].

Como tal, é necessário o desenvolvimento de mais estudos com o intuito de entender a interação entre a imunoterapia específica para a MUC1 e a RQT prévia. Neste sentido, diversos ensaios encontram-se em fase de desenvolvimento a nível internacional, para determinar se novas imunoterapias podem originar melhorias significativas nos principais resultados clínicos (como a sobrevida global) em pacientes com CPNPC, para definir quais as populações que beneficiarão mais desta modalidade de tratamento, bem como para determinar qual a duração de tratamento que conduz a melhores resultados.<sup>168</sup>

### 5.2.6. TUSC2

*Tumor suppressor candidate 2* (TUSC2), também designado por FUS1, é um gene supressor de tumores identificado em 1998, por Latif F., Duh F. e Kuzmin I., na região 3p21.3 dos cromossomas humanos. Em muitos cancros humanos, incluindo o CPNPC, é frequente que, num estadio precoce, ocorra perda de alelos e de alterações genéticas nesta

região cromossômica. Consequentemente, a expressão da proteína FUS1 está ausente ou reduzida na maioria dos carcinomas pulmonares.<sup>171,172</sup>

Esta proteína induz os seus efeitos antitumorais através da regulação de diversos processos celulares e de sinalização molecular. Regula, essencialmente, a progressão do ciclo celular na fase G1, a apoptose, a homeostasia do cálcio, bem como a expressão genética e a atividade de várias proteínas quinases, por mecanismos ainda desconhecidos. Deste modo, o restabelecimento da função da proteína FUS1 nas células pulmonares tumorais com deficiência em 3p21.3 inibe o crescimento das células tumorais, por indução da apoptose e alterações da cinética do ciclo celular.<sup>171,172</sup>

Vários estudos têm sido desenvolvidos, tanto em modelos pré-clínicos como clínicos, com o intuito de avaliar os efeitos do restabelecimento da proteína FUS1 no tratamento do CPNPC. Para tal, uma cassette de expressão plasmidial que codifica a proteína é encapsulada num lipossoma constituído por um lípido catiónico, o 1,2-dioleil-3-trimetilamónio-propano (DOTAP), e por colesterol numa relação molar de 1:1. Esta formulação lipossomal é designada por DOTAP:Chol-Fus1 e num ensaio pré-clínico, desenvolvido em ratinhos xenotransplantados com células A549, demonstrou uma inibição significativa do crescimento do tumor, uma redução no número de nódulos tumorais metastáticos, bem como um aumento do tempo de sobrevivência destes animais, em comparação com os animais controlo, tratados apenas com o plasmídeo FUS1 (Figura 5.8). Assim, estes resultados sugerem a potente atividade supressora de tumores da proteína FUS1 e demonstram que esta formulação poderá ser um agente terapêutico no tratamento do CPNPC primário e metastático.<sup>173</sup>

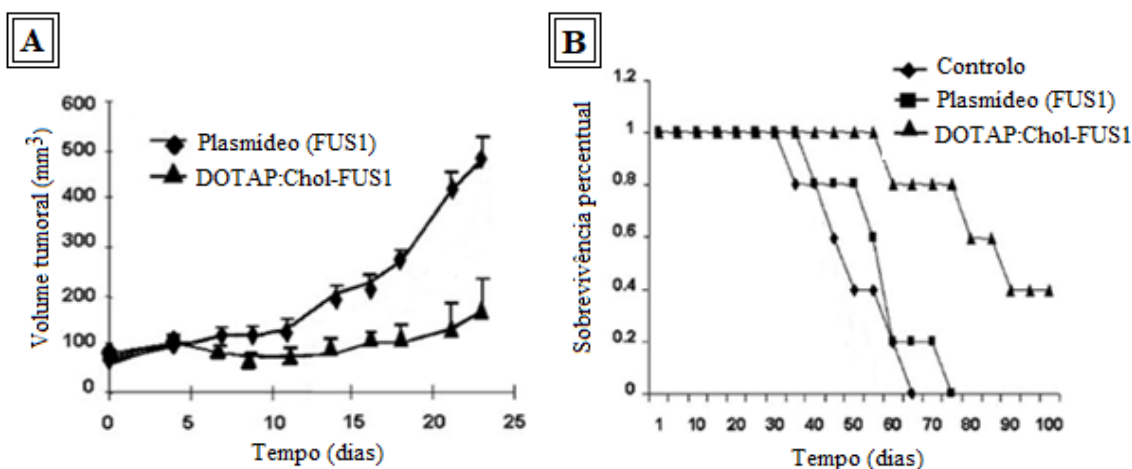


Figura 5.8 – Resultados obtidos num ensaio pré-clínico desenvolvido em ratinhos xenotransplantados com células A549. A: Comparação da inibição do crescimento tumoral entre os ratinhos tratados com a formulação DOTAP:Chol-FUS1 e os tratados com o plasmídeo FUS1. B: Comparação do tempo de sobrevivência entre os ratinhos tratados com a formulação DOTAP:Chol-FUS1 e os tratados com o plasmídeo FUS1. [Adaptado de (173)].

Num ensaio clínico de fase I, Lu C. *et al.* procuraram avaliar os efeitos da administração IV desta formulação lipossomal, a cada 3 semanas, a 31 pacientes com CPNPC recidivante e/ou metastático previamente tratados com derivados de platina. Os resultados obtidos demonstraram que em 2 pacientes houve uma redução do tamanho do tumor primário, que em 5 houve uma estabilização da doença durante 2.6 a 10.8 meses, enquanto nos restantes a doença evoluiu. Foram realizadas biópsias a alguns dos pacientes envolvidos no estudo antes e após o tratamento, e a análise destas permitiu verificar que a administração desta formulação lipossomal induz um aumento de 10 a 25 vezes nos níveis de FUS1 que, por sua vez, promove alterações significativas na via de apoptose intrínseca das células tumorais. Além disso, a administração da formulação em intervalos de 3 semanas possibilitou a avaliação da sua toxicidade, não tendo sido observadas mudanças nas características de crescimento das células normais após a captação do gene, sendo esta preparação bem tolerada pelo organismo.<sup>174</sup>

Os resultados satisfatórios que esta formulação lipossomal tem demonstrado, em termos de eficácia e segurança, têm incentivado o desenvolvimento de mais estudos, com o intuito de solidificar a sua aplicabilidade. Neste sentido, diversos estudos encontram-se em fase de desenvolvimento, tal como um ensaio clínico de fase I/II que pretende avaliar a possível eficácia e a dose máxima tolerada da combinação de DOTAP:Chol-Fus1 com Erlotinib no tratamento do CPNPC no estadio IV, bem como a segurança desta combinação. De acordo com o protocolo do estudo, a 57 pacientes com a patologia é administrada uma determinada dose da formulação lipossomal no dia 1 de um ciclo de 21 dias e uma dose diária de Erlotinib. Os resultados serão publicados durante o ano corrente e a dose máxima tolerada será obtida após o primeiro ciclo de tratamento, enquanto a taxa de resposta a este tratamento será determinada ao fim de 2 ciclos, verificando-se se houve uma resposta completa, parcial ou se não houve qualquer resposta, continuando o tumor a progredir.<sup>175</sup>

### **5.2.7. Outras moléculas vetorizadas por lipossomas**

Para além das moléculas anteriormente mencionadas, outras têm sido investigadas tendo em vista a sua aplicação no tratamento do CPNPC. Neste sentido, na Tabela 5.1 encontram-se resumidas algumas moléculas em ensaios clínicos e pré-clínicos para vetorização por lipossomas com aplicação nesta patologia.

Tabela 5.1 – Exemplos de moléculas com atividade antitumoral que se encontram em ensaios clínicos e pré-clínicos para vetorização por lipossomas com aplicação no CPNPC. [Adaptado de (176–178)].

<i>Composto Ativo</i>	<i>Nome do Produto</i>	<i>Via de Administração</i>	<i>Indicação Terapêutica</i>	<i>Estado do Ensaio</i>
<i>Irinotecano</i>	IHL-305	Intravenosa	CPNPC e outros tumores sólidos (colorretal, próstata, ovário e gástrico)	Fase Pré-clínica
<i>Ácido trans-retinóico (ATRA)</i>	Lipo-ATRA	Intravenosa	CPNPC e outros tumores sólidos	Fase Pré-clínica
<i>Vinorelbina</i>	Alocrest (ou INX-0125)	Intravenosa	Tumores sólidos avançados (incluindo CPNPC)	Fase I
<i>Oxaliplatina</i>	MBP-426	Intravenosa	Tumores sólidos avançados ou metastáticos	Fase I
<i>Lurtotecano</i>	OSI-211	Intravenosa	CPNPC e cancro no ovário recorrente	Fase II

## 6. Conclusão

O CPNPC é uma neoplasia que apresenta elevadas taxas de incidência e mortalidade em todo o mundo. Caracteriza-se pela sua agressividade e rápida progressão, que dificulta a realização de um diagnóstico numa fase precoce e, conseqüentemente, torna o prognóstico reservado. Além disso, as terapêuticas convencionais apresentam várias desvantagens, como a falta de seletividade para as células tumorais, causando efeitos adversos nas células saudáveis.

Na tentativa de garantir aos doentes melhores perspectivas de tratamento, bem como um melhor estado fisiológico e psicológico na luta contra esta patologia, tem-se verificado um aumento acentuado na investigação de novas opções terapêuticas. Neste sentido, a vetorização de terapêuticas anticancerígenas mediada por nanossistemas tem demonstrado ser um grande avanço na procura de um tratamento mais eficaz e simultaneamente mais seguro para o doente.

Entre os nanossistemas existentes, os lipossomas possuem características que os tornam excelentes veículos de fármacos. As suas dimensões nanométricas tornam-nos compatíveis com a maioria dos processos que ocorrem no organismo humano. A sua estrutura permite a encapsulação simultânea de fármacos, pelo que estes podem atuar em diferentes mecanismos do tumor, aumentando a eficácia do tratamento. Além disso, a possibilidade de modificação e funcionalização da sua superfície permite prolongar o tempo de circulação dos fármacos, direcionar o nanossistema para as células tumorais, devido à presença de recetores e marcadores moleculares específicos nestas, bem como controlar e programar a libertação dos fármacos. Esta situação é possível tirando partido das diferentes condições observadas entre os tecidos tumorais e os tecidos normais, ao garantir que a libertação apenas ocorre na presença de determinadas enzimas específicas ou em resposta a determinados estímulos, como alterações do pH e temperatura. Contudo, ainda que todas estas características e possibilidades dos lipossomas estejam disponíveis, de facto não se encontra descrito o aproveitamento de todas na aplicação destas estruturas em CPNPC, tornando-se pertinente um aumento da investigação, com o intuito de avaliar de que forma o seu aproveitamento pode influenciar positivamente o tratamento desta patologia.

Apesar dos resultados promissores obtidos nos diversos estudos, ensaios pré-clínicos e clínicos desenvolvidos nos últimos anos, ainda não existem formulações lipossomais para a terapêutica do CPNPC no mercado. Esta situação deve-se essencialmente ao facto de ainda não se ter um conhecimento completo acerca da sua segurança e toxicidade, sendo necessários mais estudos na área da nanotoxicologia, de modo a estabelecer os seus efeitos a longo prazo na saúde humana. Alguns dos estudos descritos da aplicação destas formulações em CPNPC, incluem nos tratamentos a administração prévia ou simultânea de outros fármacos citotóxicos, o que dificulta tanto a garantia de que estas formulações lipossomais contribuem para os resultados alcançados, como a confirmação de que a sua eficácia é semelhante à obtida pelo fármaco na forma livre. Além disso, a grande maioria das terapias foram estudadas em linhas celulares e modelos animais, que apesar de fornecerem informações de relevância, não permitem extrapolar com grande rigor os resultados obtidos. Um exemplo são os estudos envolvendo ligandos acoplados à superfície dos lipossomas, que embora tenham demonstrado um aumento da seletividade para o local tumoral e, conseqüentemente, uma maior eficácia e menor toxicidade, apenas foram realizados *in vitro* e *in vivo*. Deste modo,

os resultados observados não permitem tirar conclusões credíveis sobre a aplicação, em indivíduos portadores de CPNPC, destas estruturas modificadas e funcionalizadas, isto é, aproveitando, tal como foi referido anteriormente, uma das suas principais características. Em paralelo, os ensaios clínicos descritos para os diversos fármacos e moléculas são essencialmente de fase I e II, realizados alguns deles em pacientes com tumores sólidos (em que apenas uma pequena fração apresenta a patologia). Assim sendo, de modo a obter conclusões mais fidedignas sobre a eficácia terapêutica e a segurança a longo prazo, permitindo a determinação dos efeitos adversos não esperados, é crucial a realização de ensaios de fase III e IV, com um maior número de pacientes com CPNPC.

A nanotecnologia é uma área que ainda está a dar os primeiros passos, mas que atendendo aos resultados promissores demonstrados nos estudos descritos, se prevê que venha a desempenhar um papel relevante no futuro da terapêutica clínica e na qualidade de vida dos doentes com esta patologia. Assim, é essencial insistir na investigação nesta área, procurando desenvolver nanossistemas que conciliem o melhor dos estudos que têm sido realizados, com ligandos acoplados à sua superfície e que permitam uma encapsulação simultânea de diversas moléculas, tal como a cisplatina e o tecemotide, que atuam no CPNPC por mecanismos distintos (permitindo, conseqüentemente, uma ação sinérgica) e individualmente têm apresentado excelentes resultados, encontrando-se na fase III do processo de desenvolvimento. Deste modo, o investimento nesta área e o aprofundamento do conhecimento obtido até aos dias de hoje, bem como a sua exploração, torna-se particularmente fulcral para melhorar não só a qualidade de vida dos pacientes, como para dar um novo rumo ao combate daquele que é um dos maiores medos da população, dado o contínuo aumento das taxas de incidência e mortalidade em todo o mundo deste tipo de cancro.

## 7. Referências Bibliográficas

---

1. National Cancer Institute. What is cancer? [Internet]. 2014 [Acedido a 24 de janeiro de 2018]. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
2. World Health Organization. Cancer - Key facts [Internet]. 2018 [Acedido a 30 de junho de 2018]. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
3. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 9th edition. Elsevier/Saunders, editor. Philadelphia, PA; 2015. p. 1391.
4. Siddiqui IA, Sanna V, Ahmad N, Sechi M, Mukhtar H. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1348(1):20–31.
5. Laso FJ. Patología General - Introducción a la medicina clínica. Masson, editor. 2005. p. 1-827.
6. Curtius K, Wright NA, Graham TA. An evolutionary perspective on field cancerization. *Nat Rev Cancer*. 2017;18(1):19–32.
7. Abel EL, Angel JM, Kiguchi K, Digiovanni J. Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: fundamentals and applications. *Nat Protoc*. 2011;4(9):1350–62.
8. Pinto AM. Fisiopatologia - Fundamentos e Aplicações. 2ª edição. Lidel, editor. Lousã; 2009. p. 291-315.
9. Raso MG, Behrens C, Herynk MH, Liu S, Prudkin L, Ozburn NC, et al. Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors identifies a subset of NSCLCs and correlates with EGFR mutation. *Clin Cancer Res*. 2009;15(17):5359–68.
10. Madani SY, Naderi N, Dissanayake O, Tan A, Seifalian AM. A new era of cancer treatment: carbon nanotubes as drug delivery tools. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:2963–79.
11. Dhar S, Liu Z, Thomale J, Dai H, Lippard SJ. Targeted single-wall carbon nanotube-mediated Pt ( IV ) prodrug delivery using folate as a homing device. *J Am Chem Soc*. 2008;130(34):11467–76.
12. Chen G, Roy I, Yang C, Prasad PN. Nanochemistry and nanomedicine for nanoparticle-based diagnostics and therapy. *Chem Rev*. 2016;116(5):2826–85.
13. Torchilin VP. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *The AAPS Journal*. 2007;9(2):E128–47.
14. Thorley AJ, Tetley TD. New perspectives in nanomedicine. *Pharmacol Ther*. 2013;140(2):176–85.
15. Babu A, Templeton AK, Munshi A, Ramesh R. Nanoparticle-based drug delivery for therapy of lung cancer : progress and challenges. *Journal of Nanomaterials*. 2013;1–12.
16. Seeley RR, Stephens TD, Tate P. Aparelho Respiratório. In: Lusociência, editor. *Anatomia & Fisiologia*. 6ª edição. Loures; 2006. p. 826–64.
17. Figueiredo A, Barata F. Perguntas frequentes do doente com cancro do pulmão [Internet]. Sociedade Portuguesa de Pneumologia. 2006. [Acedido a 20 de janeiro de 2018]. Disponível em: <http://www.sppneumologia.pt/uploads/files/spp/PDF21.pdf>
18. Kligerman S, White C. Epidemiology of lung cancer in women: risk factors, survival, and screening. *Am J Roentgenol*. 2011;196(2):287–95.
19. Centers for Disease Control and Prevention. What is lung cancer? [Internet]. 2014

- [Acedido a 25 de janeiro de 2018]. Disponível em: [https://www.cdc.gov/cancer/lung/basic\\_info/what-is-lung-cancer.htm](https://www.cdc.gov/cancer/lung/basic_info/what-is-lung-cancer.htm)
20. Fauci A, Kasper D, Braunwald E, Hauser S, Longo D, Jameson J, et al. Harrison's principles of internal medicine. 17th edition. McGraw-Hill Professional, editor. Journal of Chemical Information and Modeling. New York; 2008. p. 368-374.
  21. Miller YE. Pathogenesis of lung cancer: 100 year report. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;33(3):216–23.
  22. Wu K, Wong E, Chaudhry S. Lung cancer - McMaster pathophysiology review [Internet]. 2015 [Acedido a 25 de janeiro de 2018]. Disponível em: <http://www.patophys.org/lung-cancer/#Treatment>
  23. American Cancer Society. What is non-small cell lung cancer? [Internet]. 2016 [Acedido a 8 de fevereiro de 2018]. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/non-small-cell-lung-cancer/about/what-is-non-small-cell-lung-cancer.html>
  24. Sotto-Mayor R. Mortalidade por cancro do pulmão. *Acta Med Port.* 2014;27(1):9–11.
  25. American Cancer Society. What is small cell lung cancer? [Internet]. 2017 [Acedido a 26 de janeiro de 2018]. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/small-cell-lung-cancer/about/what-is-small-cell-lung-cancer.html>
  26. Queiroga H. Cancro do pulmão. In: Relatório ONDR 2017. 2017. p. 57–64.
  27. de Groot P, Munden RF. Lung cancer epidemiology, risk factors, and prevention. *Radiol Clin North Am.* 2012;50(5):863–76.
  28. American Cancer Society. Key statistics for lung cancer [Internet]. 2018 [Acedido a 8 de fevereiro de 2018]. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/non-small-cell-lung-cancer/about/key-statistics.html>
  29. Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung cancer: epidemiology, etiology and prevention. *Clin Chest Med.* 2011;32(4):1–61.
  30. Didkowska J, Wojciechowska U, Mańczuk M, Łobaszewski J. Lung cancer epidemiology: contemporary and future challenges worldwide. *Ann Transl Med.* 2016;4(8):1–11.
  31. Direção-Geral da Saúde. Doenças oncológicas em números 2015 - programa nacional para as doenças oncológicas. 2016; p. 5–65.
  32. World Health Organization. Key facts about cancer [Internet]. 2012 [Acedido a 8 de fevereiro de 2018]. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/about/facts/en/>
  33. Direção-Geral da Saúde. Programa nacional para as doenças oncológicas. 2013.
  34. Alberg AJ, Brock M V., Ford JG, Samet JM, Spivack SD. Epidemiology of lung cancer: diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest.* 2013;143(5 Suppl):e1S–29S.
  35. U.S. National Library of Medicine. Lung cancer - Genetic Home Reference [Internet]. 2018 [Acedido a 13 de fevereiro de 2018]. Disponível em: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/lung-cancer>
  36. Langer CJ. Roles of EGFR and KRAS mutations in the treatment of patients with non-small-cell lung cancer. *P T.* 2011 May;36(5):263–79.
  37. Lee T, Lee B, Choi Y-L, Han J, Ahn M-J, Um S-W. Non-small cell lung cancer with concomitant EGFR, KRAS, and ALK mutation: clinicopathologic features of 12 Cases. *J Pathol Transl Med.* 2016;50(3):197–203.
  38. U.S. National Library of Medicine. ALK gene - Genetic Home Reference [Internet]. 2018 [Acedido a 13 de fevereiro de 2018]. Disponível em: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ALK>
  39. U.S. National Library of Medicine. KRAS gene - Genetic Home Reference

- [Internet]. 2018 [Acedido a 13 de fevereiro de 2018]. Disponível em: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/KRAS>
40. U.S. National Library of Medicine. EGFR gene - Genetic Home Reference [Internet]. 2018 [Acedido a 13 de fevereiro de 2018]. Disponível em: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/EGFR>
  41. Centers for Disease Control and Prevention. What are the risk factors for lung cancer? [Internet]. 2017 [Acedido a 15 de novembro de 2017]. Disponível em: [http://www.cdc.gov/cancer/lung/basic\\_info/risk\\_factors.htm](http://www.cdc.gov/cancer/lung/basic_info/risk_factors.htm)
  42. Turner MC, Krewski D, Chen Y, Pope CA, Gapstur S, Thun MJ. Radon and lung cancer in the American Cancer Society cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(3):438–48.
  43. Morgan WF, Sowa MB. Effects of ionizing radiation in nonirradiated cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(40):14127–8.
  44. National Health Service. Symptoms of lung cancer [Internet]. 2015 [Acedido a 31 de janeiro de 2018]. Disponível em: <https://www.nhs.uk/conditions/lung-cancer/symptoms/>
  45. Canadian Cancer Society. Symptoms of lung cancer [Internet]. 2018 [Acedido a 31 de janeiro de 2018]. Disponível em: <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/lung/signs-and-symptoms/?region=ab>
  46. Hammerschmidt S, Wirtz H. Lung cancer: current diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 2009 Dec;106(49):809-18-20.
  47. Teh E, Belcher E. Lung cancer: Diagnosis, staging and treatment. *Surg (United Kingdom).* 2014;32(5):242–8.
  48. Gridelli C, Rossi A, Carbone DP, Guarize J, Karachaliou N, Mok T, et al. Non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Prim.* 2015;1:1–16.
  49. Ministério da Saúde. Recomendações nacionais para diagnóstico e tratamento do cancro do pulmão 09. Direção-Geral da Saúde. 2009; p. 41–64.
  50. Silvestri GA, Gonzalez AV, Jantz MA, Margolis ML, Gould MK, Tanoue LT, et al. Methods for staging non-small cell lung cancer: diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest.* 2013;143(5 Suppl):e211S–e250S.
  51. Carson J, Finley DJ. Lung cancer staging: an overview of the new staging system, and implications for radiographic clinical staging. *Semin Roentgenol.* 2011;46(3):187–93.
  52. de Groot PM, Carter BW, Betancourt Cuellar SL, Erasmus JJ. Staging of lung cancer. *Clin Chest Med.* 2015;36(2).
  53. Akhurst T. Staging of non–small-cell lung cancer. *PET Clin.* 2018;13(1):1–10.
  54. Lee WH, Loo CY, Traini D, Young PM. Inhalation of nanoparticle-based drug for lung cancer treatment: advantages and challenges. *Asian J Pharm Sci.* 2015;10(6):481–9.
  55. Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res.* 2016;5(3):288–300.
  56. Direção-Geral da Saúde. Norma nº 032/2013 - Diagnóstico e tratamento do carcinoma de não pequenas células do pulmão. 2013;(32):1–36.
  57. Brunelli A, Kim AW, Berger KI, Addrizzo-Harris DJ. Physiologic evaluation of the patient with lung cancer being considered for resectional surgery: diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest.* 2013;143(5 Suppl):e166S–e190S.
  58. Medford-Davis L, Decamp M, Recht A, Flickinger J, Belani CP, Varlotto J.

- Surgical management of early-stage non-small cell lung carcinoma and the present and future roles of adjuvant therapy: a review for the radiation oncologist. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012;84(5):1048–57.
59. American Cancer Society. Radiation therapy for non-small cell lung cancer [Internet]. 2016 [Acedido a 14 de fevereiro de 2018]. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/non-small-cell-lung-cancer/treating/radiation-therapy.html>
  60. American Cancer Society. Chemotherapy for non-small cell lung cancer. [Internet]. 2016 [Acedido a 14 de fevereiro de 2018]. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/non-small-cell-lung-cancer/treating/chemotherapy.html>
  61. Mazzone P, Mekhail T. Current and emerging medical treatments for non-small cell lung cancer: a primer for pulmonologists. *Respir Med.* 2012;106(4):473–92.
  62. Associação Portuguesa de Luta Contra o Cancro do Pulmão. Quimioterapia [Internet]. 2011 [Acedido a 15 de fevereiro de 2018]. Disponível em: <http://www.pu-lmonale.pt/o-cancro-do-pulmao/quimioterapia>
  63. American Cancer Society. Immunotherapy for non-small cell lung cancer. [Internet]. 2016 [Acedido a 16 de fevereiro de 2018]. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/non-small-cell-lung-cancer/treating/immunotherapy.html>
  64. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature.* 2018;553(7689):446–54.
  65. Wigle DA. Personalized therapy for non-small cell lung cancer: hype or clinical reality?. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2011;23(1):30–5.
  66. Cheng L, Alexander RE, MacLennan GT, Cummings OW, Montironi R, Lopez-Beltran A, et al. Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine. *Mod Pathol.* 2012;25(3):347–69.
  67. Tiwari M. Nano cancer therapy strategies. *J Cancer Res Ther.* 2012;8(1):19–22.
  68. Albulet D, Florea DA, Boarca B, Ditu LM, Chifiriuc MC, Grumezescu AM, et al. Nanotechnology for personalized medicine: cancer research, diagnosis, and therapy. *Nanostructures for Cancer Therapy.* Elsevier Inc.; 2017. p. 1-21.
  69. Wilczewska AZ, Niemirowicz K, Markiewicz KH, Car H. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol Rep.* 2012;64(5):1020–37.
  70. Caban S, Aytakin E, Sahin A, Capan Y. Nanosystems for drug delivery. *OA Drug Des Deliv.* 2014;2(1):1–7.
  71. International Standards Organization. 80004-1: Nanotechnologies-vocabulary-part 1: core terms. Geneva, Switzerland; 2010.
  72. van der Meel R, Fens MH, Vader P, van Solinge WW, Eniola-Adefeso O, Schiffelers RM. Extracellular vesicles as drug delivery systems: lessons from the liposome field. *J Control Release.* 2014;195:72–85.
  73. Coniot J, Silva JM, Fernandes JG, Silva LC, Gaspar R, Brocchini S, et al. Cancer immunotherapy: nanodelivery approaches for immune cell targeting and tracking. *Front Chem.* 2014;2(November):1–27.
  74. Batista CM, Carvalho CMB, Magalhães NSS. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. *Rev Bras Ciências Farm.* 2007;43(2):167–79.
  75. Chuang S-Y, Lin C-H, Huang T-H, Fang J-Y. Lipid-based nanoparticles as a potential delivery approach in the treatment of rheumatoid arthritis. *Nanomaterials.* 2018;8(1):42-58.
  76. Zununi Vahed S, Salehi R, Davaran S, Sharifi S. Liposome-based drug co-delivery systems in cancer cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;71:1327–41.
  77. Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:975–99.
  78. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour

- Y, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett.* 2013;8(1):1–8.
79. Milcovich G, Lettieri S, Antunes FE, Medronho B, Fonseca AC, Coelho JFJ, et al. Recent advances in smart biotechnology: hydrogels and nanocarriers for tailored bioactive molecules depot. *Adv Colloid Interface Sci.* 2017;249:163–80.
  80. Madni A, Sarfraz M, Rehman M, Ahmad M, Akhtar N, Ahmad S. Liposomal drug delivery : a versatile platform for challenging clinical applications. *J Pharm Pharm Sci.* 2014;17(3):401–26.
  81. Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(1):36–48.
  82. Nii T, Ishii F. Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method. *Int J Pharm.* 2005;298(1):198–205.
  83. Eloy JO, Claro de Souza M, Petrilli R, Barcellos JPA, Lee RJ, Marchetti JM. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: strategies to enhance encapsulation and delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2014;123:345–63.
  84. Balazs DA, Godbey W. Liposomes for use in gene delivery. *J Drug Deliv.* 2011;2011:1–12.
  85. Conceição AI, Matos CM, Moutinho CG. Encapsulação de dois fármacos anticancerígenos (5-fluorouracilo e metotrexato ) em lipossomas unilamelares. *Rev da Fac Ciências da Saúde.* 2009;6:50–9.
  86. Khodabandehloo H, Zahednasab H, Ashrafi Hafez A. Nanocarriers usage for drug delivery in cancer therapy. *Iran J cancer Prev.* 2016;9(2):e3966.
  87. Wang M, Thanou M. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacol Res.* 2010;62(2):90–9.
  88. Tamjidi F, Shahedi M, Varshosaz J, Nasirpour A. Nanostructured lipid carriers (NLC): a potential delivery system for bioactive food molecules. Vol. 19, *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* Elsevier Inc.; 2013. p. 29-43.
  89. Naseri N, Valizadeh H, Zakeri-Milani P. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: structure preparation and application. *Adv Pharm Bull.* 2015;5(3):305–13.
  90. Suffredini G, East JE, Levy LM. New applications of nanotechnology for neuroimaging. Vol. 35, *American Journal of Neuroradiology.* 2014. p. 1246–53.
  91. Ghassemi M, Shahidian A. Nanosystem application in drug delivery. *Nano Bio Heat Transf Fluid Flow.* 2017;113–39.
  92. Crucho CIC, Barros MT. Polymeric nanoparticles: a study on the preparation variables and characterization methods. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;80:771–84.
  93. Kumari P, Ghosh B, Biswas S. Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. *J Drug Target.* 2016;24(3):179–91.
  94. Lee H-Y, Mohammed KA, Nasreen N. Nanoparticle-based targeted gene therapy for lung cancer. *Am J Cancer Res.* 2016;6(5):1118–34.
  95. Sun T, Zhang YS, Pang B, Hyun DC, Yang M, Xia Y. Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014;53(46):12320–64.
  96. FRS A-R, Zaman K. Topic in anti-cancer research. *Bentham Science Publishers;* 2015. p. 541-542.
  97. Landesman-Milo D, Ramishetti S, Peer D. Nanomedicine as an emerging platform for metastatic lung cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2015;34(2):291–301.
  98. Parhi P, Mohanty C, Sahoo SK. Nanotechnology-based combinational drug

- delivery: an emerging approach for cancer therapy. *Drug Discov Today*. 2012;17(17–18):1044–52.
99. Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. *J Control Release*. 2015;200:138–57.
  100. Zarbin AJG. Química de (nano)materiais. *Quim Nova*. 2007;30(6):1469–79.
  101. Li C, Li L, Keates AC. Targeting cancer gene therapy with magnetic nanoparticles. *Oncotarget*. 2012;3(4):365–70.
  102. Cho K, Wang X, Nie S, Chen Z, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(5):1310–6.
  103. Koudelka KJ, Pitek AS, Manchester M, Steinmetz NF. Virus-based nanoparticles as versatile nanomachines. *Annu Rev Virol*. 2015;2(1):379–401.
  104. Steinmetz NF. Viral nanoparticles as platforms for next-generation therapeutics and imaging devices. *Nanomedicine*. 2010;6(5):634–41.
  105. Vieira DB, Gamarra LF. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. *Einstein (São Paulo)*. 2016;14(1):99–103.
  106. Zhang X-Q, Xu X, Bertrand N, Pridgen E, Swamia A, Farokhzad OC. Interactions of nanomaterials and biological systems: implications to personalized nanomedicine. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(13):1363–84.
  107. Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm*. 2008;5(4):505–15.
  108. Cheng CJ, Tietjen GT, Saucier-Sawyer JK, Saltzman WM. A holistic approach to targeting disease with polymeric nanoparticles. *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14(4):239–47.
  109. Taurin S, Nehoff H, Greish K. Anticancer nanomedicine and tumor vascular permeability; where is the missing link?. *J Control Release*. 2012;164(3):265–75.
  110. Boisseau P, Loubaton B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. Elsevier Inc. 2011. p. 2–28.
  111. Iyer AK, Singh A, Ganta S, Amiji MM. Role of integrated cancer nanomedicine in overcoming drug resistance. Vol. 65, *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier Inc; 2013. p. 1784-802.
  112. Magadala P, Vlerken LE Van, Shahiwala A, Amiji MM. Multifunctional polymeric nanosystems for tumor-targeted delivery. 2008;33–67.
  113. Malarvizhi GL, Retnakumari AP, Nair S, Koyakutty M. Transferrin targeted core-shell nanomedicine for combinatorial delivery of doxorubicin and sorafenib against hepatocellular carcinoma. *Nanomedicine*. 2014;10(8):1649–59.
  114. Karra N, Benita S. The ligand nanoparticle conjugation approach for targeted cancer therapy. *Curr Drug Metab*. 2012;13(1):22–41.
  115. Abd Ellah NH, Abouelmagd SA. Surface functionalization of polymeric nanoparticles for tumor drug delivery: approaches and challenges. *Expert Opin Drug Deliv*. 2017;14(2):201–14.
  116. Omlor JA, Nguyen J, Bals R, Dinh QT. Nanotechnology in respiratory medicine. *Respir Res*. 2015;16(1):1–9.
  117. Mansour HM, Bawa R. Design and development of approved nanopharmaceutical products. In: Bawa R, Audette G, Rubinstein I, editors. *Handbook of Clinic Nanomedicine: From Bench to Bedside*. 1st edition. Singapore: Pan Stanford Publishing; 2015. p. 1–33.
  118. Shargel S, Wu-Pong AY. *Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics*. 7th edition. McGraw-Hil. New York; 2016.
  119. Ritschel WA, Kearns GL. *Handbook of Basic Pharmacokinetics – Including*

- Clinical Applications. 7th edition. Washington DC: Association, American Pharmaceutical; 2009.
120. Kadam RS, Bourne DWA, Kompella UB. Nano-advantage in enhanced drug delivery with biodegradable nanoparticles: contribution of reduced clearance. *Drug Metab Dispos.* 2012;40(7):1380–8.
  121. Stoner KL, Harder H, Fallowfield LJ, Jenkins VA. Intravenous versus subcutaneous drug administration: which do patients prefer? A systematic review. *Patient.* 2015;8(2):145–53.
  122. Wei Y, Zhao L. Passive lung-targeted drug delivery systems via intravenous administration. *Pharm Dev Technol.* 2014;19(2):129–36.
  123. Moreno-Sastre M, Pastor M, Salomon CJ, Esquisabel A, Pedraz JL. Pulmonary drug delivery: a review on nanocarriers for antibacterial chemotherapy. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(11):2945–55.
  124. Mijailovich SM, Kojic M, Tsuda A. Particle-induced indentation of the alveolar epithelium caused by surface tension forces. *J Appl Physiol.* 2010;109(4):1179–94.
  125. Vassie JA, Whitelock JM, Lord MS. Targeted delivery and redox activity of folic acid-functionalized nanoceria in tumor cells. *Mol Pharm.* 2018;1–31.
  126. In GK, Nieva J. Emerging chemotherapy agents in lung cancer: nanoparticles therapeutics for non-small cell lung cancer. *Transl Cancer Res.* 2015;4(4):340–55.
  127. Zhao P, Astruc D. Docetaxel nanotechnology in anticancer therapy. *Chem Med Chem.* 2012;7(6):952–72.
  128. Deshpande PP, Biswas S, Torchilin VP. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. *Nanomedicine (Lond).* 2013;8(9):1–32.
  129. Al-manasir N, Fanaian S, Zhu K, Nyström B, Karlsson G, Kjøniksen A. Effects of temperature and pH on the contraction and aggregation of microgels in aqueous suspensions. *J Phys Chem B.* 2009;113(32):11115–23.
  130. Venditto VJ, Szoka FC Jr. Cancer nanomedicines: so many papers and so few drugs!. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014;65(1):80–8.
  131. Machado LC, Gnoatto SA, Lúcia M, Klüppel W. Liposomes applied in pharmacology: a review. *Estud Biol.* 2007;29(67):215–24.
  132. Bailly C. Contemporary challenges in the design of topoisomerase II inhibitors for cancer chemotherapy. *Chem Rev.* 2012;112(7):3611–40.
  133. Biswas S, Deshpande PP, Perche F, Dodwadkar NS, Sane SD, Torchilin VP. Octa-arginine-modified pegylated liposomal doxorubicin: an effective treatment strategy for non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 2013;335(1):191–200.
  134. Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology.* 2010;115(2):155–62.
  135. Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J Cancer Res Ther.* 2014;10(4):853–8.
  136. Numico G, Castiglione F, Granetto C, Garrone O, Mariani G, Costanzo GD, et al. Single-agent pegylated liposomal doxorubicin (Caelix) in chemotherapy pretreated non-small cell lung cancer patients: a pilot trial. *Lung Cancer.* 2002;35:59–64.
  137. Tsoutsou PG, Froudarakis ME, Bouros D, Koukourakis MI. Hypofractionated/accelerated radiotherapy with cytoprotection (HypoARC) combined with vinorelbine and liposomal doxorubicin for locally advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *Anticancer Res.* 2008;28(2B):1349–54.
  138. Patlakas G, Bouros D, Tsantekidou-Pozova S, Koukourakis MI. Triplet chemotherapy with docetaxel, gemcitabine and liposomal doxorubicin, supported with subcutaneous amifostine and hemopoietic growth factors, in advanced non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2005;25(2B):1427–31.

139. Cheng L, Huang F-Z, Cheng L-F, Zhu Y-Q, Hu Q, Li L, et al. GE11-modified liposomes for non-small cell lung cancer targeting: preparation, ex vitro and in vivo evaluation. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:921–35.
140. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2015;740:364–78.
141. Gabriel GH, Nepomuceno LL, Pimenta V de SC, de Araújo EG. Agentes antineoplásicos para o tratamento do osteossarcoma. *Cent Cient Conhecer- Goiânia*. 2017;14(26):152–66.
142. Astolfi L, Ghiselli S, Guaran V, Chicca M, Simoni E, Olivetto E, et al. Correlation of adverse effects of cisplatin administration in patients affected by solid tumours: a retrospective evaluation. *Oncol Rep*. 2013;29(4):1285–92.
143. Boulikas T, Stathopoulos GP, Volakakis N, Vougiouka M. Systemic lipoplatin infusion results in preferential tumor uptake in human studies. *Anticancer Res*. 2005;25(4):3031–40.
144. Stathopoulos GP, Boulikas T. Lipoplatin formulation: review article. *J Drug Deliv*. 2012;2012:1–10.
145. Froudarakis ME, Pataka A, Pappas P, Anevlavis S, Argiana E, Nikolaidou M, et al. Phase I trial of lipoplatin and gemcitabine as a second-line chemotherapy in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 2008;113(10):2752–60.
146. Mylonakis N, Athanasiou A, Ziras N, Angel J, Rapti A, Lampaki S, et al. Phase II study of liposomal cisplatin (Lipoplatin™) plus gemcitabine versus cisplatin plus gemcitabine as first line treatment in inoperable (stage IIIB/IV) non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2010;68(2):240–7.
147. Stathopoulos GP, Antoniou D, Dimitroulis J, Michalopoulou P, Bastas A, Marosis K, et al. Liposomal cisplatin combined with paclitaxel versus cisplatin and paclitaxel in non-small-cell lung cancer: a randomized phase III multicenter trial. *Ann Oncol*. 2010;21(11):2227–32.
148. Boulikas T. Clinical overview on Lipoplatin™ : a successful liposomal formulation of cisplatin. *Expert Opin Investig Drugs*. 2009;18(8):1197–218.
149. Stathopoulos GP, Stathopoulos J, Dimitroulis J. Two consecutive days of treatment with liposomal cisplatin in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*. 2012;4(5):1013–6.
150. White SC, Lorigan P, Margison GP, Margison JM, Martin F, Thatcher N, et al. Phase II study of SPI-77 (sterically stabilised liposomal cisplatin) in advanced non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2006;95(7):822–8.
151. Liu D, He C, Wang AZ, Lin W. Application of liposomal technologies for delivery of platinum analogs in oncology. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:3309–19.
152. Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. Liposomal formulations in clinical use: an updated review. *Pharmaceutics*. 2017;9(2):1–33.
153. Weaver BA. How taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell*. 2014;25(18):2677–81.
154. Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde IP. Paclitaxel - resumo das características do medicamento [Internet]. 2012 [Acedido a 6 de junho de 2018]. Disponível em: [http://app7.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=42486&tipo\\_doc=rcm](http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=42486&tipo_doc=rcm)
155. Luo C, Wang Y, Chen Q, Han X, Liu X, Sun J, et al. Advances of paclitaxel formulations based on nanosystem delivery technology. *Mini Rev Med Chem*. 2012;12(5):434–44.
156. Wang HY, Zhang XR. Comparison of efficacy and safety between liposome-paclitaxel injection plus carboplatin and paclitaxel plus carboplatin as first line

- treatment in advanced non-small cell lung cancer. *Acta Acad Med Sin.* 2014;36(3):305–8.
157. Hu X, Lin L, Xing P, Zhang C, Wang L, Li Y. The clinical efficacy and safety of paclitaxel liposome on the patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *J Thorac Oncol.* 2017;12(1):902.
  158. Wang X, Zhou J, Wang Y, Zhu Z, Lu Y, Wei Y, et al. A phase I clinical and pharmacokinetic study of paclitaxel liposome infused in non-small cell lung cancer patients with malignant pleural effusions. *Eur J Cancer.* 2010;46(8):1474–80.
  159. Ju RJ, Cheng L, Xiao Y, Wang X, Li CQ, Peng XM, et al. PTD modified paclitaxel anti-resistant liposomes for treatment of drug-resistant non-small cell lung cancer. *J Liposome Res.* 2018;28(3):236–48.
  160. Wang J, Zhang L, Wang L, Liu Z, Yu Y. Metabolism and excretion of novel pulmonary-targeting docetaxel liposome in rabbits. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2017;21(1):45–54.
  161. Ho MY, Mackey JR. Presentation and management of docetaxel-related adverse effects in patients with breast cancer. *Cancer Manag Res.* 2014;6(1):253–9.
  162. Fitch RM, Wible JH, Blackledge JA, McGhee WD. Biodistribution of liposomal docetaxel prodrug MNK-010 in mice bearing A549 human NSCLC xenografts. *Cancer Res.* 2015;75(15 Suppl).
  163. Mahalingam D, Nemunaitis JJ, Malik L, Sarantopoulos J, Weitman S, Sankhala K, et al. Phase I study of intravenously administered ATI-1123, a liposomal docetaxel formulation in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014;74(6):1241–50.
  164. Grumezescu AM. Multifunctional systems for combined delivery, biosensing and diagnostics. 5th edition. Romania: Elsevier Inc.; 2017. p. 57.
  165. Ma J, Zhuang H, Zhuang Z, Lu Y, Xia R, Gan L, et al. Development of docetaxel liposome surface modified with CD133 aptamers for lung cancer targeting. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2017;1–8.
  166. Butts C, Socinski MA, Mitchell PL, Thatcher N, Havel L, Krzakowski M, et al. Tecemotide (L-BLP25) versus placebo after chemoradiotherapy for stage III non-small-cell lung cancer (START): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(1):59–68.
  167. Sangha R, Butts C. L-BLP25: a peptide vaccine strategy in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(15 Pt 2):s4652–4.
  168. Xia W, Wang J, Xu Y, Jiang F, Xu L. L-BLP25 as a peptide vaccine therapy in non-small cell lung cancer: a review. *J Thorac Dis.* 2014;6(10):1513–20.
  169. Palmer M, Parker J, Modi S, Butts C, Smylie M, Meikle A, et al. Phase I study of the BLP25 (MUC1 peptide) liposomal vaccine for active specific immunotherapy in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2001;3(1):49–57.
  170. Butts C, Maksymiuk A, Goss G, Soulieres D, Marshall E, Cormier Y, et al. A multi-centre phase IIB randomized controlled study of BLP25 liposome vaccine (L-BLP25 or Stimuvax) for active specific immunotherapy of non-small cell lung cancer (NSCLC): updated survival analysis. *J Thorac Oncol.* 2007;2:332–3.
  171. Rimkus T, Sirkisoon S, Harrison A, Lo HW. Tumor suppressor candidate 2 (TUSC2, FUS-1) and human cancers. *Discov Med.* 2017;23(128):325–30.
  172. Ji L, Roth JA. Tumor suppressor FUS1 signaling pathway. *J Thorac Oncol.* 2008;3(4):327–30.
  173. Ito I, Ji L, Tanaka F, Saito Y, Gopalan B, Branch CD, et al. Liposomal vector mediated delivery of the 3p FUS1 gene demonstrates potent antitumor activity against human lung cancer in vivo. *Cancer Gene Ther.* 2004;11(11):733–9.

174. Lu C, Stewart DJ, Lee JJ, Ji L, Ramesh R, Jayachandran G, et al. Phase I clinical trial of systemically administered TUSC2 (FUS1)-nanoparticles mediating functional gene transfer in humans. *PLoS One*. 2012;7(4):e34833.
175. Lu C. Phase I/II clinical trial combining FUS1-nanoparticles and erlotinib in stage IV lung cancer [Internet]. U. S. National Library of Medicine. 2017 [Acedido a 23 de junho de 2018]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01455389>
176. Grace VM, Viswanathan S. Pharmacokinetics and therapeutic efficiency of a novel cationic liposome nano-formulated all trans retinoic acid in lung cancer mice model. Vol. 39, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. Elsevier Inc.; 2017. p. 223-236.
177. Waheed A, Gupta A, Patel P. Targeted drug delivery systems for lung cancer. *PharmaTutor Mag*. 2015;3(2):3462–82.
178. Hu Y-J, Zen F, Ju R-J, Lu W-L. Advances in liposomal drug delivery system in the field of chemotherapy. *Clin Oncol*. 2016;1(1092):1–10.