

Paulo Miguel Ferreira de Carvalho

Nanossistemas multifuncionais no tratamento do cancro



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2019

Paulo Miguel Ferreira de Carvalho

Nanossistemas multifuncionais no tratamento do cancro



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2019

Nanossistemas multifuncionais no tratamento do cancro

Paulo Miguel Ferreira de Carvalho

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob orientação da Professora Doutora Carla Martins Lopes.

Resumo

O cancro continua a ser uma das principais causas de morte no mundo. Apesar dos avanços tecnológicos a nível de diagnóstico, o tratamento oncológico revela-se ainda uma das questões mais desafiadoras na área da saúde. As estratégias clássicas para o tratamento do cancro incluem intervenção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia, terapia combinada e terapia a laser. Contudo, estas opções apresentam algumas limitações, tais como a falta de especificidade ou falta de eficácia para atingir os tecidos cancerígenos. Com o intuito de ultrapassar estas limitações, várias equipas têm investigado a versatilidade dos nanossistemas, nomeadamente o desenvolvimento de nanossistemas multifuncionais. Com o recurso a esta estratégia é possível associar as vantagens inerentes aos diferentes nanossistemas com múltiplos benefícios, como por exemplo, a coadministração de fármacos ou de compostos bioativos com efeito terapêutico sinérgico; o direcionamento/vectorização ativa para alvos específicos; a ativação de nanossistemas por diferentes estímulos; e a aplicação de estratégias terapêuticas hifenizadas.

A presente dissertação tem como objetivo apresentar uma revisão do estado da arte das múltiplas estratégias usadas no desenvolvimento de nanossistemas multifuncionais com o intuito de ultrapassar as limitações associadas às estratégias convencionais utilizadas no tratamento do cancro.

Palavras-chave: Coadministração; Composição híbrida; Estratégias de direcionamento/vectorização; Nanossistemas ativados por estímulos; Estratégias terapêuticas hifenizadas

Abstract

Cancer remains one of the leading causes of death in the world. Despite technological advances in diagnosis, cancer treatment is still one of the most challenging health issues. Classic strategies for cancer treatment include surgical intervention, radiotherapy, chemotherapy, combination therapy and laser therapy. However, these options have some limitations, such as lack of specificity or ineffectiveness in reaching cancerous tissues. In order to overcome these limitations, several teams have investigated the versatility of nanosystems, namely the development of multifunctional nanosystems. Using this strategy, it is possible to combine the advantages inherent in different nanosystems with multiple benefits, such as the co-delivery of drugs or bioactive compounds with synergistic therapeutic effect; active targeting/vectoring for specific targets; activation of nanosystems by different stimuli; and the application of hyphenated therapeutic strategies.

The present dissertation aims to present a review of the state of the art of the multiple strategies used in the development of multifunctional nanosystems in order to overcome the limitations associated with the conventional strategies used in cancer treatment.

Key words: Co-delivery; Hybrid composition; Targeting/vectoring strategies; Stimulus activated nanosystems; Hyphenated Therapeutic Strategies

Agradecimentos

A presente dissertação é resultado do meu trabalho e dedicação, contudo endereço um agradecimento especial a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização da mesma.

Em primeiro lugar agradeço à Professora Doutora Carla Martins Lopes, pela disponibilidade, orientação, competência científica e acompanhamento contínuo na elaboração da presente dissertação.

Aos meus pais Ana e Manuel, ao meu irmão Carlos e à minha avó Gracinda por todo o esforço ao longo destes quatro anos, por toda a confiança que depositaram em mim e pelo apoio que sempre mostraram nos momentos mais difíceis.

Um agradecimento especial à minha namorada Estefânia, pela força, paciência, compreensão e apoio durante todo o curso.

Aos meus amigos e colegas da Universidade Fernando Pessoa, que me apoiaram e acreditavam em mim.

Um bem haja a todos.

Índice

I. Introdução	1
II. Nanossistemas	3
II.1. Nanossistemas lipídicos	6
II.2. Nanossistemas poliméricos	8
II.3. Nanossistemas inorgânicos	10
II.3.i. Nanopartículas metálicas	10
II.3.ii. Outras nanopartículas inorgânicas	11
II.3.iii. Pontos quânticos.....	12
II.3.iv. Fullerenos e Nanotubos de carbono.....	12
III. Nanossistemas multifuncionais.....	14
III.1. Coadministração.....	14
III.2. Nanossistemas híbridos	21
III.3. Estratégias de direcionamento/vectorização	26
III.3.i. Direcionamento passivo	26
III.3.ii. Direcionamento ativo	28
III.3.ii.1. Recetores de superfície celular	28
III.3.ii.2. Microambiente cancerígeno.....	32
III.3.ii.3 Metástases.....	34
III.3.ii.4. Direcionamento específico para a mitocôndria	36
III.4. Nanossistemas ativados por estímulos	38
III.4.i. Estímulo ativado pela luz ou radiação.....	38
III.4.ii. Estímulo ativado pelo aumento de temperatura.....	39
III.4.iii. Estímulo ativado pelo pH.....	42
III.4.iv. Estímulo ativado pelas condições redox.....	43
III.4.v. Estímulos ativado por ultrassons.....	45
IV. Estratégias terapêuticas hifenizadas.....	49

IV.1. Agente quimioterápico e fototerapia.....	49
IV.2. Terapia génica e agente quimioterápico.....	51
IV.3. Teranóstico	52
V. Conclusão	55
VI. Referências	57

Índice de Figuras

Figura 1: Nanossistemas usados na veiculação de fármacos	5
Figura 2: Estrutura de um lipossoma	6
Figura 3: Nanopartículas de lípidos sólidos; Vetores lipídicos nanoestruturados	7
Figura 4: Nanocápsula e Nanoesfera	8
Figura 5: Dendrímero.....	9
Figura 6: Micela.....	10
Figura 7: Nanopartícula de Fe ₃ O ₄	11
Figura 8: NPs de sílica em forma de disco.....	12
Figura 9: Fullerenos e Nanotubos.....	13
Figura 10: SLN CUR/PTX conjugado com folato	18
Figura 11: Internalização do SLN CUR / PTX conjugado com folato em célula MCF - 7 / ADR	19
Figura 12: NP de sílica mesoporosa revestida com DSPC e conjugada com RGD	22
Figura 13: NP híbrida polímero / lípido contendo ISL - iRGD.....	24
Figura 14: Mecanismo de transcitose ativado por iRGD dos nanossistemas em células cancerígenas	25
Figura 15: Efeito de permeabilidade e retenção aumentada	27
Figura 16: Direcionamento ativo de NPs.....	29
Figura 17: Mecanismo internalização por endocitose do nanossistema	31
Figura 18: Vasculatura normal e vasculatura cancerígena.....	32
Figura 19: NP PLGA - DOX - PHC - manose	35
Figura 20: Direcionamento específico das NPs para a mitocôndria.....	36
Figura 21: Mecanismo de libertação do oligonucleótidos antisense e inibição do mRNA	39
Figura 22: Lipossoma incorporando Ca ₂ CO ₃ e CUR	42
Figura 23: Lipossoma - DOX - ss – LMWH.....	44
Figura 24: Internalização do lipossoma na célula por endocitose e inibição da metastização	44
Figura 25: Peso médio dos pulmões dos ratinhos tratados com DOX, Dox lipossomal e lipossoma - DOX - ss – LMWH.....	45
Figura 26: Lipossoma incorporando DOX e porfirina.....	46
Figura 27: Libertação da DOX por ação de ultrassons	46

Figura 28: Libertação da DOX por ação dos ultrassons e NaHCO_3	48
Figura 29: Nanossistema de óxido de grafeno carregado com DOX, irinotecano e poloxâmero 188	50
Figura 30: Micela polimérica incorporando DOX e siRNA	51
Figura 31: Lipossoma incorporando topotecano e QDs	54

Índice de Tabelas

Tabela 1: Exemplo de medicamentos contendo nanossistemas comercializados utilizados no tratamento do cancro 4

Tabela 2: Massa cancerígena dos ratinhos após tratamento com As_2O_3 (n = 6) 23

Abreviaturas

5 - FU: 5 - Fluorouracilo (do inglês, *5 - Fluorouracil*)

As₂O₃: Trióxido de arsénio (do inglês, *Arsenic trioxide*)

Ca₅(PO₄)₃(OH): Hidroxiapatite (do inglês, *Hydroxyapatite*)

CendR: *C-terminal Rule*

CUR: Curcumina

DAFODIL: *Doxorubicin and 5 - Flurouracil optimally delivered in a liposome*

DNA: Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic acid*)

DOX: Doxorubicina (do inglês, *Doxorubicin*)

DSPC: Diestearoil fosfatidilcolina (do inglês *Distearoyl phosphatidylcholine*)

DSPE - PEG₂₀₀₀ - Mal: 1, 2 - distearoil - sn - glicero - 3 - fosfoetanolamina - N - [maleimida (polietilenoglicol 2000)] (do inglês, *1, 2 - distearoyl - sn - glycerol - 3 - phosphoethanolamine - N - [maleimide (polyethylene glycol 2000)]*)

DSPE - PEG₂₀₀₀: 1, 2 - distearoil - sn - glicero - 3 - fosfoetanolamina - N - [amino (polietilenoglicol 2000)] (do inglês, *1, 2 - distearoyl - sn - glycerol - 3 - phosphoethanolamine - N - [amino (polyethylene glycol 2000)]*)

DTX: Docetaxel

EGFR: Recetor de fator de crescimento epitelial (do inglês, *Epidermal growth factor receptor*)

EPR: Permeabilidade e retenção aumentada (do inglês, *Enhanced permeability and retention*)

FDA: *Food and Drug Administration*

Fe₃O₄: Magnetite

GSH: Glutathione (do inglês, *Glutathione*)

HER - 2: Recetor - 2 do fator de crescimento epidérmico humano (do inglês, *Human epidermal growth factor receptor - type 2*)

HPCD: 2 - hidroxipropil - β - ciclodextrina (do inglês, *2 - hydroxypropyl - β - cyclodextrin*)

IARC: *International Agency for Research on Cancer*

ISL: Isoliquiritigenina (do inglês, *Isoliquiritigenin*)

LMWH: Heparina de baixo peso molecular (do inglês, *Low molecular weight heparin*)

MMC: Mitomicina C (do inglês, *Mitomycin - C*)

mNPs: Nanopartículas magnéticas (do inglês, *Magnetic nanoparticles*)

MPS: Sistema fagocitário mononuclear (do inglês, *Mononuclear phagocytic system*)

mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês, *Messenger ribonucleic acid*)

NF - κ B: Fator de transcrição nuclear kappa B (do inglês *Factor nuclear kappa B*)

NLC: Vetores lipídicos nanoestruturados (do inglês, *Nanostructured lipid carriers*)

NPs: Nanopartículas

NSC: N - succinilquitosano (do inglês, *N - succinyl chitosan*)

P - gp: Glicoproteína P

PACAP: Peptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária (do inglês, *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*)

PEG: Polietilenoglicol (do inglês, *Polyethylene glycol*)

PHC: Polietilenoglicol - hidrazona - C18 (do inglês, *Polyethylene glycol - hydrazone - C18*)

PLA: Ácido poliláctico (do inglês, *Polylactic acid*),

PLGA: Poli (ácido láctico - co - glicólico) (do inglês, *Poly (lactic - co - glycolic acid)*)

PTX: Paclitaxel

QDs: Pontos quânticos (do inglês, *Quantum dots*)

RGD: Tripéptido de arginina, glicina e asparagina (do inglês, *Arginine - glycine - aspartic tripeptide*)

ROS: Espécies reativas de oxigénio (do inglês, *Reactive oxygen species*)

siRNA: RNA de interferência (do inglês, *Small interfering RNA*)

SLN: Nanopartículas de lípidos sólidos (do inglês, *Solid lipid nanoparticles*)

STAT - 3: Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (do inglês, *Signal transducers and activators of transcription - 3*)

TAMs: Macrófagos associados ao cancro (do inglês, *Tumor associated macrophages*)

TNF - α : Fator de necrose tumoral α (do inglês, *Tumor necrosis factor α*)

TPGS: Succinato de D - α - tocoferil polietilenoglicol 1000 (do inglês, *D - α - tocopheryl polyethylene glycol succinate*)

TPGS₁₀₀₀ - TPP: Succinato trifenílfosfina de D - α - tocoferil polietilenoglicol (do inglês, *D - α - tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate triphenylphosphine*)

VCAM - 1: Molécula de adesão celular vascular 1 (do inglês, *Vascular cell adhesion molecule - 1*)

VEGF: Fator de crescimento vascular endotelial (do inglês, *Vascular endothelial growth factor*)

I. Introdução

Nas últimas décadas verificaram-se avanços ao nível da biotecnologia e da genómica humana que contribuíram, não só, para uma melhor compreensão da patogénese associada ao cancro, como também, para o desenvolvimento de marcadores específicos e estratégias terapêuticas direcionadas para os tecidos cancerígenos (Siegel *et al.*, 2012). Apesar destes avanços, atualmente, o cancro é uma das doenças mais letais no mundo. Em 2018, com base nas estimativas GLOBOCAN 2018, a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) estimou cerca de 18,1 milhões de novos casos de cancros em todo o mundo (Ferlay *et al.*, 2019). Para 2030, na União Europeia, estima-se que o número de mortes associado a processos cancerígenos atinga os 21 milhões (Roy Chowdhury *et al.*, 2016).

Na literatura estão reportadas várias opções de tratamento oncológico, incluindo a intervenção cirúrgica, a quimioterapia, a radioterapia, a terapia fotodinâmica, a terapia fototérmica e a terapia combinada (Zhou *et al.*, 2015). Contudo, a falta de especificidade para atuar nas células alvo (i.e. nas células cancerígenas) representa a maior limitação destas estratégias clássicas, podendo induzir toxicidade não só nas células cancerígenas, como também em células saudáveis. Apesar da quimioterapia ser o tratamento de primeira linha para diversos tipos de cancro, estima-se que a resistência a este tratamento em doentes que apresentam cancro com metástases aproxima-se dos 90% (Longley and Johnston, 2005). A solubilidade aquosa limitada dos agentes quimioterápicos, os efeitos secundários indesejáveis e o desenvolvimento de resistência por parte de células cancerígenas a múltiplos fármacos antineoplásicos são as principais razões que contribuem para o insucesso clínico da quimioterapia (Tefas *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017; Shapira *et al.*, 2011). Perante a eficácia limitada das terapêuticas existentes, o recurso à nanotecnologia tem sido bastante explorado para o desenvolvimento e a implementação de sistemas terapêuticos alternativos (Tran *et al.*, 2015).

Segundo a literatura, a aplicação dos nanossistemas no tratamento do cancro apresenta diversas vantagens, tais como (Kang *et al.*, 2018; Tefas *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017): (i) possibilidade de direcionamento/vectorização dos agentes quimioterápicos para tecidos específicos; (ii) podem ser constituídos por compostos de diferente natureza (e.g. material inorgânico, lipídico e/ou polimérico); (iii) conter componentes sensíveis a diversos estímulos externos (e.g. radiação, campo magnético e ultrassons) e/ou alterações

do ambiente interno (e.g. pH, diferença de potencial redox); (iv) suscetíveis de encapsular compostos com propriedades físico-químicas incompatíveis, melhorando a biodisponibilidade, solubilidade e estabilidade; (v) evitar a rápida eliminação do agente quimioterápico do organismo; (vi) suprimir mecanismos de resistência; e (vii) aumentar a acumulação dos compostos ativos nas células cancerígenas em virtude do efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR, do inglês *Enhanced permeability and retention*) dos cancros sólidos devido à vasculatura e fenestração do endotélio dos tecidos cancerígenos.

O recurso aos nanossistemas multifuncionais torna possível incorporar num único sistema de veiculação ações sinérgicas, como por exemplo, terapias combinadas de fármacos e/ou compostos bioativos, terapias combinadas de agentes quimioterápicos com estratégias de direcionamento/vectorização, ou ainda, combinar terapias hifenizadas. Estes nanossistemas permitem modular a libertação dos compostos antineoplásicos para locais alvo, aumentando a eficácia terapêutica e diminuindo os efeitos secundários. Além disso, os nanossistemas multifuncionais têm apresentado resultados bastante promissores na redução das múltiplas resistências desenvolvidas pelas células cancerígenas aos compostos anticancerígenos (Tran *et al.*, 2015; Deshpande *et al.*, 2013).

O principal objetivo da presente dissertação é apresentar os diversos nanossistemas multifuncionais reportados na literatura para o tratamento do cancro, efetuando uma revisão do estado da arte das múltiplas estratégias.

A motivação para abordar esta temática surgiu do interesse pessoal para aprofundar os conhecimentos relativos às alternativas terapêuticas de uma doença que tem vindo a atormentar milhares de doentes ao longo dos anos e que põe fim à vida de muitos deles. Os adultos deixam para trás uma vida inteira de lutas e conquistas, e as crianças perdem a oportunidade de desfrutar a sua vida enquanto mortais.

Para a elaboração desta dissertação foram consultados e analisados os artigos científicos mais relevantes pesquisados em diversas bases de dados, tais como *PubMed*, *ScienceDirect*, *Springer*, *Google Scholar*, *Dove Medical Press*. As palavras-chave usadas durante a pesquisa foram: *Co-delivery system for cancer treatment*, *Hybrid composition for cancer treatment*, *Active targeting for cancer treatment*, *Triggering strategies for cancer treatment*, *Hyphenated therapeutic strategies for cancer treatment*.

II. Nanossistemas

Ao nível oncológico, a quimioterapia é a estratégia terapêutica mais utilizada. Geralmente, o tratamento oncológico pressupõe a administração de um ou mais fármacos antineoplásicos. Numa situação ideal, o fármaco deve atingir o local de ação e exercer o efeito farmacológico pretendido, dentro da respetiva janela terapêutica. Num contexto real, ao nível fisiológico, este processo nem sempre é fácil e apresenta algumas limitações que comprometem a eficácia terapêutica, nomeadamente, a dificuldade do fármaco para permear as membranas biológicas e o facto de este estar sujeito a processos de metabolização/degradação antecipados e, conseqüentemente, poder ser eliminado antes de alcançar o local alvo. Desta forma, nestas circunstâncias torna-se necessário a administração de doses mais elevadas e/ou com mais frequência para atingir o efeito terapêutico pretendido. Além disso, os efeitos secundários que surgem após a administração do fármaco antineoplásico, decorrentes da distribuição do mesmo por todos os tecidos do organismo, são responsáveis pela diminuição da qualidade de vida do doente (Vilar *et al.*, 2012). Outra limitação relaciona-se com o facto de alguns dos agentes antineoplásicos, por apresentarem solubilidade aquosa limitada, necessitam de ser manipulados com solventes especiais, que, por si só, podem ser tóxicos (Friberg and Nystrom, 2015).

Com o intuito de ultrapassar as desvantagens e/ou limitações associadas à quimioterapia, alguns investigadores têm proposto o desenvolvimento de nanossistemas para a veiculação dos compostos, com o objetivo de (Vilar *et al.*, 2012; Saraiva *et al.*, 2011): (i) melhorar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas; (ii) ultrapassar as limitações de solubilidade aquosa e de estabilidade; (iii) aumentar o tempo de circulação sistémica; (iv) diminuir os efeitos secundários; (v) reduzir as múltiplas resistências aos fármacos antineoplásicos.

No mercado existem diversos produtos contendo nanossistemas aprovados para o tratamento do cancro, sendo alguns deles apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Exemplo de medicamentos contendo nanossistemas comercializados utilizados no tratamento do cancro (adaptado Thakor and Gambhir (2013)).

Nome comercial	Fármaco antineoplásico / Nanossistema	Indicação terapêutica aprovada
Caelyx[®] (Europa) Doxil[®] (EUA)	Doxorrubicina (DOX, do inglês, <i>Doxorubicin</i>) / lipossoma	Sarcoma de Kaposi, cancro da mama metastático e cancro do ovário
DaunoXome[®]	Daunorrubicina / lipossoma	Sarcoma de Kaposi
Myocet[®]	DOX / lipossoma	Cancro da mama metastático
Abraxane[®]	Paclitaxel (PTX) / Nanopartículas de albumina	Cancro da mama metastático
DepoCyt[®]	Citarabina / lipossoma	Meningite linfomatosa
Marqibo[®]	Sulfato de vincristina / lipossoma	Leucemia linfoblástica aguda
Genexol - PM[®]	PTX / Nanopartículas poliméricas metoxi- polietilenoglicol (PEG, do inglês <i>Polyethylene glycol</i>) de poli (D, L- láctico)	Cancro de mama metastático

De acordo com o tipo de material e o método de produção, os nanossistemas podem apresentar tamanho, forma e propriedades distintas (Figura 1).

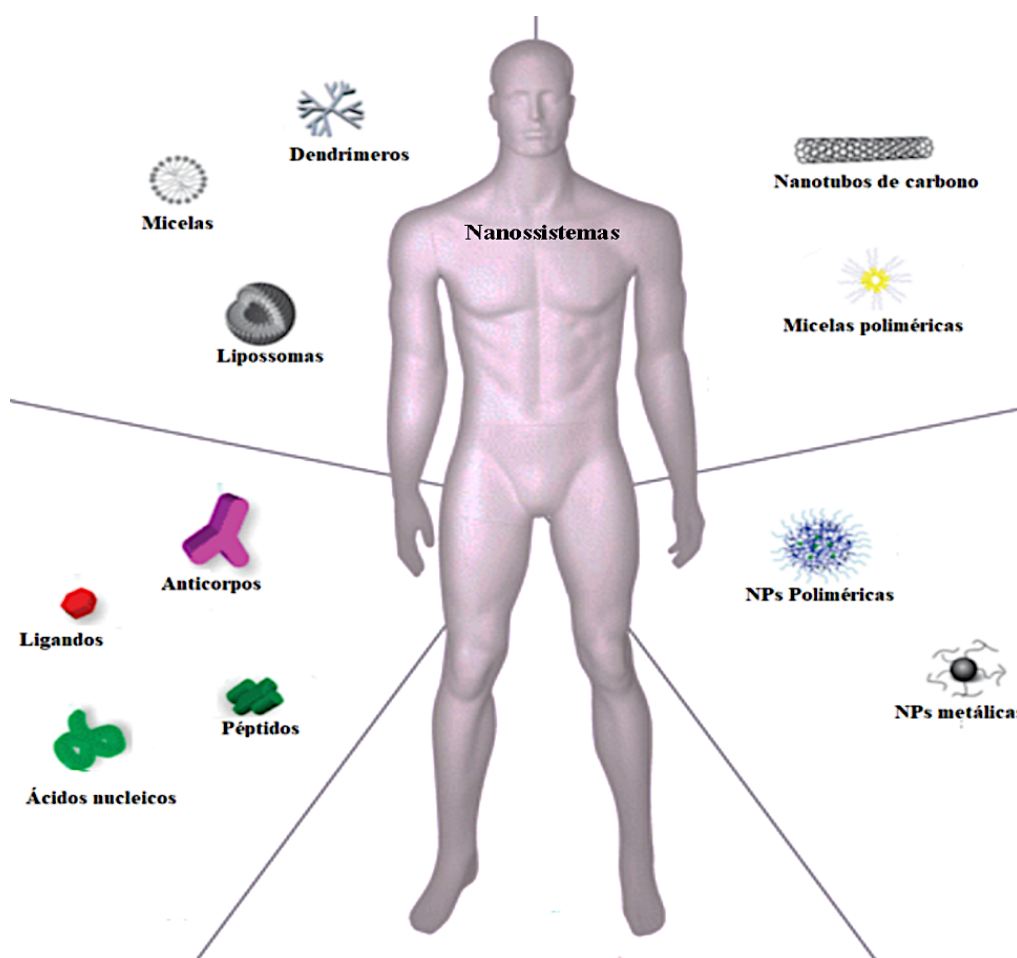


Figura 1: Nanossistemas usados na veiculação de fármacos (adaptado de Friberg and Nystrom (2015); Skorupska *et al.* (2014)).

Quanto à composição, os nanossistemas podem ser constituídos por polímeros (e.g. nanoesferas, nanocápsulas, micelas poliméricas e dendrímeros), lípidos (e.g. lipossomas, micelas e nanopartículas (NPs) lipídicas) e/ou substâncias inorgânicas (NPs metálicas, nanotubos de carbono, NPs cerâmicas e pontos quânticos (QDs, do inglês *Quantum dots*)) (Jose *et al.*, 2018; Skorupska *et al.*, 2014).

Na secção seguinte será feita uma abordagem das características, vantagens/desvantagens de alguns dos nanossistemas. Posteriormente será explorado o potencial de aplicação, de alguns deles, como nanossistemas funcionais.

II.1. Nanossistemas lipídicos

Os nanossistemas lipídicos apresentam na sua composição lípidos naturais ou sintéticos (e.g. triglicerídeos, ácido esteárico, fosfolípidos). Alguns exemplos de nanossistemas lipídicos incluem os lipossomas e as NPs lipídicas. Geralmente, o tamanho dos nanossistemas lipídicos está compreendido entre os 50 nm e os 1000 nm (Huang *et al.*, 2016).

Os lipossomas são constituídos por uma ou mais bicamada de fosfolípidos dispostos concentricamente em torno de um compartimento aquoso (Figura 2). Estes sistemas coloidais permitem veicular quer substâncias hidrófilas, no compartimento aquoso, quer substâncias lipófilas, encapsuladas ou adsorvidas na bicamada lipídica (Gong *et al.*, 2016; Edwards and Baeumner, 2006).

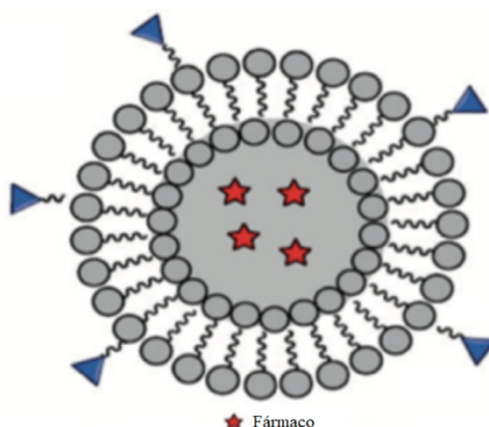


Figura 2: Estrutura de um lipossoma (adaptado de Crucho (2015)).

Os lipossomas apresentam outras vantagens, tais como: (Lee *et al.*, 2017; Sengel-Turk and Hascicek, 2017; Salim *et al.*, 2014; Rajshekar *et al.*, 2013) (i) biocompatibilidade ao nível fisiológico; (ii) biodegradabilidade e toxicidade reduzida; (iii) proteção das substâncias encapsuladas. Como desvantagens, os lipossomas apresentam: (i) problemas de estabilidade físico-química e estabilidade *in vivo*; (ii) potencial para sofrer processos de oxidação e, conseqüente, indução de toxicidade celular; (iii) custos de produção elevados e dificuldade de transposição para a escala industrial; (iv) pureza dos fosfolípidos variável; (v) capacidade de encapsulação limitada.

Na tentativa de superar algumas das desvantagens supracitadas surgiram as NPs lipídicas: as nanopartículas de lípidos sólidos (SLN, do inglês *Solid lipid nanoparticles*) e os vetores

lipídicos nanoestruturados (NLC, do inglês *Nanostructured lipid carriers*) (Muller *et al.*, 1996). As NPs lipídicas foram desenvolvidas tendo por base o conceito das NPs poliméricas, isto é, apresentam uma matriz lipídica que se mantém sólida à temperatura ambiente e corporal.

As SLN derivam das nanoemulsões O/A, por substituição do lípido líquido por um lípido sólido à temperatura ambiente e corporal, e são estabilizados por agentes tensioativos (Figura 3). Contudo, estes nanossistemas apresentam uma capacidade limitada para a encapsulação de substâncias e, frequentemente, ocorre a expulsão precoce do fármaco durante o armazenamento, devido à formação de uma rede cristalina quase perfeita entre os lípidos (Muller *et al.*, 1996).

Os NLC são constituídos por lípido(s) sólido(s) e por uma porção lipídica líquida, originando uma estrutura cristalina com várias imperfeições da matriz lipídica, o que evita a expulsão do fármaco durante o armazenamento, permitindo uma capacidade de encapsulação maior (Figura 3) (Souto *et al.*, 2004).

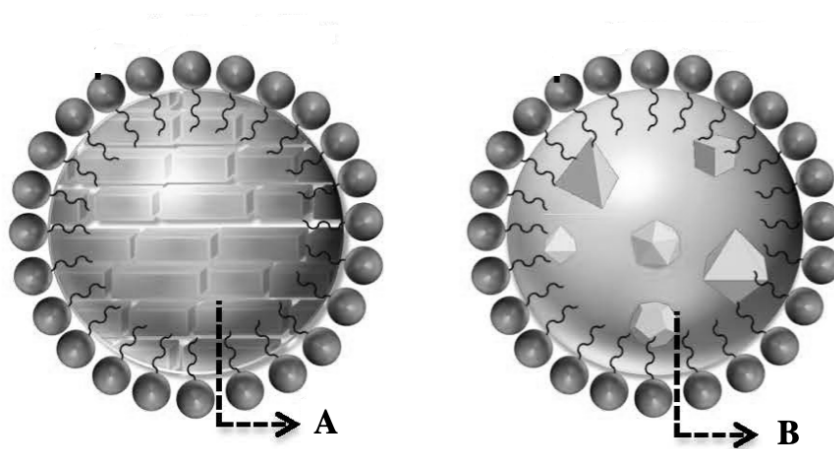


Figura 3: (A) Nanopartículas de lípidos sólidos; (B) Vetores lipídicos nanoestruturados (adaptado de (Hsu *et al.*, 2019)).

Estes nanossistemas apresentam como principais vantagens (Zhang and Zhang, 2016; Jores *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2002; Jennings *et al.*, 2000): (i) biocompatibilidade, uma vez que, são utilizados lípidos semelhantes aos lípidos fisiológicos; (ii) custos de produção reduzidos; (iii) facilidade de transposição à escala industrial. No que concerne às desvantagens mais relevantes, estas incluem: (i) estabilidade reduzida durante o armazenamento; (ii) capacidade de encapsulação limitada de moléculas hidrófilas.

II.2. Nanossistemas poliméricos

A utilização de materiais poliméricos na área da saúde remonta aos anos 40 (Kamaly *et al.*, 2012). Alguns exemplos de nanossistemas poliméricos incluem as NPs poliméricas, as micelas poliméricas, os QDs, os dendrímeros e os fulerenos.

As NPs poliméricas são dos nanossistemas mais usados para a veiculação de compostos antineoplásicos, permitindo modular a libertação e a vectorização dos mesmos (Ahmad *et al.*, 2015; Kamaly *et al.*, 2012). Estes nanossistemas podem ser constituídos por polímeros sintéticos (e.g. ácido poliláctico (PLA, do inglês *Poly(lactic acid)*), poli (ácido láctico - co - glicólico) (PLGA, do inglês *Poly (lactic - co - glycolic acid)*) e/ou polímeros naturais (e.g. gelatina, albumina).

Algumas vantagens associadas às NPs poliméricas incluem (Lee *et al.*, 2017; Mirza and Siddiqui, 2014; Alok *et al.*, 2013): (i) estabilidade físico-química aceitável; (ii) facilidade de produção no laboratório; (iii) biocompatíveis e biodegradáveis. Como principais desvantagens, estes sistemas apresentam: (i) dificuldade para efetuar a transposição para a escala industrial; (ii) utilização de solventes orgânicos durante a sua preparação, podendo conduzir a uma toxicidade residual nas formulações finais.

Existem dois tipos de NPs poliméricas, as nanoesferas e as nanocápsulas (Figura 4). No caso das nanocápsulas, o fármaco fica confinado a uma cavidade rodeada por uma membrana polimérica; nas nanoesferas, o fármaco é disperso por toda a matriz polimérica.

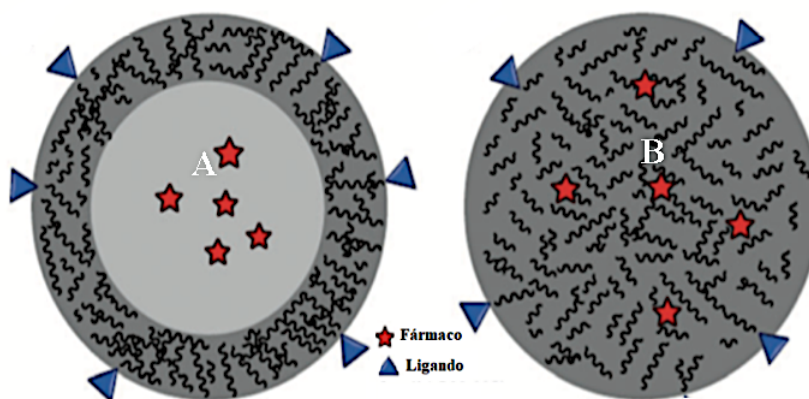


Figura 4: (A) Nanocápsula; (B) Nanoesfera (adaptado de Crucho (2015)).

Os dendrímeros são macromoléculas poliméricas que apresentam uma estrutura tridimensional ramificada à escala nanométrica (1 - 100 nm) (Rani, 2015) (Figura 5). Estes nanossistemas apresentam um núcleo central rodeado por inúmeros monómeros (ramificações), os quais funcionam como unidades funcionais.

As principais vantagens dos dendrímeros são (Li *et al.*, 2017; Catuogno *et al.*, 2016; Rani, 2015; Bei *et al.*, 2010): (i) estabilidade termodinâmica; (ii) possibilidade de utilizar vários grupos funcionais na sua superfície externa; (iii) veiculação de moléculas hidrófilas e hidrófobas no núcleo, nas ramificações e na superfície. Algumas das desvantagens reportadas na literatura incluem: (i) custos de produção elevados; (ii) toxicidade resultante do uso de solventes orgânicos durante a produção.

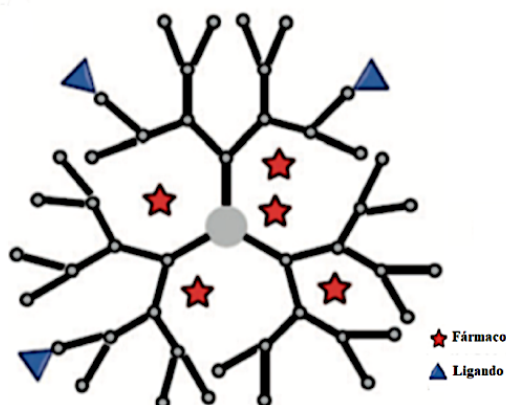


Figura 5: Dendrímero (adaptado de Crucho (2015)).

As micelas são agregados supramoleculares de moléculas anfipáticas, podendo ser formadas por polímeros e/ou tensoativos de baixo peso molecular (Figura 6). A cavidade interior destes sistemas é hidrófoba, permitindo a encapsulação de fármacos hidrófobos (Husseini and Pitt, 2008).

As micelas são sistemas de veiculação bastante versáteis, permitindo a conjugação com ligandos utilizados em estratégias de direcionamento/vectorização. Algumas das limitações apresentadas por estes nanossistemas referem-se: à estabilidade *in vivo* reduzida, podendo ocorrer a libertação imediata dos constituintes ativos e à dificuldade de transposição para a escala industrial.

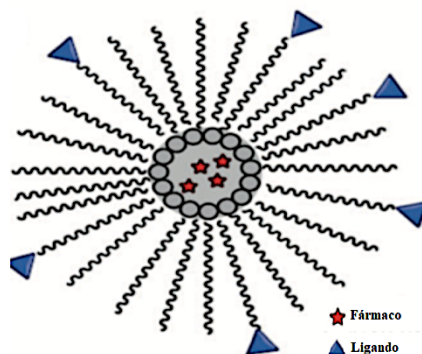


Figura 6: Micela (adaptado de Crucho (2015)).

II.3. Nanossistemas inorgânicos

Os nanossistemas inorgânicos incluem uma variedade de sistemas, nomeadamente NPs metálicas, nanotubos de carbono, QDs e NPs de cerâmica. Estes nanossistemas são relativamente fáceis de sintetizar e apresentam uma estabilidade química razoável quando submetidas a condições fisiológicas. Geralmente, os nanossistemas inorgânicos apresentam dimensões que variam entre os 10 nm e os 100 nm (Wilczewska *et al.*, 2012).

II.3.i. Nanopartículas metálicas

As NPs metálicas podem ser constituídas por diversos metais, contudo, as NPs de ouro, ferro e prata são as mais usadas na área da saúde (Arun Kumar, 2013).

As NPs de ouro possuem tamanhos e forma bem definidos e podem ser manipuladas para a aplicação em tratamentos do cancro (Almeida *et al.*, 2014). As NPs de ouro podem ser tóxicas quando usadas por períodos de tempo prolongados, uma vez que apresentam uma velocidade de eliminação baixa e, como tal, tendem a acumular-se (Ventola, 2017).

As NPs de óxido de ferro (magnetite (Fe_3O_4)) (Figura 7) apresentam estabilidade química em condições fisiológicas, um custo de produção reduzido e são dotadas de propriedades magnéticas. Estas NPs estão aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso clínico (Wilczewska *et al.*, 2012).

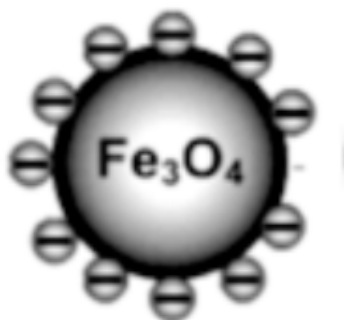


Figura 7: Nanopartícula de Fe₃O₄ (adaptado de Mazo-Zuluaga (2011)).

Considera-se que as NPs de Fe₃O₄ não apresentam toxicidade para as células (Duncan and Gaspar, 2011; Bulte and Kraitchman, 2004). Apesar das NPs poderem ser degradadas pelas células através do metabolismo do ferro, alguns autores têm alertado para o risco de uma quantidade de ferro, resultante de administrações a longo prazo, poder representar para as células, assim como para as células estaminais (Ventola, 2017; Kedziorek *et al.*, 2010; Dousset *et al.*, 2008).

II.3.ii. Outras nanopartículas inorgânicas

As NPs de cerâmica podem ser constituídas por elementos como a sílica, o óxido de titânio e o zircónio (Moreno Vega *et al.*, 2012).

As NPs de sílica apresentam uma estabilidade química e térmica razoável, resistência mecânica e biocompatibilidade (Kedziorek *et al.*, 2010). Estes nanossistemas permitem a conjugação com diferentes moléculas para o desenvolvimento de estratégias de direcionamento/vectorização (Roy Chowdhury *et al.*, 2016). Estas podem apresentar grandes dimensões (3 µm), condicionando o acesso a determinados tecidos (Liu *et al.*, 2011). A forma das NPs pode influenciar o tempo de circulação no organismo. Ao contrário do que acontece com as NPs com forma esférica, as NPs em forma de disco (Figura 8) evitam a opsonização por parte células do sistema fagocitário mononuclear (MPS, do inglês *Mononuclear phagocytic system*), mantendo-se em circulação no organismo (Decuzzi *et al.*, 2010).



Figura 8: NPs de sílica em forma de disco (adaptado de Duncan and Gaspar (2011)).

II.3.iii. Pontos quânticos

Os QDs apresentam dimensões compreendidas entre 1 nm a 100 nm. Geralmente, o núcleo destes sistemas é composto por seleneto de cádmio com um revestimento de sulfureto de zinco ou cádmio (Klostranec and Chan, 2006). Os QDs são caracterizados por possuírem fluorescência e fotoestabilidade elevada (Zheng *et al.*, 2016).

Os QDs têm sido aplicados no teranóstico, contudo a toxicidade dos materiais pesados é uma limitação. Atendendo a esta aplicação, é importante identificar a dose suficiente para emitir sinal passível de deteção sem toxicidade para o doente (Lovric *et al.*, 2005).

II.3.iv. Fulerenos e Nanotubos de carbono

As NPs à base de carbono são obtidas a partir do grafeno, podendo dividir-se em 2 grupos: os fulerenos e os nanotubos (Figura 9) (Geim and Novoselov, 2007). Os fulerenos são caracterizados por (Bosi *et al.*, 2003): (i) possuir uma forma tridimensional; (ii) conter entre 60 a 82 átomos de carbono na sua constituição; (iii) apresentar capacidade de encapsular moléculas no seu interior. Os nanotubos de carbono são caracterizados por (Geim and Novoselov, 2007): (i) possuir uma forma cilíndrica; (ii) apresentar uma resistência mecânica elevada; (iii) possuir propriedades térmicas, óticas e elétricas excelentes.

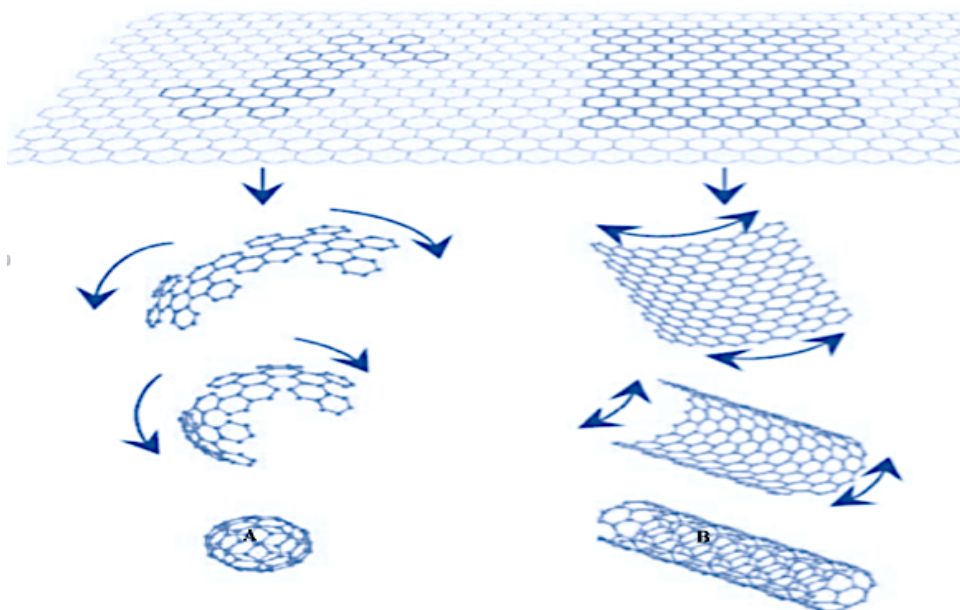


Figura 9: (A) Fullerenos; (B) Nanotubos (adaptado de Geim and Novoselov (2007)).

III. Nanossistemas multifuncionais

De acordo com Tefas *et al.* (2017), nas últimas décadas os avanços científicos no tratamento do cancro aumentaram substancialmente a taxa de sobrevivência dos doentes. Apesar dos benefícios indiscutíveis com os agentes anticancerígenos, muitos dos protocolos de tratamento com quimioterapia acabam por falhar. Este fracasso resulta, não só da toxicidade induzida pelos compostos antineoplásicos, mas também, pela resistência das células cancerígenas aos mesmos. Perante este cenário, considera-se que há um longo caminho para pavimentar no tratamento do cancro, abrindo caminhos para novas abordagens terapêuticas.

A aplicação de uma única estratégia para o tratamento do cancro não tem sido suficiente para alcançar os resultados pretendidos. Desta forma, o uso de nanossistemas multifuncionais, que possuem simultaneamente mais de uma propriedade útil no mesmo sistema, tem sido explorado na área oncológica, nomeadamente (Szasz *et al.*, 2011): (i) coadministração; (ii) direcionamento/vectorização; (iii) nanossistemas de composição híbrida; (iv) sistemas ativados por estímulos; (v) estratégias terapêuticas hifenizadas. A aplicação destas estratégias tem como objetivo maximizar a eficácia do tratamento antineoplásico e reduzir os efeitos secundários nas células saudáveis.

Na secção seguinte serão abordados alguns dos exemplos mais relevantes reportados na literatura, das diferentes estratégias de multifuncionalização.

III.1. Coadministração

A resistência das células cancerígenas pode ser intrínseca e/ou adquirida. Os processos cancerígenos com fenótipo resistente aos compostos antineoplásicos, não respondem eficazmente, mesmo sem qualquer contacto prévio. Por outro lado, os processos cancerígenos que apresentam resistência adquirida, inicialmente são sensíveis aos agentes antineoplásicos, respondendo favoravelmente à terapêutica, mas posteriormente tornam-se resistentes (Yuan *et al.*, 2017). Os mecanismos que contribuem para a resistência adquirida incluem (Yuan *et al.*, 2017): (i) no caso de serem pró - fármacos (i.e. quando os compostos têm de ser ativados por um fenómeno de biotransformação), diminuição da ativação dos compostos antineoplásicos; (ii) limitação do influxo do agente antineoplásico para o espaço intersticial das células cancerígenas, por alteração das

proteínas responsáveis pela internalização do composto; (iii) aumento do efluxo dos compostos anticancerígenos (e.g. glicoproteína P (P - gp - proteína membrana)).

Com o intuito de ultrapassar as limitações referidas, e tendo em conta que os nanossistemas permitem a combinação de agentes farmacológicos e co - adjuvantes, foi proposta a coadministração de agentes antineoplásicos no mesmo nanossistema.

A coadministração de agentes antineoplásicos, apresentando mecanismos de ação e/ou alvos farmacológicos diferentes para o tratamento do cancro, deve ser baseada numa associação racional e na avaliação dos efeitos sinérgicos (Qi *et al.*, 2017). Esta estratégia, quando associada à utilização de nanossistemas, apresenta várias vantagens (Tefas *et al.*, 2017): (i) direcionamento da libertação dos compostos antineoplásicos para os alvos terapêuticos; (ii) sinergismo obtido pela administração concomitante, o que permite diminuir a dose a administrar; (iii) redução dos efeitos secundários; (iv) redução da resistência a múltiplos fármacos; (v) aumento do tempo de circulação sanguínea.

Contudo, a combinação de agentes terapêuticos não é um processo simples, podendo existir limitações para a obtenção do efeito terapêutico devido às diferentes propriedades físico-químicas e aos perfis farmacocinéticos de cada um dos compostos (Yang *et al.*, 2017).

A DOX e o 5 - Fluorouracilo (5 - FU, do inglês *5 - Fluorouracil*) são ambos fármacos antineoplásicos que têm sido usados numa terapia de associação para o tratamento do cancro da mama avançado, com uma taxa de sucesso de 50 - 75% (Hortobagyi *et al.*, 1987; Gabra *et al.*, 1996) e do cancro gástrico, com uma taxa de sucesso de 40 - 50 % (Murad *et al.*, 1993).

A DOX é uma antraciclina que pertence ao grupo dos antibióticos citotóxicos. Este composto apresenta uma taxa de sucesso clínico entre os 40 - 50 %, quando usado em monoterapia (Bao *et al.*, 2011). O mecanismo de ação da DOX não está totalmente esclarecido, mas considera-se que interfira negativamente na síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *Deoxyribonucleic acid*), pela inibição da topoisomerase II, intercalação no DNA e formação de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *Reactive oxygen species*) (Camacho *et al.*, 2016).

O 5 - FU é um análogo do uracilo, componente do ácido ribonucleico. O 5 - FU interfere na síntese do DNA por bloqueio da conversão do ácido desoxiuridílico em ácido timidílico, pela enzima celular timidilato sintetase. Este composto pode ser usado isoladamente ou em associação no tratamento de vários cancros (e.g. estômago, mama, cólon e bexiga). Contudo, o uso de 5 - FU isoladamente apresenta uma eficácia antineoplásica limitada (Wei *et al.*, 2018).

Alguns estudos clínicos demonstraram que o 5 - FU e a DOX apresentam tempos de semivida de 8 a 22 minutos (Diasio and Harris, 1989) e de 4 a 5 minutos, respetivamente (Gabizon *et al.*, 1994). Considerando as velocidades de eliminação elevadas, Camacho *et al.* (2016) desenvolveram uma formulação lipossomal peguilada, o DAFODIL[®] (do inglês, *Doxorubicin and 5 - Fluorouracil optimally delivered in a liposome*), que permitiu a coadministração da DOX e do 5FURW (i.e. um pró-fármaco da 5 - FU). Os lipossomas foram revestidos por moléculas de PEG para reduzir a opsonização por parte do MPS; aumentar o tempo de circulação e melhorar a estabilidade (Camacho *et al.*, 2016; Gabizon *et al.*, 2003)

Camacho *et al.* (2016) injetaram o DAFODIL[®] em ratinhos inoculados com células do cancro da mama 4T1. Os resultados demonstraram que o DAFODIL[®] inibiu cerca de 91% o crescimento do cancro, enquanto que, nas mesmas doses, lipossomas contendo DOX ou 5FURW isoladamente inibiram apenas cerca de 39%. Este estudo confirmou o efeito sinérgico da coadministração dos dois fármacos antineoplásicos. Além disso, os autores reportaram uma redução dos efeitos secundários induzida pela DOX, nomeadamente da cardiotoxicidade, da mielossupressão e da toxicidade renal.

Na área oncológica, algumas substâncias naturais, como por exemplo, a curcumina (CUR) e o α - tocoferol, são consideradas compostos bioativos e têm sido combinadas com fármacos antineoplásicos pelo seu efeito sinérgico no tratamento do cancro (Sunil Kumar *et al.*, 2017; Goncalves *et al.*, 2012). Além disso, os compostos naturais podem atuar como agentes quimiossensibilizantes, uma vez que têm a capacidade de modular múltiplas vias de sinalização, reduzindo o desenvolvimento de resistências.

A CUR é um polifenol extraído do rizoma da planta *Curcuma longa*, com propriedades farmacológicas benéficas bem documentadas, nomeadamente antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatória e anticancerígena (Aggarwal and Harikumar, 2009). É

um exemplo de um composto natural amplamente explorado para a terapia combinada em quimioterapia (Baek and Cho, 2017). A CUR diminui a ativação de alguns fatores de transcrição relacionados com a carcinogénese, como o transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT - 3, do inglês *Signal transducers and activators of transcription 3*) e o fator de transcrição nuclear kappa B (NF - kB, do inglês *Factor nuclear kappa B*) (Deguchi, 2015). O STAT - 3 é ativado em várias células cancerígenas e estimula a oncogénese através da ativação de genes cruciais para a proliferação e a metastização (Wang *et al.*, 2004). O NF - kB, coordenador principal da imunidade inata e da inflamação, tem um papel importante como promotor endógeno da carcinogénese. Este fator pode ser ativado por radiações, citocinas inflamatórias, como por exemplo, fator de necrose tumoral α (TNF - α , do inglês *Tumor necrosis factor α*), e agentes carcinogénicos (e.g. fumo do tabaco) (Karin, 2006; Aggarwal, 2004). Além disso, a CUR inibe a P - gp, bloqueando o efluxo dos fármacos antineoplásicos, e, conseqüentemente, ocorre um aumento da sua concentração no meio intracelular (Chen *et al.*, 2019; Baek and Cho, 2017; Goncalves *et al.*, 2012). No entanto, a CUR apresenta algumas limitações, nomeadamente reduzida solubilidade e estabilidade, traduzindo-se numa biodisponibilidade baixa e num efeito terapêutico reduzido. Desta forma, a veiculação desta substância em nanossistemas, para ultrapassar as limitações inerentes ao composto, tem sido investigada (Baek and Cho, 2017).

Zhang *et al.* (2017) reportaram que cerca de 40 - 50% dos doentes com cancro do ovário apresentam à superfície das células cancerígenas uma expressão elevada da P - gp. Este facto relaciona-se diretamente com o desenvolvimento de resistência das células cancerígenas ao PTX, uma vez que reduz consideravelmente a concentração do fármaco antineoplásico dentro da célula. Uma estratégia explorada para aumentar a concentração do PTX no meio intersticial é a administração simultânea de inibidores da P - gp com fármacos antineoplásicos. Baek and Cho (2017) desenvolveram SLNs conjugadas com folato para aumentar a citotoxicidade do PTX quando coadministrado com a CUR (Figura 10).

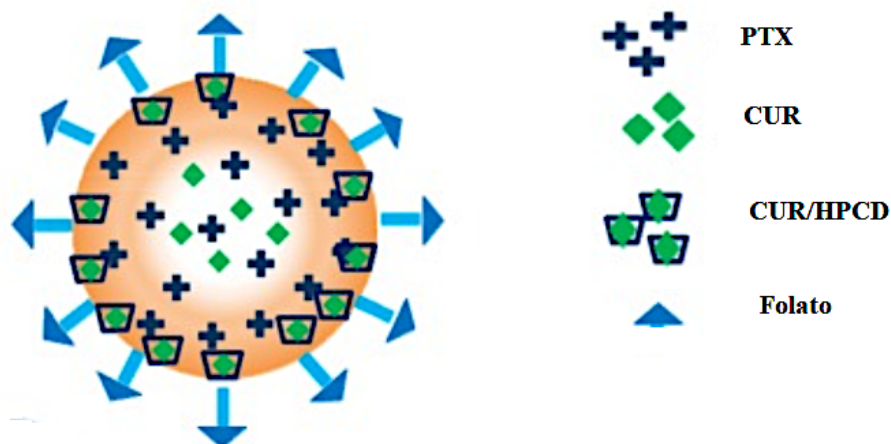


Figura 10: SLN CUR/PTX conjugado com folato (adaptado de Baek and Cho (2017)).

A CUR é uma substância hidrófoba e, como tal, os autores recorreram à sua inclusão na 2 - hidroxipropil - β - ciclodextrina (HPCD, do inglês *2 - hydroxypropyl - β - cyclodextrin*) com o objetivo de melhorar a estabilidade e a solubilidade em água e, adicionalmente, permitir uma libertação mais rápida comparativamente com a libertação do PTX. Os autores reportaram a importância da libertação de uma quantidade suficiente de CUR para inibir o P - gp antes da libertação do PTX. Esta estratégia permitiu aumentar a concentração intracelular do PTX. O direcionamento do nanossistema foi conseguido pela combinação de folato à superfície do nanossistema, o qual se liga aos recetores de folato. Estes recetores são largamente expressos nas células cancerígenas.

Baek and Cho (2017) realizaram testes *in vitro* em células MCF - 7 / ADR (linha celular do cancro de mama) para confirmar a internalização e a citotoxicidade do nanossistema (Figura 11). Os autores concluíram que, o SLN CUR/PTX conjugado com folato aumentou a quantidade internalizada do PTX em comparação com a formulação contendo o PTX livre. Com a administração do PTX livre verificou-se uma concentração celular baixa resultante do efluxo pela P - gp. Estes resultados permitiram confirmar a inibição da P - gp pela CUR.

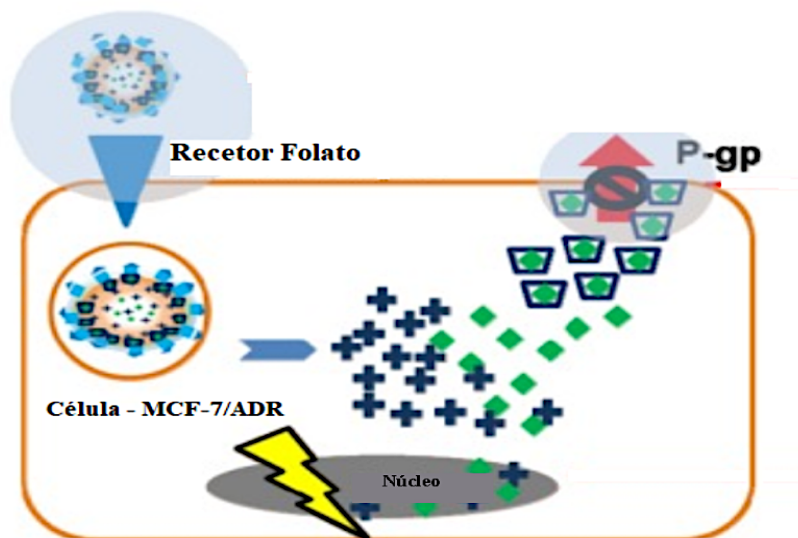


Figura 11: Internalização do SLN CUR / PTX conjugado com folato em célula MCF - 7 / ADR (adaptado de Baek and Cho (2017)).

Apesar do PTX e da CUR apresentarem mecanismo de ação diferentes, a libertação sequencial destes compostos revelou um aumento da citotoxicidade. De acordo com estes resultados, os autores concluíram que o nanossistema desenvolvido tem grande potencial para inibir as células cancerígenas que expressem MDR1 (i.e. o gene que codifica o P - gp) (Baek and Cho, 2017).

De acordo com os estudos realizados por Fadus *et al.* (2017), a utilização da CUR no tratamento do cancro pode manifestar o aparecimento de algumas reações adversas, quando utilizada em doses elevadas (cerca de 12 g dia), incluindo a quelação de ferro, o aparecimento de urticária e a supressão da agregação plaquetária.

Outro composto natural com potencial aplicação no tratamento do cancro é o α - tocoferol. Esta substância é uma vitamina lipossolúvel, com propriedades antioxidantes essenciais para o organismo. De acordo com dados da literatura, o PTX apresenta neurotoxicidade e seletividade reduzida quando administrado isoladamente (Sun *et al.*, 2017). Com a finalidade de ultrapassar estas limitações, alguns autores associaram o PTX ao succinato D - α - tocoferil polietilenoglicol 1000 (TPGS, do inglês *D - α - tocopheryl polyethylene glycol succinate*) (Sun *et al.*, 2017). O TPGS é um derivado da vitamina E que possui uma capacidade de permeação celular elevada. Este composto é obtido por um processo de esterificação com o PEG. Sun *et al.* (2014) sugerem que a coadministração do PTX

com TPGS promove um aumento da permeabilidade do composto antineoplásico através da membrana celular devido às propriedades surfactantes do TPGS. Estes autores desenvolveram NPs poliméricas de PLGA revestidas com TPGS, nas quais encapsularam o PTX. Em ensaios *in vitro*, com células A - 549 (i.e. células cancerígenas epiteliais alveolares humanas), verificou-se uma redução significativa da viabilidade celular comparativamente com o grupo de células tratadas com PTX livre. Nos ensaios *in vivo*, com ratinhos xenotransplantados com células A - 549, reportou-se uma acumulação superior do nanossistema no local do cancro comparado com a administração do PTX livre, resultando num efeito antineoplásico superior, sem efeitos secundários sistémicos (Sun *et al.*, 2014).

III.2. Nanossistemas híbridos

Os sistemas híbridos multifuncionais são, geralmente, desenvolvidos para conferir melhores propriedades e novas aplicações aos nanossistemas. Os nanossistemas híbridos apresentam na sua composição dois ou mais tipos de materiais, por exemplo, polímero/lípido, substância inorgânica/polímero, lípido/substância inorgânica, podendo melhorar a eficácia terapêutica dos compostos veiculados, uma vez que integram as vantagens dos diferentes vetores (Jankiewicz *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2011; Tam *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2003). Os nanossistemas lipídicos, uma vez que apresentam uma composição semelhante às membranas fisiológicas, são considerados biocompatíveis, biodegradáveis e apresentam baixa imunogenicidade. Por outro lado, as NPs poliméricas têm uma capacidade de encapsulação elevada, facilidade de alteração da superfície, elevada estabilidade em resposta a estímulos e a condições fisiológicas. Portanto, o nanossistema híbrido polímero/lípido é desenvolvido com o intuito de reunir as melhores características de ambos os sistemas (Jose *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2016).

Os nanossistemas híbridos têm sido bastante explorados para o tratamento do cancro devido à sua versatilidade.

Conforme descrito anteriormente, a DOX e o PTX têm sido aplicadas em tratamentos do cancro. No entanto, estas moléculas apresentam um efeito terapêutico limitado nas células com capacidade metastática (Minotti *et al.*, 2004). No ano de 2000, a FDA aprovou o trióxido de arsénio (As_2O_3 , do inglês *Arsenic trioxide*) para o tratamento da leucemia promielocítica aguda. Esta patologia é um tipo de leucemia mieloide, caracterizada pela formação de leucócitos anormais e hemorragias frequentes, representando a forma mais maligna da leucemia aguda com capacidade para metastizar (Wang and Chen, 2008). O mecanismo de ação do As_2O_3 não está totalmente esclarecido, mas supõe-se que este composto promova a ativação da proteína Bax, induzindo a apoptose (Zheng *et al.*, 2005). A aplicação do As_2O_3 na prática clínica tem sido limitada, uma vez que este composto liga-se extensivamente às proteínas plasmáticas e sofre uma eliminação renal rápida. Consequentemente, a concentração de As_2O_3 no local alvo é reduzida (Swindell *et al.*, 2013). Numa tentativa de ultrapassar este inconveniente, alguns investigadores desenvolveram diferentes nanossistemas, como lipossomas (Lee *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2006) ou micelas poliméricas (Zhang *et al.*, 2014), para veicular o As_2O_3 . Contudo, a incompatibilidade da natureza orgânica destes nanossistemas com as características

químicas do As_2O_3 resultou numa libertação do fármaco em circulação antes dos nanossistemas alcançarem o local alvo. Como alternativa, Fei *et al.* (2017) propuseram o encapsulamento do As_2O_3 em NPs de sílica mesoporosa revestidas com diestearoil fosfatidilcolina (DSPC, do inglês *Distearoyl phosphatidylcholine*) e conjugadas com o tripéptido de arginina, glicina e asparagina (RGD, do inglês *Arginine - glycine - aspartic*) (Figura 12), para o tratamento do carcinoma do fígado. As NPs de natureza inorgânica apresentam várias vantagens como sistemas de veiculação, nomeadamente (Fang *et al.*, 2013): (i) têm elevada estabilidade e biocompatibilidade; (ii) permitem a encapsulação de fármacos e a sua proteção, quer da degradação enzimática quer da degradação por fatores ambientais; (iii) a superfície destes nanossistemas é suscetível de ser alterada.

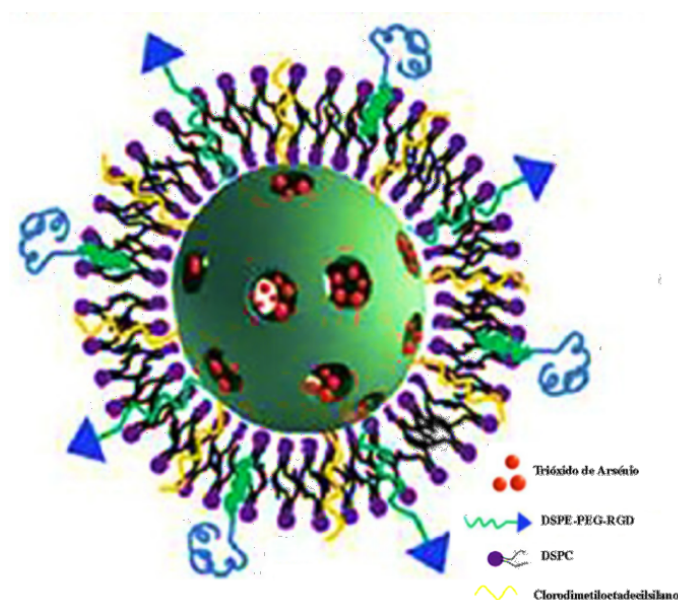


Figura 12: NP de sílica mesoporosa revestida com DSPC e conjugada com RGD (adaptado de Fei *et al.* (2017)).

O DSPC foi adicionado à formulação para minimizar a auto agregação e aumentar a biocompatibilidade (Teng *et al.*, 2013; Ashley *et al.*, 2011). Além disso, outros compostos foram utilizados no desenvolvimento do nanossistema. O cloro (dimetil) octadecilsilano contribui para o aumento da estabilidade da NP na corrente sanguínea. O DSPE - PEG₂₀₀₀ - Maleimida - 1, 2 - distearoil - sn - glicero - 3 - fosfoetanolamina - N - [maleimida - (polietilenoglicol 2000)] (DSPE - PEG₂₀₀₀ - Mal, do inglês *1, 2 - distearoyl - sn - glycerol - 3 - phosphoethanolamine - N - [maleimide (polyethylene glycol 2000)]*) foi associado para estabelecer a ligação do RGD ao nanossistema (Fei *et al.*, 2017). As integrinas são recetores de glicoproteínas transmembranares que mediam a ligação entre uma célula e

os tecidos circundantes ou a matriz extracelular. Estes recetores, com expressão aumentada nas células cancerígenas, desempenham um papel importante no processo de metastização, facilitando a adesão das células cancerígenas ao revestimento endotelial dos vasos sanguíneos de outros órgãos e tecidos. O RGD liga-se eficazmente à integrina $\alpha v \beta 3$ expressa à superfície das células cancerígenas. Este tripéptido apresenta um efeito inibitório na adesão e na angiogénese das células cancerígenas, tendo sido usado para o direcionamento de fármacos antineoplásicos (Du *et al.*, 2011).

Em ensaios *in vivo*, realizados em ratinhos portadores de cancro hepático, Fei *et al.* (2017) injetaram uma solução de As_2O_3 , NPs de sílica mesoporosa com As_2O_3 e NPs de sílica mesoporosa com As_2O_3 conjugado com RGD. Decorridos 15 dias de tratamento, os ratinhos foram sacrificados. Após excisão foi avaliado a massa cancerígena (Tabela 2).

Tabela 2: Massa cancerígena dos ratinhos após tratamento com As_2O_3 (n = 6) (adaptado de Fei *et al.* (2017)).

Grupo	Massa (g) \pm SD
Solução salina (controlo)	1,65 \pm 0,13
Solução de As_2O_3	1,05 \pm 0,16
NPs de sílica mesoporosa com As_2O_3	0,79 \pm 0,12
NPs de sílica mesoporosa com As_2O_3 conjugado com RGD	0,29 \pm 0,07

Os autores concluíram que o efeito citotóxico, decorrente da administração das NPs de sílica mesoporosa com As_2O_3 associado ao RGD, foi significativamente superior. Tais resultados estão associados à utilização da estratégia de direcionamento, traduzindo-se numa maior captação por parte das células cancerígenas.

Para além da CUR, a isoliquiritigenina (ISL, do inglês *Isoliquiritigenin*) é outra substância natural com interesse para o tratamento do cancro (Wang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014). A ISL é um composto fenólico e lipossolúvel que, de acordo com resultados da literatura, inibe a angiogénese, limitando a proliferação das células cancerígenas, e induz a autofagia, ou seja, contribui para a diminuição do mecanismo de resistência das

células aos agentes antineoplásicos (Liu *et al.*, 2019a; Rehman *et al.*, 2017). Contudo, algumas propriedades deste composto, nomeadamente a reduzida solubilidade, biodisponibilidade e direcionamento, limitam a aplicação clínica (Liu *et al.*, 2019a). (Gao *et al.*, 2017) encapsularam o ISL em NPs híbridas com uma matriz composta por PLGA e revestida com lípidos (lecitina de soja), contendo à sua superfície peptídeos iRGD conjugado com DSPE - PEG₂₀₀₀ - Mal (Gao *et al.*, 2017).

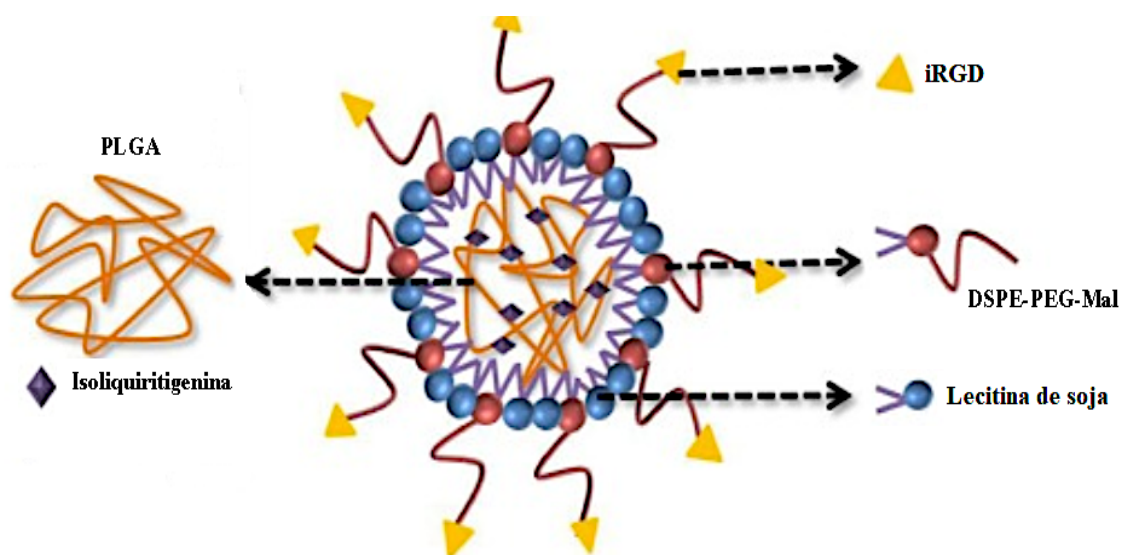


Figura 13: NP híbrida polímero / lípido contendo ISL - iRGD (adaptado de Gao *et al.* (2017)).

O iRGD é um péptido cíclico de 9 aminoácidos que reconhece dois tipos de recetores, a integrina e a neuropilina - 1 (Ruoslahti and Pierschbacher, 1987). Conforme representado na Figura 14, inicialmente o iRGD liga-se à integrina $\alpha\beta$, que é largamente expressa na superfície das células cancerígenas. Após clivagem proteolítica do iRGD, a porção *C-terminal Rule* (CendR) é exposta, ligando-se ao recetor neuropilina - 1 (recetor regulador da permeabilidade), permitindo a entrada dos nanossistemas nas células cancerígenas (Liu *et al.*, 2017).

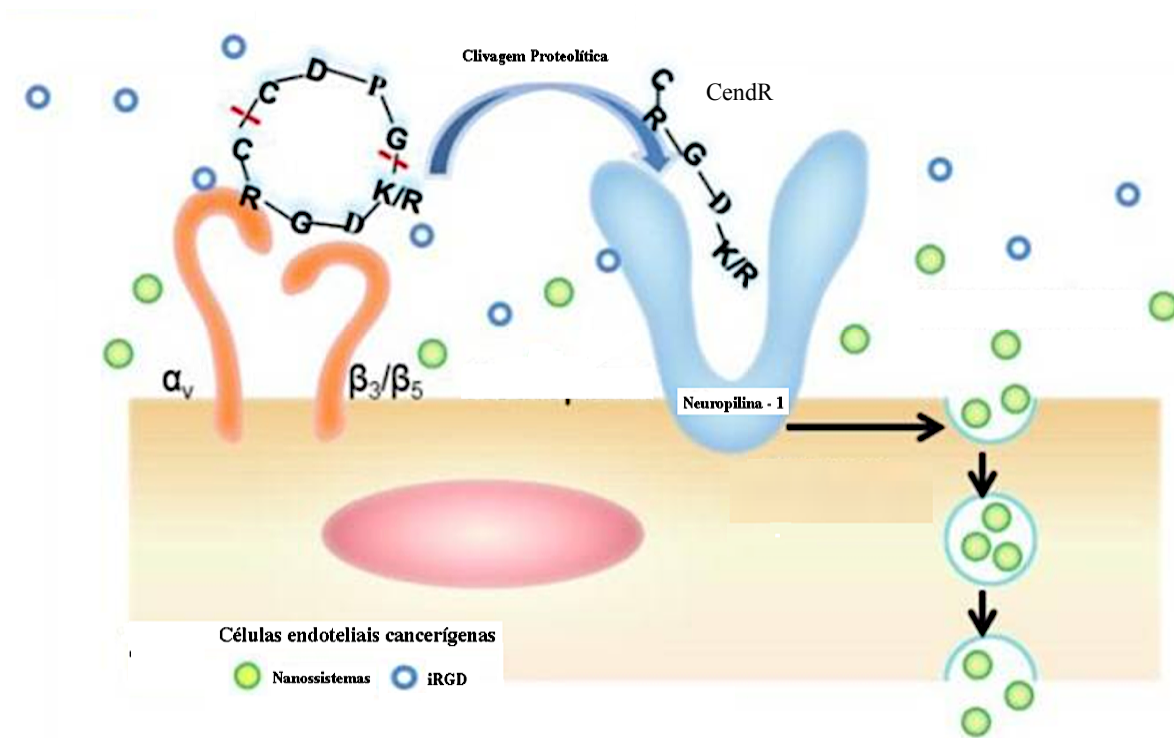


Figura 14: Mecanismo de transcitose ativado por iRGD dos nanossistemas em células cancerígenas (adaptado de Liu *et al.* (2017)).

Gao *et al.* (2017) realizaram ensaios *in vitro* com linha celular MCF7 e verificaram que a inibição da proliferação celular foi superior com as NPs ISL - iRGD comparativamente com a administração da ISL livre. Posteriormente, realizaram ensaios *in vivo* em ratinhos fêmeas com cancro da mama para avaliar o efeito citotóxico do ISL, administrando NPs ISL - iRGD; ISL na forma livre; e NPs ISL. Decorrido 14 dias, os ratinhos foram sacrificados. Os autores verificaram uma diminuição de 474 mm³ do volume do cancro dos ratinhos tratados com NPs ISL - iRGD em comparação com os outros 3 grupos (controlo - i.e. administração de uma solução salina, ISL na forma livre e NPs ISL).

III.3. Estratégias de direcionamento/vectorização

As estratégias de direcionamento dos nanossistemas para os tecidos cancerígenos podem subdividir-se em direcionamento passivo e ativo (Bertrand *et al.*, 2014). O direcionamento de agentes bioativos tem como objetivos principais reduzir a toxicidade sistémica e maximizar a eficácia dos tratamentos anticancerígenos (Lohade *et al.*, 2016).

III.3.i. Direcionamento passivo

A veiculação de agentes bioativos difere drasticamente entre os tecidos cancerígenos e os tecidos normais devido às diferenças estruturais de ambos os tecidos. Os tecidos cancerígenos são caracterizados por apresentarem uma organização e estrutura de vascularização anormal, com conseqüente, alteração do fluxo sanguíneo. Além disso, o défice de vasos linfáticos funcionais e a permeabilidade vascular elevada nos tecidos cancerígenos proporcionam diferenças entre a veiculação e/ou permeação dos compostos.

Nos processos cancerígenos verifica-se uma proliferação rápida das células endoteliais e uma redução do número de pericitos, acompanhado por um processo de angiogénese acelerado e deficiente. Estes fenómenos proporcionam uma vasculatura anormal, ou seja, a vasculatura cancerígena apresenta grandes poros no endotélio, cujo diâmetro varia entre 100 nm a 780 nm, quando comparado com as junções dos vasos normais, cujo diâmetro está compreendido entre 5 - 10 nm (Deshpande *et al.*, 2013). Os nanossistemas administrados devem apresentar um diâmetro na ordem dos 10 – 100 nm, para que não ocorra extravasamento nos vasos e permaneçam confinados no sistema circulatório (Davis *et al.*, 2008). A vascularização sanguínea fenestrada proporciona uma permeabilidade vascular elevada no tecido cancerígeno, permitindo a passagem dos nanossistemas que se encontram em circulação para o espaço intersticial. Além disso, a drenagem linfática deficiente contribui para o aumento da retenção de macromoléculas e dos nanossistemas no microambiente tumoral - EPR, conforme ilustrado na Figura 15. Portanto, com o aumento do tempo de semivida e, conseqüentemente, o aumento do tempo de circulação junto da região mais permeável, a probabilidade de acumulação do nanossistema no microambiente tumoral aumenta (Kraft *et al.*, 2014).

A carga da superfície dos lipossomas é outro fator que influencia o direcionamento passivo. A presença de carga eletrostática à superfície do nanossistema promove uma

interação com as opsoninas, sendo então removidos mais rapidamente da circulação do que os lipossomas neutros (Laverman *et al.*, 1999). Além disso, Banerjee (2001) refere que a taxa de captura de lipossomas carregados positivamente no baço é aproximadamente duas vezes inferior em comparação com os lipossomas carregados negativamente.

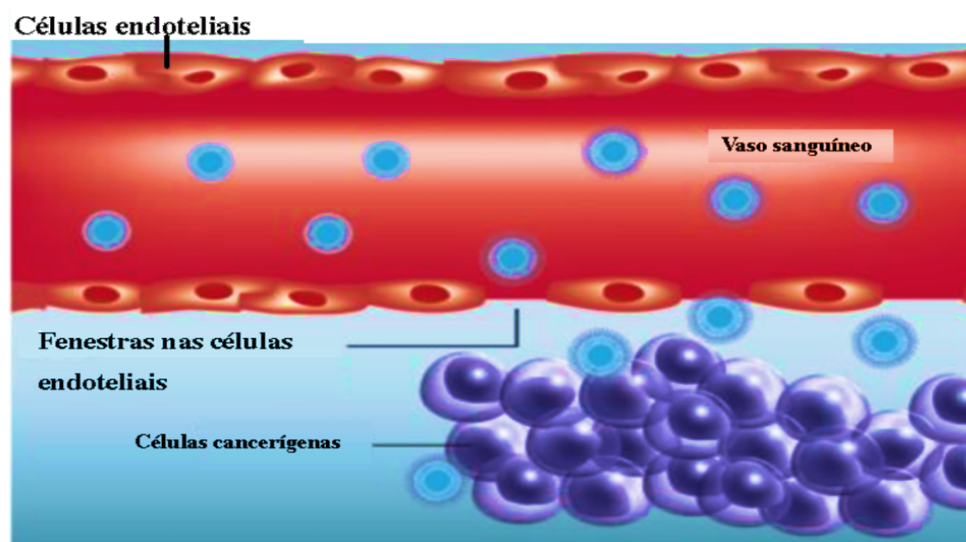


Figura 15: Efeito de permeabilidade e retenção aumentada (adaptado de Deshpande *et al.* (2013)).

No desenvolvimento dos nanossistemas, idealmente, os materiais utilizados devem ser biocompatíveis. Alguns nanossistemas são suscetíveis de serem modificados à sua superfície. Esta manipulação da superfície pode ter repercussões no percurso dos nanossistemas no organismo, nomeadamente no processo de absorção, no tempo de semivida e na estabilidade (Dreher *et al.*, 2006). Conforme descrito anteriormente, o revestimento de nanossistemas (i.e. lipossomas) com PEG impede que estes sejam reconhecidos pelas células do sistema imunitário como substâncias estranhas, evitando a opsonização e a eliminação por ação do MPS (Deshpande *et al.*, 2013; Otsuka *et al.*, 2003). Este acontecimento ocorre porque as moléculas de PEG formam uma camada hidrófila protetora que impedem a penetração das opsoninas e a agregação dos nanossistemas por aumento da interação repulsiva entre eles e os componentes do sangue (Pappalardo *et al.*, 2014; Duangjit *et al.*, 2014).

Para comprovar o benefício do revestimento com as moléculas de PEG, Allen *et al.* (1995) injetaram em ratinhos lipossomas revestidos com PEG e lipossoma não revestidos.

Decorrido 24 horas após a injeção, a concentração de lipossomas revestidos com PEG manteve-se constante. Os autores concluíram que a taxa de eliminação dos lipossomas com PEG não depende da dose e é significativamente mais baixa em comparação com os lipossomas não revestidos.

III.3.ii. Direcionamento ativo

No direcionamento passivo, a ação do nanossistema depende fundamentalmente do EPR, podendo resultar na libertação do composto bioativo em células saudáveis, contribuindo para o desenvolvimento de resistências. Desta forma, o desenvolvimento de nanossistemas com estratégias de direcionamento ativo tem despertado a atenção de alguns investigadores (Clemons *et al.*, 2018).

III.3.ii.1. Recetores de superfície celular

O direcionamento/vectorização ativo para recetores de superfície celular relaciona-se com o uso de moléculas específicas, designadas de ligandos, envolvidas em interações ao nível fisiológico. Os ligandos são acoplados à superfície dos nanossistemas, e, *in vivo*, sob determinadas condições fisiológicas, ligam-se a um recetor complementar, ou seja, os ligandos são reconhecidos por determinadas proteínas de membrana expressas pelas células cancerígenas, conforme ilustrado na Figura 16. A ligação entre o recetor de membrana e o ligando deve ser eficaz para que o nanossistema não migre para outros tecidos. Adicionalmente, o nanossistema não deve ser reconhecido pelo MPS. Após a ligação, pode ocorrer um dos dois processos (Zalba *et al.*, 2016; Deshpande *et al.*, 2013; Egusquiaguirre *et al.*, 2012): (i) o nanossistema liberta o fármaco e, posteriormente, difunde-se através da membrana plasmática, ou (ii) o nanossistema é transportado por um mecanismo de endocitose para o interior da célula e ocorre libertação do fármaco no meio intracelular.

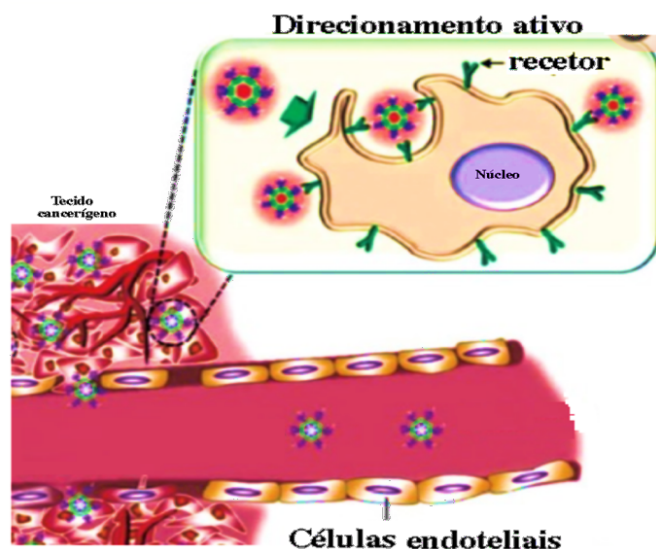


Figura 16: Direcionamento ativo de NPs (adaptado de Park (2012)).

A aplicação de ligandos específicos tem por finalidade aumentar a acumulação preferencial do nanossistema nas células cancerígenas. Os ligandos podem ser anticorpos monoclonais, péptidos ou glicoproteínas, que se ligam à superfície dos nanossistemas. Estes compostos são direcionados para receptores ou antigénios, largamente expressos em células cancerígenas, como receptores de transferrina, receptores de folato, receptores do fator de crescimento epitelial (EGFR, do inglês *Epidermal growth factor receptor*) e o receptor - 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER - 2, do inglês *Human epidermal growth factor receptor - type 2*).

O EGFR é largamente expresso em diversos cancros (e.g. pescoço, cabeça, colón, pulmão e pâncreas) caracterizados por um crescimento rápido e necessidade de uma aporte nutricional maior. A conjugação de anticorpos anti - EGFR em nanossistemas é uma terapia promissora, porque os anticorpos ligam-se eficazmente ao recetor e atinge-se concentrações terapêuticas no interior das células cancerígenas (Zalba *et al.*, 2016). O HER - 2 é um proto-oncogene que codifica o recetor do HER - 2 e está mais direcionado para cancro da mama (Zalba *et al.*, 2016).

Liu *et al.* (2019b) desenvolveram lipossomas multifuncionais incorporando a DOX e acoplado o cetuximab (Erbix[®]) à superfície. O cetuximab é um anticorpo monoclonal anti - EGFR aprovado pela FDA, podendo ser utilizado isoladamente ou em combinação com a quimioterapia. Este nanossistema foi desenvolvido com o objetivo de se ligar ao recetor EGFR e promover a internalização do lipossoma nas células cancerígenas. Em

ensaios *in vivo*, realizados em ratinhos injetados com uma linha celular de adenocarcinoma epitelial de pulmão humano (A549), verificou-se que, ao fim do 25º dia de tratamento, o nanossistema inibiu o crescimento do cancro. Os autores confirmaram que o nanossistema apresenta uma citotoxicidade superior quando comparado com a administração da DOX livre, e, além disso, a conjugação do nanossistema com o cetuximab permite um direcionamento ativo, traduzindo-se numa toxicidade reduzida para os tecidos saudáveis que não expressam o recetor EGFR.

A transferrina é uma glicoproteína que regula os níveis de ferro no organismo. De acordo com a literatura, a expressão do recetor da transferrina pode ser 100 vezes superior em células cancerígenas em comparação com células saudáveis. Desta forma, dada a elevada expressão do recetor, este composto também é um ligando promissor para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento do cancro (Sonali *et al.*, 2016). Yuan *et al.* (2014) desenvolveram lipossomas contendo o docetaxel (DTX) e funcionalizados à superfície com a transferrina para o tratamento do cancro do ovário. O DTX é um fármaco antineoplásico, antimetabólico, usado principalmente no tratamento dos cancros da mama, ovário e pulmões. Contudo, este composto apresenta um tempo de semivida muito curto, uma solubilidade em água reduzida e uma seletividade para as células cancerígenas baixa (Ji *et al.*, 2012; Liang *et al.*, 2006). Em ensaios *in vitro* com células A2780 e SKOV3, linhas celulares do cancro de ovário, os autores demonstraram que a concentração de DTX nas células cancerígenas foi superior com o complexo lipossoma - transferrina - DTX comparativamente com os lipossomas contendo DTX e não funcionalizados com transferrina. Nos estudos realizados em ratinhos verificou-se uma inibição do crescimento do cancro no grupo tratado com o complexo lipossoma - transferrina - DTX em comparação com o grupo controlo (i.e. ao qual foi administrado solução tampão fosfato). Os autores relacionaram a atividade citotóxica com a eficaz captação dos lipossomas funcionalizados pelas células cancerígenas dos ratinhos, permitindo um direcionamento ativo do DTX, com a redução da toxicidade e o aumento do efeito terapêutico (Yuan *et al.*, 2014).

Os recetores de folato são também expressos em grande número em diversas células cancerígenas (e.g. cancro do ovário, endométrio, testículos e cérebro). O mesmo não se verifica em células saudáveis, onde a expressão do recetor de folato é bastante reduzida. Desta forma, o desenvolvimento de nanossistemas direcionados para os recetores de

folato representam uma estratégia bastante promissora. Patil *et al.* (2016) desenvolveram lipossomas contendo um pró-fármaco lipófilo de Mitomicina C (MMC, do inglês *Mitomycin - C*) acoplado, à sua superfície, moléculas de folato. A MMC é um antibiótico antibacteriano, antifúngico e citotóxico, usado em tratamentos de quimioterapia para cânceros multirresistentes, apresentando um espectro citotóxico amplo. A MMC liga-se ao DNA formando um complexo, por outro lado, também decompõe o DNA e inibe a sua síntese (Patil *et al.*, 2016). A aplicação clínica deste composto é limitada devido à sua toxicidade (e.g. nefrotoxicidade, toxicidade pulmonar, mielossupressão) e ao tempo de semivida reduzido. Além disso, este composto requer intervalos de segurança longos para permitir a recuperação óssea, comprometendo a eficácia na inibição do crescimento do cancro (Patil *et al.*, 2016). O folato é uma vitamina do complexo B importante para a formação dos eritrócitos e para a síntese do DNA (Ulrich, 2008). É uma molécula de pequenas dimensões, não imunogénica, facilmente conjugada com a estrutura dos lipossomas e com elevada afinidade com o seu recetor. A ligação ao recetor de folato facilita a endocitose do lipossoma. Quando o recetor de folato estabelece ligação com o nanossistema, este é internalizado por um mecanismo de endocitose, conforme representado na Figura 17. No endossoma ocorrem alterações do pH que resultam na separação do ligando do seu recetor. Simultaneamente, o nanossistema liberta para o meio intracelular o agente antineoplásico para exercer a ação citotóxica. Posteriormente, o recetor é reciclado, voltando a expressar-se à superfície da célula (Luyckx *et al.* (2014)).

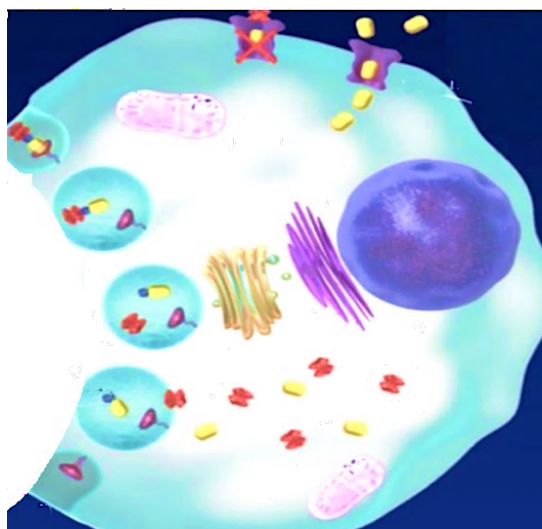


Figura 17: Mecanismo internalização por endocitose do nanossistema (adaptado de Luyckx *et al.* (2014)).

Nos ensaios *in vitro*, realizados com células cancerígenas multirresistentes de ovário humano, Patil *et al.* (2016) concluíram que o efeito citotóxico da MMC encapsulada no lipossoma conjugado com moléculas de folato era superior ao efeito da MMC livre, tendo-se obtido o mesmo resultado *in vivo* com ratinhos com cancro pancreático. Contudo, a MMC, sendo administrada sob a forma de pró-fármaco, necessita de ser ativada no meio intracelular. Os resultados *in vitro* demonstraram um efeito citotóxico inferior aquando da utilização do pró-fármaco, uma vez que a ativação deste depende da presença de substâncias redutoras, sendo necessário a adição de agentes redutores externos (e.g. cisteína, N - acetilcisteína). O mesmo não acontece nos ensaios *in vivo* porque os agentes redutores endógenos (e.g. glutathiona (GSH, do inglês *Glutathione*), tioredoxina) são abundantes em células cancerígenas e ativam eficazmente o pró-fármaco.

III.3.ii.2. Microambiente cancerígeno

O microambiente cancerígeno desempenha um papel importante no desenvolvimento e progressão do cancro. A compreensão e o conhecimento deste permitem a aplicação de diferentes estratégias terapêuticas, baseada nas características específicas deste microambiente. A vasculatura cancerígena apresenta uma distribuição heterogénea dos vasos e capilares e uma arquitetura anormal, conforme ilustrado na Figura 18. Os vasos sanguíneos são caracterizados por terem um défice de músculo liso e grandes poros entre as células endoteliais (Jain *et al.*, 2007).

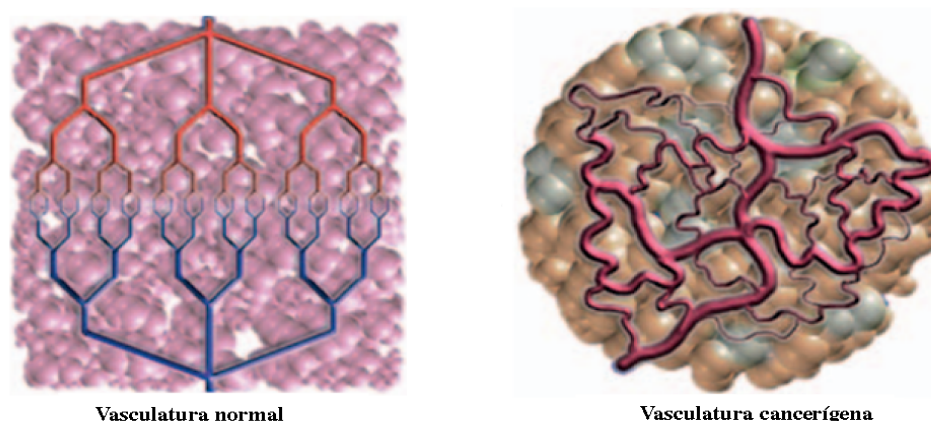


Figura 18: Vasculatura normal e vasculatura cancerígena (adaptado de Jain *et al.* (2007)).

A velocidade de perfusão sanguínea nos tecidos cancerígenos é desigual, podendo resultar em locais com baixa ou nenhuma perfusão. O metabolismo acelerado característico das células cancerígenas requer um aporte nutricional e energético elevado. Os produtos metabólicos resultantes contribuem para um ambiente cancerígeno próprio, com um pH ácido, tecido necrosado e oxigenação reduzida. A massa de células em constante crescimento cria uma pressão sobre as células circundantes, contribuindo para uma circulação sanguínea e linfática deficiente (Piaggio *et al.*, 2016; Padera *et al.*, 2004). A elevada pressão e hipoxia estimulam as células saudáveis, inseridas nos tecidos circundantes, a transformarem-se e adquirirem o fenótipo pró-tumoral e a formarem metástases. Adicionalmente, as células do sistema imunitário neste local ficam fragilizadas e possuem menor capacidade de deteção, contribuindo para o desenvolvimento de resistências aos fármacos antineoplásicos (Jain and Stylianopoulos, 2010).

O desenvolvimento de alternativas terapêuticas que tenham como alvo a vasculatura/microambiente cancerígeno pode apresentar vantagens, uma vez que o alvo pode ser a vasculatura existente, a vasculatura em fase de crescimento ou a vasculatura em processo de metastização, permitindo maximizar o efeito terapêutico e diminuir as resistências adquiridas aos fármacos (Deshpande *et al.*, 2013).

A molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM - 1 do inglês, *Vascular cell adhesion molecule - 1*) é uma glicoproteína transmembranar que se expressa, maioritariamente, nas células endoteliais na presença de um processo cancerígeno. Na vasculatura saudável, a expressão da VCAM - 1 é praticamente nula. A VCAM - 1 é responsável pela adesão intracelular, recrutamento e migração de leucócitos (macrófagos e células T) dos vasos sanguíneos, sendo a sua expressão induzida pelo TNF - α (Kong *et al.*, 2018).

Gosk *et al.* (2008) desenvolveram um imunolipossoma acoplado com um anticorpo monoclonal anti -VCAM - 1 para o direcionamento específico das células endoteliais que expressem o VCAM - 1. Em ensaios *in vitro* com células bEnd.3 (linha celular endotelial imortalizada do cérebro de ratinhos), os autores confirmaram a internalização do nanossistema pelas células endoteliais previamente ativadas com TNF - α . Uma vez que os resultados *in vitro* revelaram-se promissores, o direcionamento vascular foi investigado utilizados ratinhos xenotransplantados com células do cancro do pulmão humano. Os autores constataram que a acumulação dos nanossistemas direcionados para

a VCAM - 1 foi ligeiramente superior aos lipossomas controlo (sem direcionamento). No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Kirpotin *et al.* (2006) realizaram ensaio *in vivo*, administrando imunolipossomas anti - HER - 2 encapsulando DOX em ratinhos xenotransplantados com células do cancro hepático que apresentam uma elevada expressão de HER – 2 (linha celular MCF – 7). Os resultados demonstraram uma acumulação de lipossomas direcionados e não direcionados. Contudo, os lipossomas não direcionados acumularam-se preferencialmente no espaço extracelular, enquanto que os lipossomas com direcionamento para o VCAM - 1 estavam presentes no citosol das células cancerígenas, verificando-se um aumento do efeito citotóxico.

III.3.ii.3 Metástases

A capacidade de uma célula para metastizar é um fator de prognóstico e um marco importante para determinar a gravidade da doença (Richards *et al.*, 2013). Uma célula cancerígena que deriva de um cancro sólido, para metastizar necessita de sair do local que lhe deu origem, entrar na circulação sanguínea e fixar-se num microambiente com características favoráveis. Durante a circulação sanguínea, esta célula interage com plaquetas e leucócitos, formando um aglomerado de células cancerígenas que facilitam o processo de metastização (Läubli *et al.*, 2006).

Os macrófagos desempenham um papel importante na presença de células cancerígenas. Estes podem ser de dois subtipos: M1 e M2. Os M1 promovem a remoção dos componentes patogénicos e das células cancerígenas. Por outro lado, os M2, estruturalmente semelhantes aos macrófagos associados ao cancro (TAMs, do inglês *Tumor associated macrophages*), promovem a libertação do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF, do inglês *Vascular endothelial growth factor*), molécula importante no processo de angiogénese e metástase. O VEGF estimula a proliferação e a migração das células endoteliais e também aumenta a permeabilidade dos vasos sanguíneos pela adição de número de poros e aumento do tamanho dos mesmos (Jiang *et al.*, 2017; Sharkey *et al.*, 2000).

Os TAMs apresentam diversas funções (Sica *et al.*, 2006): (i) inibem a imunidade adaptativa (inibição das células T); (ii) estimulam a proliferação das células cancerígenas

e angiogénese; (iii) restauram o tecido danificado. A produção de fatores quimiotáticos, por parte das células cancerígenas, recruta os monócitos que se encontram em circulação. Quando se encontram em contato com os tecidos cancerígenos sofrem um processo de diferenciação para TAMs. Estes adquirem um novo fenótipo com características pró-tumorais, ou seja, promovem a estimulação da proliferação celular e a angiogénese (Piaggio *et al.*, 2016; Jaguin *et al.*, 2013). Supõe-se que as células cancerígenas movam-se juntamente com os TAMs, os quais parecem proteger as células na sua progressão (Richards *et al.*, 2013; Allavena and Mantovani, 2012).

A alteração do microambiente cancerígeno pode reduzir o processo de metastização, obtendo melhores resultados na terapêutica antineoplásica (Niu *et al.*, 2014). Os TAMs podem ser usados como alvos terapêuticos e podem ser potenciais marcadores cancerígenos, facilitando o diagnóstico e o tratamento de cancro (Yang and Zhang, 2017). Mantovani *et al.* (2002) refere que os TAMs expressam à sua superfície recetores de manose. Desta forma, uma alternativa é a utilização de moléculas de manose como ligando para direcionar os nanossistemas para estes macrófagos. Niu *et al.* (2014) desenvolveram NPs poliméricas de PLGA contendo DOX, modificando a sua superfície com manose e PEG sensível ao pH ácido, conforme representado na Figura 19. O PEG₂₀₀₀ foi conjugado com a hidrazida esteárica originando polietilenoglicol - hidrazona - C18 (PHC, do inglês, *Polyethylene glycol - hydrazone - C 18*) (Zhu *et al.*, 2013). As cadeias de PEG têm a função de proteger a manose presente à superfície das NPs. O pH ligeiramente ácido (sensivelmente 6,84) do microambiente cancerígeno catalisa a ligação da hidrazona e ocorre a libertação das moléculas de PEG, expondo a manose para a interação com os recetores de manose presente nos TAMs.

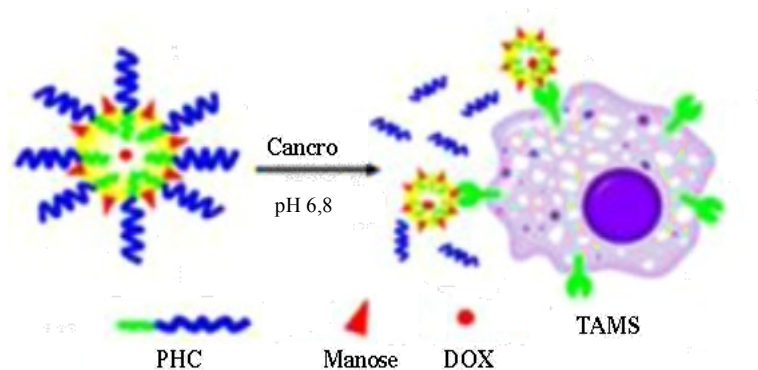


Figura 19: NP PLGA - DOX - PHC - manose (adaptado de Niu *et al.* (2014)).

Em ensaio *in vivo* com ratinhos portadores de melanoma, os autores administraram NPs - DOX - PHC- manose e NPs DOX livre. A massa cancerígena nos ratinhos tratados com NPs - DOX - PHC - manose foi cerca de 50% menor quando comparado com os ratinhos tratados com DOX livre.

III.3.ii.4. Direcionamento específico para a mitocôndria

O direcionamento de fármacos para organelos específicos, como a mitocôndria, é uma estratégia que tem sido explorada pela comunidade científica. A mitocôndria desempenha várias funções cruciais na célula, nomeadamente a produção de energia, a participação nos processos de crescimento celular e cancerígeno e na morte celular programada, com libertação de proteínas pró - apoptóticas para o citosol, induzindo a apoptose (Zhou *et al.*, 2013; Galluzzi and Kroemer, 2008). A permeabilidade da membrana mitocondrial é um processo decisivo para a apoptose. As substâncias presentes na mitocôndria que determinam o aumento da permeabilização da membrana mitocondrial pertencem à família Bcl - 2, subdividindo-se em (Kroemer *et al.*, 2007): moléculas pró - apoptóticas (e.g. Bax, Bid, Bak, Bel-Xs) e moléculas anti - apoptóticas (e.g. Bcl - 2, Bcl - XL, Mcl - 1). Uma vez induzida a permeabilização da membrana mitocondrial, verifica-se a libertação do citocromo C (proteína presente na membrana interna das mitocôndrias) e a ativação das caspases - 3 e 9, conduzindo à apoptose (Figura 20). Além disso, ocorre a supressão da proteína Bcl - 2 anti - apoptótica pelas proteínas Bax e Bid, e as funções bioenergéticas e redox são suspensas, originando o fenómeno da apoptose (Kroemer *et al.*, 2007).

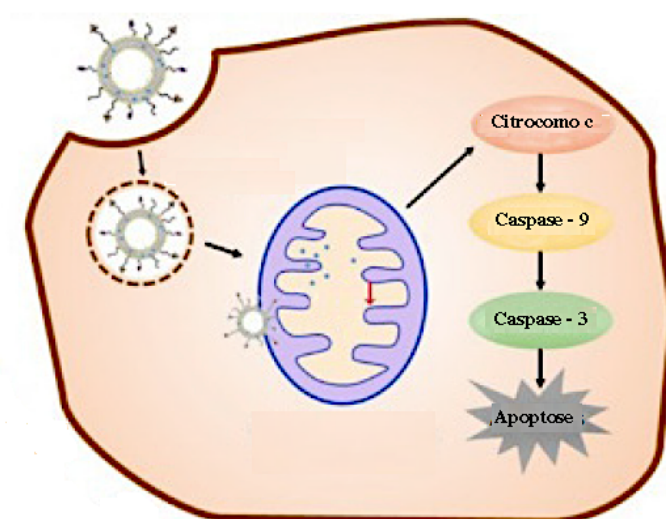


Figura 20: Direcionamento específico das NPs para a mitocôndria (adaptado de Sun *et al.* (2017)).

O direcionamento específico do PTX para a mitocôndria em cancros multirresistentes pode ter vantagens, isto porque, o fármaco pode ligar-se à proteína anti - apoptótica Bcl - 2 da mitocôndria, mudando a sua função para pró - apoptótica, resultando na apoptose das células cancerígenas (Lin *et al.*, 2004).

As mitocôndrias das células cancerígenas apresentam uma diferença de potencial de membrana superior em relação às células normais, uma vez que estas encontram-se carregadas negativamente no seu interior (Wadhwa *et al.*, 2002). Beneficiando desta característica, Zhou *et al.* (2013) combinaram catiões lipófilos com lipossomas. O PTX foi encapsulado nos lipossomas cuja superfície foi modificada com uma molécula com elevada capacidade de penetração celular e direcionamento mitocondrial, o succinato trifenílfosfina de D - α - tocoferil polietilenoglicol (TPGS₁₀₀₀ - TPP, do inglês *D - α - tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate - triphenylphosphine*), para o tratamento do cancro do pulmão resistente ao PTX. A eficácia do nanossistema foi avaliada através de ensaios *in vitro* utilizando células A549 (linha celular de cancro do pulmão), A549 / cDDP (células do cancro do pulmão resistente ao PTX) e células A549 / cDDP xenotransplantado de ratinhos (Zhou *et al.*, 2013). Os autores concluíram que os lipossomas direcionados para a mitocôndria demonstraram uma captação celular superior comparativamente com o PTX livre e os lipossomas não direcionados. A internalização do lipossoma permitiu maximizar o efeito citotóxico nas células do cancro do pulmão.

III.4. Nanossistemas ativados por estímulos

Para aumentar a eficácia do direcionamento e minimizar os efeitos secundários têm sido desenvolvidos nanossistemas que mantêm a sua estrutura intacta durante a circulação e sofrem rápidas mudanças conformacionais e/ou transição de fase quando ativadas pela ação de diferentes estímulos (Kong *et al.*, 2013). Esses estímulos podem ser de três tipos (Cabane *et al.*, 2012): químicos (e.g. pH, redox), físicos (e.g. temperatura, radiação e ultrassons) ou biológicos (e.g. enzimas, recetores).

III.4.i. Estímulo ativado pela luz ou radiação

O tratamento anticancerígeno baseado na estimulação pela luz/radiação permite o controlo mais preciso da libertação de fármacos dos nanossistemas. Estes apresentam na sua composição materiais sensíveis e/ou estimulados por radiação, com capacidade de transformar a energia da radiação em calor (efeito fototérmico) e, desta forma, quando irradiados por radiação UV ou luz visível num local específico, verifica-se a libertação dos fármacos (Piktel *et al.*, 2016).

Chen *et al.* (2017) desenvolveram lipossomas para inibir a síntese do recetor do peptídeo ativador da adenilato - ciclase pituitária (PACAP, do inglês, *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*). Os lipossomas continham lípidos catiónicos e foram carregados com oligonucleótidos antisense. O uso de lípidos catiónicos facilita a penetração nas membranas celulares carregadas negativamente. O recetor celular do PACAP é responsável por alterações intracelulares que modificam o comportamento das células. Este recetor é amplamente expresso por células nervosas, e, além disso, influencia a proliferação, a diferenciação e a maturação da maioria das células, destacando-se pela sua atividade na proliferação das células cancerígenas (Vaudry *et al.*, 2009). Os lipossomas continham também, na sua bicamada lipídica, a verteporfina, um composto fotodinâmico. Após o processo de endocitose, o nanossistema fica aprisionado nos endossomas e lisossomas (Bareford and Swaan, 2007). Quando se faz incidir luz ou radiação no nanossistema, a verteporfina produz uma quantidade suficiente de ROS que destabilizam as membranas dos endossomas e lipossomas, com conseqüente libertação do conteúdo dos lipossomas (i.e. oligonucleótidos). Os oligonucleótidos antisense são libertados para o citoplasma e silenciam o ácido ribonucleico mensageiro (mRNA, do inglês, *Messenger ribonucleic acid*) do PAC1R (recetor da PACAP). A Figura 21 esquematiza o mecanismo

de libertação dos oligonucleótidos antisense e a inibição do mRNA do recetor da PACAP. Nos ensaios *in vitro*, os autores usaram células PC 12 (linha celular derivada de feocitoma da medula adrenal do rato), as quais expressam apenas o PAC1R, permitindo avaliar o impacto do silenciamento do nanossistema. Os autores concluíram que a expressão do recetor de PACAP foi reduzida em 74% (Chen *et al.*, 2017).

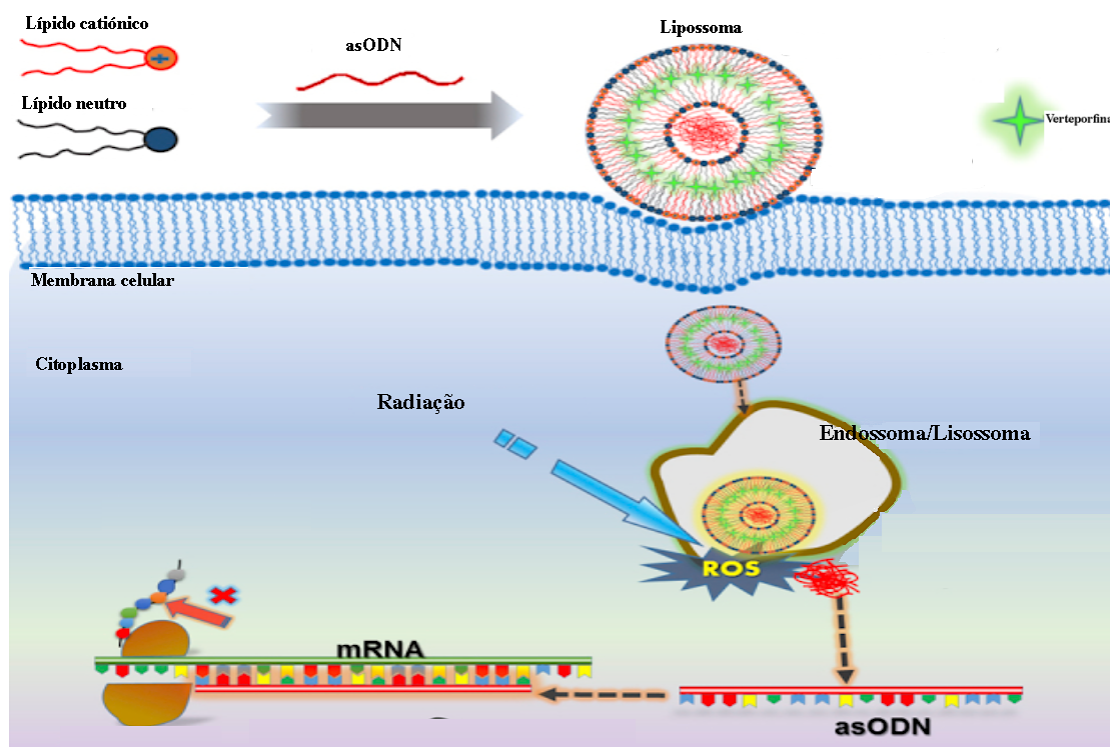


Figura 21: Mecanismo de libertação do oligonucleótidos antisense e inibição do mRNA (adaptado de Chen *et al.* (2017)).

III.4.ii. Estímulo ativado pelo aumento de temperatura

Quando se desenvolve um nanossistema termossensível é importante projetá-lo para que seja estável à temperatura corporal e liberte o fármaco no local de ação quando submetido a temperaturas elevadas, ou seja, em zonas de hipertermia (com temperaturas compreendidas entre 40 - 42°C) (May and Li, 2013). A aplicação da hipertermia, após administração de nanossistemas sensíveis à temperatura, é uma estratégia de direcionamento explorada para a libertação de fármacos antineoplásicos (Needham *et al.*, 2000).

A aplicação de hipertermia em cancros mais profundos ainda é limitada, restringindo-se apenas no tratamento do cancro de pele, cancro da mama e alguns cancros de cabeça e pescoço (Jose *et al.*, 2019; Szmigielski *et al.*, 1988).

Jose *et al.* (2019) desenvolveram lipossomas sensíveis à temperatura incorporando tamoxifeno e imatinib. Habitualmente, os lipossomas são preparados utilizando lípidos com temperaturas de transição de fase na ordem dos 37° C. Neste estudo, os lipossomas apresentaram na sua composição uma combinação de fosfolípidos 1, 2 - dipalmitoil - glicerina - 3 - fosfocolina e monopalmitoil - 2 - hidroxil - sn - glicero - 3 - fosfocolina, com temperatura de transição acima da temperatura fisiológica - 39° C. Com esta estratégia, é possível modular e controlar a libertação do fármaco nas células cancerígenas. O tamoxifeno é um modelador seletivo dos recetores de estrogénios no cancro da mama, recetor estrogénio positivo, atuando como agente anti - estrogénio. Este composto inibe seletivamente a ligação dos estrogénios aos seus recetores. É o fármaco antineoplásico mais usado no tratamento do cancro da mama, apresentando resultados satisfatórios com efeitos secundários reduzidos (Shagufta and Ahmad, 2018; Shiau *et al.*, 1998). O imatinib é fármaco antineoplásico usado em monoterapia ou em combinação com outros fármacos. O imatinib atua bloqueando a tirosina quinase. A tirosina quinase é uma proteína celular, que atua como mensageiro químico, no sentido de sinalizar/estimular outras células vizinhas para proliferarem (Kadivar *et al.*, 2017). Utilizando a formulação lipossomal desenvolvida, Jose e colaboradores (2019) realizaram ensaios de libertação utilizando duas condições térmicas diferentes. Tendo como referência a temperatura de transição de fase dos lipossomas, estes foram submetidos a temperaturas < 35° C e > 40° C. O objetivo foi verificar a influência da temperatura na libertação dos fármacos. Os autores verificaram que a temperaturas < 35° C a quantidade de tamoxifeno libertado foi cerca de 30% menor. Com temperaturas > 40° C, verificou-se um aumento de libertação do tamoxifeno de 80 % e 98 % ao fim de 30 minutos e 4 horas, após a administração. Em relação ao imatinib, no ensaio realizado com temperaturas < 35° C libertou-se cerca de 43% e, com temperaturas > 40° C, libertou cerca de 80 % e 99 % após 30 minutos e 4 horas após a administração. Da mesma forma, os lipossomas que incorporavam simultaneamente tamoxifeno e imatinib demonstraram uma velocidade de libertação maior no ensaio com temperaturas > 40° C. Não se verificou alterações estatisticamente significativas no perfil de libertação dos fármacos carregados isoladamente ou em associação.

Para além da sua aplicação em diagnóstico, os nanossistemas magnéticos têm sido explorados no tratamento do cancro, após a sua ativação pelo aumento da temperatura (Shah *et al.*, 2016). As nanopartículas magnéticas (mNPs, do inglês *Magnetic nanoparticles*) podem ser constituídas por diversos compostos, como níquel, ferro, cobalto e os seus óxidos. As NPs de Fe_3O_4 são consideradas bastante promissoras, por possuírem excelentes propriedades magnéticas (Shah *et al.*, 2016). Porém, a presença do ferro pode induzir efeitos prejudiciais nos sistemas biológicos (i.e. células saudáveis) (Raynal *et al.*, 2004). Apesar de muitos materiais inorgânicos terem sido estudados, Ansar *et al.* (2012) sugerem a hidroxiapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, do inglês *Hydroxyapatite*), como o material mais adequado para o revestimento das mNPs, devido à sua excelente biocompatibilidade. A utilização de certos polímeros, como o PEG e o álcool polivinílico, estão desaconselhadas porque estes compostos podem dissolverem-se facilmente, como consequência das alterações de pH e da temperatura no local alvo (Raynal *et al.*, 2004).

Recorrendo a um campo magnético, é possível controlar a acumulação das mNPs junto das células cancerígenas. Para tal, as mNPs devem apresentar uma magnetização elevada e responder aos estímulos magnéticos (Mahmoudi *et al.*, 2011; Willard *et al.*, 2004). Após a acumulação de fármaco junto das células cancerígenas, para promover a libertação do agente antineoplásico recorre-se à hipertermia magnética. As mNPs quando expostas a campos magnéticos alternados, a partir da energia eletromagnética aplicada, produzem calor na ordem dos 45 - 47° C, promovendo a libertação do fármaco do nanossistema (Mahmoudi *et al.*, 2011; Hilger *et al.*, 2002). As NPs de Fe_3O_4 geram calor em resposta ao campo magnético externo e, após a remoção do campo magnético, não retêm nenhum magnetismo (Cho *et al.*, 2017).

Mondal *et al.* (2017) desenvolveram mNPs de Fe_3O_4 revestidas por $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$. Nos ensaios *in vitro*, as células MG - 63 (linha celular de osteossarcoma) foram incubadas com mNPs com capacidade de produzir calor pela aplicação de campo magnético alternado. O ensaio de hipertermia das mNPs iniciou com uma temperatura de 25° C, decorrido 3 minutos, a temperatura atingiu os 42° C. Quando a temperatura atingiu os 47° C, a máquina desligou-se automaticamente para manter a temperatura no intervalo entre os 42° C e os 47° C. Após o tratamento com hipertermia, os autores verificaram que as células encontravam-se em fase necrótica devido à formação de ROS por efeito do calor gerado pela hipertermia magnética.

III.4.iii. Estímulo ativado pelo pH

Os diversos órgãos, tecidos e células são caracterizados por terem valores de pH diferentes. Os tecidos cancerígenos apresentam um microambiente ácido (pH 6,8 - 7,2) em comparação com os tecidos saudáveis (pH 7,4 - 7,5), enquanto que as vesículas endocíticas são caracterizadas por terem um pH ácido (pH 5,0 - 6,0) (Yin *et al.*, 2013). As células cancerígenas proliferam de uma forma descontrolada e extremamente rápida, necessitando de um maior aporte de nutrientes e oxigénio. No entanto, a vasculatura não consegue acompanhar o crescimento abrupto, verificando-se carências nutricionais e de oxigénio. A hipoxia no microambiente cancerígeno promove a glicólise em condições aeróbias e anaeróbias, gerando ácido láctico e protões (H^+), contribuindo para a acidificação do microambiente (Ganta *et al.*, 2008). A variação de pH pode ser utilizada para direcionar nanossistemas para um determinado tecido, célula ou órgão.

O desenvolvimento de lipossomas que manifestem propriedades de libertação do fármaco em resposta a variações do pH é feito a partir da modelação da composição do lipossoma (Hafez *et al.*, 2000). Chen *et al.* (2019) incorporaram CUR em lipossomas contendo carbonato de cálcio (Ca_2CO_3) com sensibilidade ao pH ácido, para tratamento do cancro do cólon (Figura 22). A superfície dos lipossomas foi modificada com 1, 2 - distearoil - sn - glicero - 3 - fosfoetanolamina - N - [amino (polietilenoglicol 2000)] (DSPE - PEG₂₀₀₀ do inglês, *1, 2 - distearoyl - sn - glycerol - 3 - phosphoethanolamine - N - [amino (polyethylene glycol 2000)]*), para aumentar o tempo de circulação do nanossistema.

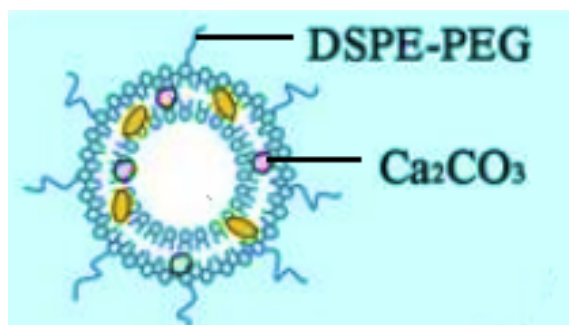


Figura 22: Lipossoma incorporando Ca_2CO_3 e CUR (adaptado de Chen *et al.* (2019)).

O Ca_2CO_3 , quando se encontra num ambiente ácido (e.g. endossoma, lisossoma), dissocia-se, promovendo a destabilização da bicamada lipídica do lipossoma. Além disso, resultante da dissociação do Ca_2CO_3 liberta-se uma quantidade apreciável de iões Ca^{2+} ,

provocando um aumento da pressão osmótica do lisossoma e a sua lise. Em ensaios *in vitro*, as células HCT - 116 (linha celular do carcinoma do cólon humano) foram incubadas com CUR na forma livre, lipossomas com CUR e lipossomas incorporando CUR e Ca₂CO₃. A CUR na forma livre apresentou uma permeação celular reduzida. Por outro lado, os nanossistemas foram internalizados possibilitando a ligação da CUR a alvos intracelulares. Contudo, os lipossomas que incorporavam Ca₂CO₃ apresentaram uma diferença estatisticamente significativa. Nos ensaios *in vivo* com ratinhos administrou-se CUR na forma livre, lipossomas com CUR, lipossomas com CUR e Ca₂CO₃. Ao grupo controlo apenas foi administrado glicose 5 %. Os autores verificaram que nos ratinhos tratados com lipossomas com CUR, o volume do cancro do cólon foi 1,6 vezes superior ao tamanho no grupo de ratinhos tratado com lipossomas sensíveis a pH ácido. Desta forma, a citotoxicidade da CUR e a incorporação de Ca₂CO₃ nos lipossomas promoveram uma resposta do nanossistema ao pH ácido do meio, maximizando o efeito citotóxico da CUR (Chen *et al.*, 2019).

II.4.iv. Estímulo ativado pelas condições redox

As células saudáveis são caracterizadas por possuírem uma concentração de GSH superior (2 - 10 mM) em comparação com o meio extracelular (2 - 20 µM) (Schafer and Buettner, 2001). Além da natureza redutora do meio intracelular da célula saudável, a célula cancerígena é caracterizada por possuir concentrações de GSH quatro vezes superior (Balendiran *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2003). Considerando as elevadas concentrações de GSH, alguns investigadores têm desenvolvido nanossistemas incorporando ligandos dissulfureto que, posteriormente, são clivados na presença de GSH. A libertação do fármaco ocorre quando se verifica o comprometimento e, posterior, destabilização do nanossistema (Raza *et al.*, 2018; Kang *et al.*, 2017).

Tian *et al.* (2016) sintetizaram lipossomas que incorporaram a DOX. A superfície do lipossoma foi alterada com heparina de baixo peso molecular (LMWH, do inglês *Low molecular weight heparin*) e ligandos dissulfureto (Figura 23). A expressão da heparinase está diretamente relacionada com a metástase cancerígena, sendo esta enzima altamente expressa nos cancros com capacidade para metastizar. Desta forma, a inibição eficaz da expressão da heparinase, pela LMWH, é importante para atenuar a metástases do cancro (Tian *et al.*, 2016; Vlodaysky *et al.*, 2007).

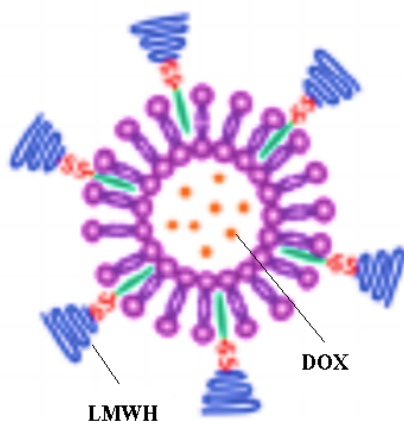


Figura 23: Lipossoma - DOX - ss - LMWH (adaptado de Tian *et al.* (2016)).

A LMWH é um anticoagulante usado na prática clínica. A sua administração em doentes com cancro tem melhorado a taxa de sobrevivência destes (Kakkar *et al.*, 2004; Cosgrove *et al.*, 2002). Em ensaios *in vitro* com células B16 - F10 (linha celular de melanoma pulmonar murino, com elevada capacidade de metastizar), os autores verificaram que a citotoxicidade dos lipossomas sensível a condições redox (Lipossoma - DOX - ss - LMWH) foi superior à do lipossoma não sensível à redução. Este resultado deve-se à endocitose mediada pela LMWH e à presença de GSH nas células cancerígenas. Estas condições facilitam a desagregação da LMWH, promovendo a libertação rápida de DOX no citoplasma (Figura 24) (Tian *et al.*, 2016).

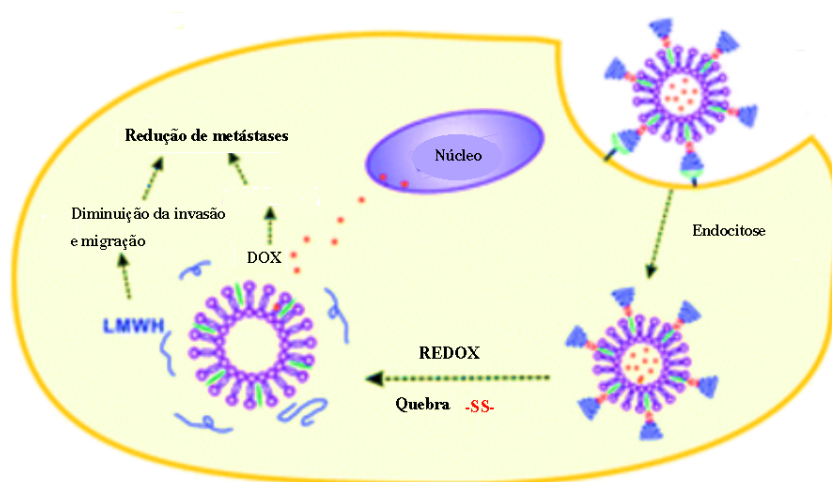


Figura 24: Internalização do lipossoma na célula por endocitose e inibição da metastização (adaptado de Tian *et al.* (2016)).

Em ensaios *in vivo*, após 21 dias de tratamento, os pulmões dos ratinhos foram retirados e avaliou-se o seu peso. Quanto maior o peso do pulmão maior será as metástases do

cancro. Pela análise dos resultados (Figura 25) verifica-se que, no grupo de ratinhos em que foi administrado o lipossoma - DOX - ss – LMWH, o peso médio dos pulmões é significativamente inferior ao grupo em que foi administrado uma solução salina (i.e. grupo controlo). Os autores concluíram que o nanossistema desenvolvido revelou-se sensível às condições redox, diminuindo a propensão da célula para metastizar.

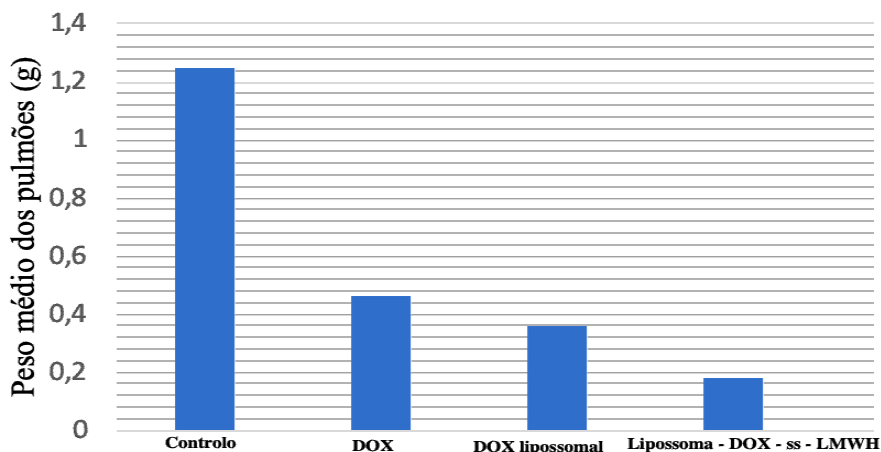


Figura 25: Peso médio dos pulmões dos ratinhos tratados com DOX, Dox lipossomal e lipossoma - DOX - ss – LMWH (adaptado de Tian *et al.* (2016)).

A toxicidade sanguínea foi avaliada pela análise das células sanguíneas. Os autores verificaram que o número de eritrócitos, leucócitos e plaquetas não apresentou diferenças significativas comparado com o grupo controlo (administrado solução salina), indicando a ausência de toxicidade sanguínea da LMWH.

III.4.v. Estímulos ativado por ultrassons

Os ultrassons são ondas com frequência acima do limite audível (20 kHz) (Cullion *et al.*, 2018). Os ultrassons de baixa intensidade têm sido usados para libertar fármacos antineoplásicos dos nanossistemas nas células cancerígenas. A profundidade de penetração é facilmente regulada pela modulação da frequência e do tempo de exposição (Wood and Sehgal, 2015; Nomikou *et al.*, 2010).

Contudo, não sendo uma estratégia específica para células cancerígenas, a presença de nanossistemas com fármacos antineoplásicos em tecidos saudáveis pode conduzir a um aumento dos efeitos secundários, carecendo de cuidado durante a sua aplicação (Nomikou *et al.*, 2010).

Wang *et al.* (2018) desenvolveram lipossomas incorporando DOX e porfirina, conforme ilustrado na Figura 26.

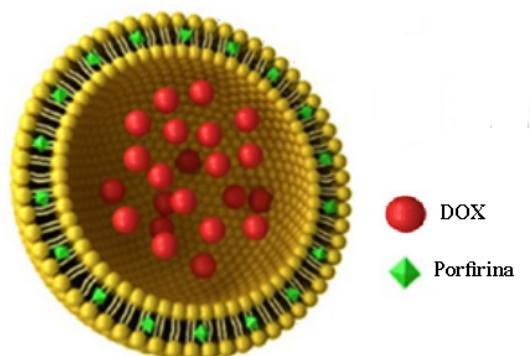


Figura 26: Lipossoma incorporando DOX e porfirina (adaptado de Wang *et al.* (2018)).

A porfirina é um composto aprovado pela FDA (Cullion *et al.*, 2018) e é sonossensibilizador (Kuroki *et al.*, 2007). A irradiação por ultrassons induz a cavitação em torno da célula cancerígena, podendo produzir sonoluminescência, ocorrendo a estimulação do sonossensibilizador - estado excitado. Ao voltar para o estado fundamental, a energia libertada pode originar ROS. Estes produtos reagem com os lípidos da membrana do lipossoma, induzindo a peroxidação lipídica e promovem a libertação do fármaco (Figura 27) (Kuroki *et al.*, 2007).

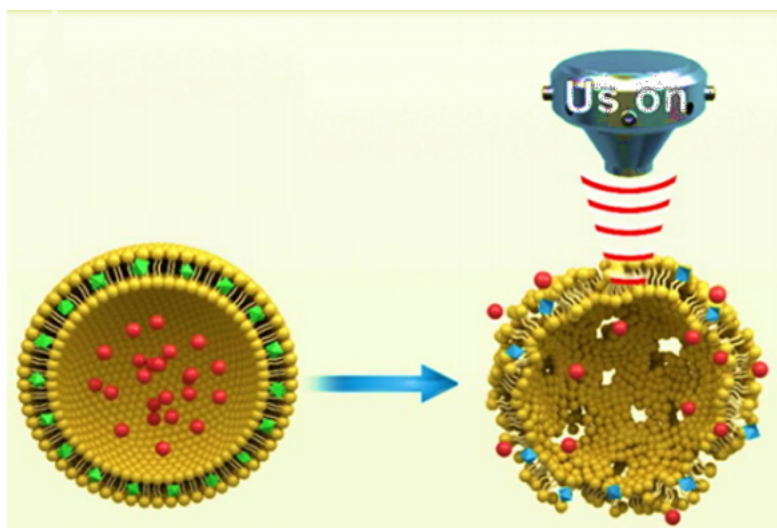


Figura 27: Libertação da DOX por ação de ultrassons (adaptado de Wang *et al.* (2018)).

Foram realizados ensaios *in vivo* em ratinhos xenotransplantados com células de glioblastoma humano (linha celular U87). Para avaliação do efeito antineoplásico administrou-se lipossomas incorporando DOX e porfirina, DOX livre e lipossoma apenas

com DOX. Os lipossomas com DOX e a DOX livre não apresentaram inibição cancerígena significativa comparado com o grupo controlo (solução salina). O mesmo não aconteceu com os lipossomas conjugado com a porfirina. Quando se fez incidir os ultrassons, o nanossistema desintegrou-se por ação de peroxidação lipídica e libertou a DOX, conforme ilustrado na Figura 27 (Wang *et al.*, 2018).

Um outro estudo envolvendo ultrassons foi apresentado por Zhang *et al.* (2019). Os autores desenvolveram NPs poliméricas de PLGA, incorporando DOX e NaHCO₃, sensível ao pH e ativado por ultrassons, com o objetivo de maximizar o efeito terapêutico e diminuir os efeitos secundários da DOX (Figura 28). O intuito de associar o NaHCO₃ às NPs é produzir CO₂. O CO₂ forma-se a partir do bicarbonato de sódio, quando inserido num meio ligeiramente ácido – i.e. microambiente cancerígeno. O CO₂ destabiliza a membrana das NPs, verificando-se a libertação do fármaco.

Foram realizados testes *in vitro*, incubando células MCF - 7 com DOX na forma livre; NPs PLGA - DOX - NaHCO₃; NPs PLGA incorporando DOX; e NPs PLGA incorporando DOX combinado com ultrassons. Os autores verificaram que a inibição do crescimento anticancerígeno das células incubadas com NPs DOX - NaHCO₃ era superior às NPs sem NaHCO₃ e a DOX na forma livre. O NaHCO₃ contribui para o aumento da sensibilidade do nanossistema, permitindo aumentar a libertação da DOX nas células cancerígenas. Além disso, quando se associou as NPs DOX - NaHCO₃ aos ultrassons verificou-se o aumento do efeito antineoplásico pela libertação mais eficaz do fármaco por parte do nanossistema, indicando que a combinação do nanossistema com ultrassons é vantajoso. Nos ensaios *in vivo*, realizados com ratinhos inoculados com células S180 (linha celular do sarcoma murino), confirmou-se os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* (Figura 28). O efeito antineoplásico, nos ratinhos que foram submetidos a ultrassons as com NPs DOX - NaHCO₃, foi superior comparado com as restantes formulações, confirmando-se, mais uma vez, o benefício dos ultrassons associado ao NaHCO₃, com diminuição dos efeitos secundários associados à DOX (Zhang *et al.*, 2019).

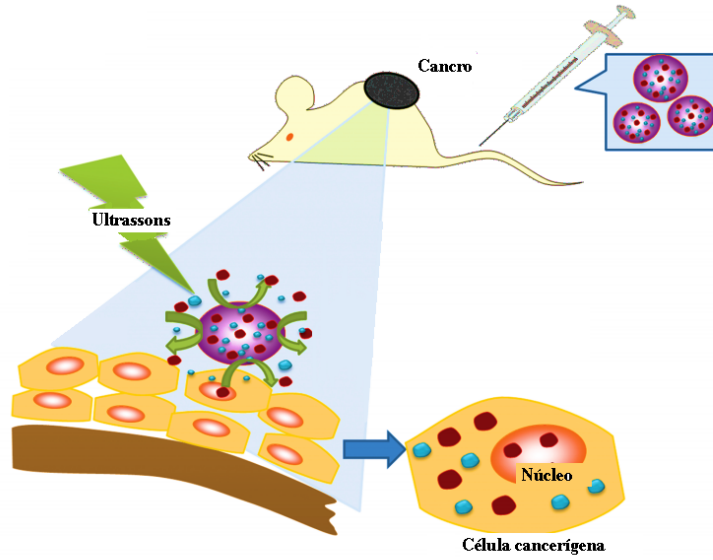


Figura 28: Libertação da DOX por ação dos ultrassons e NaHCO_3 (adaptado de Zhang *et al.* (2019)).

IV. Estratégias terapêuticas hifenizadas

A nanotecnologia dispõe de diversos nanossistemas sofisticados para o tratamento do cancro. Cada vez mais se constata que o futuro passará pela aplicação de terapêuticas combinadas para ultrapassar as resistências das células cancerígenas aos fármacos antineoplásicos. A combinação da quimioterapia com outras terapias (e.g. fototerapia, terapia génica) permite obter um sinergismo no tratamento do cancro (Deda and Araki, 2015).

IV.1. Agente quimioterápico e fototerapia

A terapia fotodinâmica tem sido aplicada no tratamento de diversos tipos de cancro, combinando a radiação com fotossensibilizadores. Além de ser um processo pouco invasivo, os fotossensibilizadores apresentam uma toxicidade reduzida. Esta estratégia baseia-se na formação de ROS que danificam as membranas plasmáticas e o DNA, conduzindo à morte da célula cancerígena (Jukupli and Bagheri, 2016).

A terapia fototérmica deriva da terapia fotodinâmica. Nesta estratégia recorre-se ao infravermelho para induzir calor e aumentar a temperatura num processo independente do oxigénio. A aplicação de infravermelhos com comprimento de onda maiores torna esta radiação menos prejudicial para as células/tecidos saudáveis (Piktel *et al.*, 2016).

Tran *et al.* (2015) desenvolveram nanossistemas utilizando óxido de grafeno associado à DOX e ao irinotecano, estabilizado com o poloxâmero 188 (Figura 29).

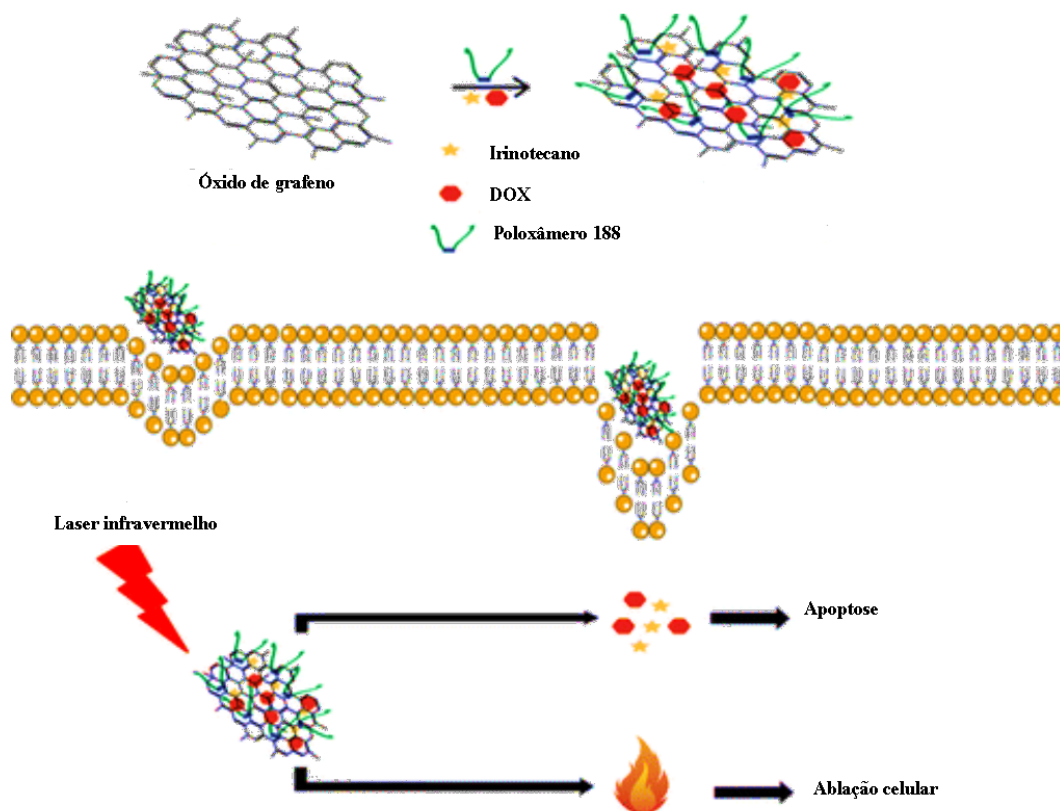


Figura 29: Nanossistema de óxido de grafeno carregado com DOX, irinotecano e poloxâmero 188 (adaptado de Tran *et al.* (2015)).

O poloxâmero188 é um copolímero termosensível formado por cadeias hidrófilas. A natureza hidrófila deste composto permite aumentar a estabilidade do nanossistema no fluido fisiológico e o tempo de circulação, facilitando o EPR. Além disso, o poloxâmero 188 tem a capacidade de inibir a ação dos transportadores de efluxo presentes na superfície das células cancerígenas, diminuindo as resistências e aumentando o efeito citotóxico do fármaco. O poloxâmero 188, quando irradiado com laser infravermelho, gera calor e facilita a permeação do nanossistema nas células cancerígenas (Yan *et al.*, 2010). O irinotecano pertence ao grupo dos inibidores da topoisomerase I. Este composto está indicado no tratamento do cancro do pulmão, do colo do útero e dos ovários (Seo *et al.*, 2008; Rothenberg, 2001). A coadministração da DOX e do irinotecano resultou num efeito sinérgico, visto que ambos interferiram negativamente na síntese do DNA, através de inibição da topoisomerase I e II pelo irinotecano e pela DOX, respetivamente (Ramamy *et al.*, 2015). Os nanossistemas desenvolvidos por Tran *et al.* (2015), foram testadas *in vitro*, com linha celulares MCF - 7, MDA - MB – 231. Os autores verificaram que a irradiação com laser causou uma maior citotoxicidade quando comparada com a

quimioterapia ou o tratamento fototérmico quando usados isoladamente, principalmente em células do cancro da mama resistente - MDA - MB - 231. A citotoxicidade confirmou-se pela ativação da via da apoptose intrínseca, com a mudança na morfologia dos núcleos celulares e o aumento da expressão das proteínas relacionadas com a apoptose em comparação com o grupo controlo.

IV.2. Terapia génica e agente quimioterápico

A terapia génica pode-se aliar à nanotecnologia e utilizar nanossistemas como vetores génicos. Os nanossistemas carregadas com informação genética podem ser aplicadas em diferentes estratégias (i.e. introdução de novos genes, substituição de genes supressores do cancro mutados). O gene, codificado na forma de oligonucleótido, pode estimular/induzir a expressão de proteínas nas células cancerígenas. Da mesma forma, também é possível suprimir/inibir a expressão de proteínas com oligonucleótidos antisense ou RNA de interferência (siRNA, do inglês, *small interfering RNA*) (Arun Kumar, 2013). Zhang *et al.* (2017) desenvolveram uma micela polimérica com DOX e siRNA (Figura 30), com o objetivo de suprimir a expressão da P - gp.

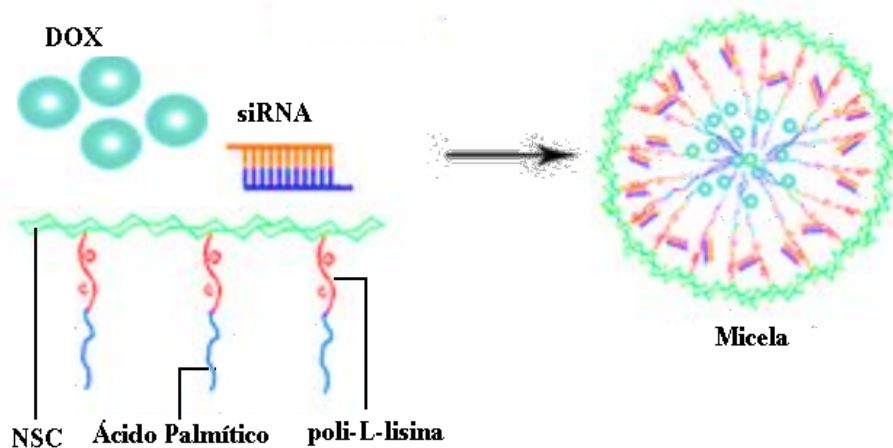


Figura 30: Micela polimérica incorporando DOX e siRNA (adaptado de Zhang *et al.* (2016)).

Zhang *et al.* (2017) reportaram que cerca de 40 - 50% dos doentes com cancro dos ovários apresentam à superfície das células cancerígenas uma elevada expressão da P - gp. Conforme descrito anteriormente, a P-gp é um transportador de efluxo e, como tal, desempenha um papel ativo na diminuição da eficácia dos fármacos e no

desenvolvimento de multirresistências. A supressão do gene MDR - 1 conduz à redução da expressão da P - gp e, conseqüentemente, à diminuição da resistência das células cancerígenas. Uma estratégia para suprimir a expressão do gene MDR - 1 consiste na administração de siRNA (Meng *et al.*, 2010). Contudo, a administração de siRNA isoladamente apresenta uma estabilidade reduzida e uma absorção celular limitada (Babu *et al.*, 2016). Para ultrapassar estes inconvenientes, o siRNA tem sido incorporado em nanossistemas com fármacos antineoplásicos, diminuindo a sua degradação e eliminação renal (Aliabadi *et al.*, 2012; Singha *et al.*, 2011). O siRNA corresponde a moléculas sintéticas constituídas por uma dupla cadeia de RNA que atuam por emparelhamento com complementaridade com cadeias de RNA mensageiro, conduzindo à sua degradação e silenciamento do gene. Conseqüentemente, a proteína não é sintetizada (Morris *et al.*, 2004).

A micela polimérica desenvolvida por Zhang *et al.* (2016) continha N - succinil quitosano (NSC, do inglês *N - succinyl chitosan*), ácido palmítico e poli - L - lisina, incorporando a DOX e o siRNA. A poli - L - lisina é uma molécula carregada positivamente, permitindo uma ligação eletrostática com o siRNA, carregado negativamente. O NSC foi desenvolvido com o intuito de aumentar o tempo de semivida da micela e diminuir a toxicidade da poli - L - lisina. O ácido palmítico, com características hidrófobas, encapsulou a DOX, no núcleo. Esta micela foi desenvolvida para suprimir a expressão da P - gp, superar as resistências das células cancerígenas e obter um efeito sinérgico da administração da DOX e do siRNA (Zhang *et al.*, 2016). Foram usados ratinhos inoculados com células HepG 2 (cancro de fígado humano) para avaliar a citotoxicidade. Os autores concluíram que a administração de micelas com DOX não apresentou um aumento significativo na supressão do cancro em comparação com o tratamento com DOX livre. No grupo tratado com o nanossistema incorporando siRNA e DOX, verificou-se uma diminuição da expressão da P - gp e um aumento do efeito antineoplásico da DOX.

IV.3.Teranóstico

A nanomedicina teranóstica é uma abordagem multifuncional que recorre a materiais nanotecnológicos para organizar um sistema integrado de nanoterapia com a capacidade de diagnosticar, direcionar e transportar o fármaco e, ao mesmo tempo, monitorizar, em tempo real, a resposta à terapia instituída (Seleci *et al.*, 2017).

O teranóstico permite adaptar a terapêutica a cada doente, desenvolvendo um tratamento personalizado. Os nanossistemas utilizados no teranóstico podem ser de diversos materiais (e.g. metais, polímeros sintéticos, lípidos). As NPs de Fe_3O_4 são um exemplo de NPs usados na deteção de cancro através da ressonância magnética e da deteção ótica (e.g. fluorescência e luminescência) (Sharma *et al.*, 2017; Seleci *et al.*, 2017). Também os lipossomas podem ser usados para veicular um fármaco e/ou um agente de contraste para tratamento e diagnóstico (Friberg and Nystrom, 2015).

Conforme referido anteriormente, as NPs de Fe_3O_4 são usadas como sondas de imagem altamente sensíveis para fornecer contraste na ressonância magnética mas também podem veicular fármacos antineoplásicos. Santra *et al.* (2009) desenvolveram NPs de Fe_3O_4 encapsulando PTX e o corante NIR (com propriedades fluorescentes), modificando a sua superfície com ácido fólico para o direcionamento ativo. Com este nanossistema é possível direcionar o fármaco para as células cancerígenas que expressem o recetor folato e monitorizar a libertação e a eficácia do fármaco pela avaliação das propriedades óticas (fluorescência) e magnéticas. Em ensaios *in vitro* com células A549 (linha celular de cancro do pulmão) e H9c2 (linha de células de ventrículos de ratinhos), os autores concluíram que ambos os grupos de células incubados com o nanossistema sem PTX demonstraram uma citotoxicidade reduzida, cerca de 3 %. Por outro lado, na incubação das células A549, que expressam o recetor de folato, com o nanossistema incorporando PTX, verificou-se uma redução de 80 % na viabilidade celular. O mesmo não ocorreu com as células H9c2, porque estas não expressam o recetor folato (Santra *et al.*, 2009).

Seleci *et al.* (2017) desenvolveram lipossomas teranósticos incorporando QDs e topotecano (Figura 31). Os QDs têm elevada estabilidade fotoquímica e biológica e emitem fluorescência. Contudo, conforme referido anteriormente, a toxicidade dos materiais pesados é uma limitação, daí a aplicação biológica dos QDs de forma isolada estar desaconselhada (Lovric *et al.*, 2005). Porém, ao serem inseridos nos lipossomas (bicamada lipídica) aumentam a biocompatibilidade, estabilidade e hidrofília (Seleci *et al.*, 2017). O topotecano é um fármaco hidrófilo com capacidade para inibir a topoisomerase I, sendo bastante efetivo no tratamento do cancro do pulmão, cancro cervical e ovário (Chen *et al.*, 2016; Grahn *et al.*, 2009). Contudo, o topotecano é instável em condições fisiológicas, podendo esta limitação ser contornada pela sua encapsulação.

Os QDs, por serem hidrófobos, foram incorporados na membrana lipídica do lipossoma, mas mantêm as características de fluorescência.

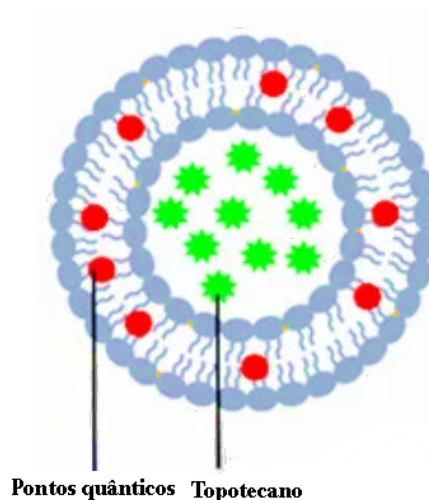


Figura 31: Lipossoma incorporando topotecano e QDs (adaptado de Seleci *et al.* (2017)).

Em ensaios *in vitro* com células HeLa (linha de células do cancro do colo do útero humano), os autores verificaram que o ambiente ácido aumentou a libertação do topotecano, verificando-se uma libertação de 45 % a pH 5,6 e de 39 % a pH 7,4. Nestas células, a citotoxicidade do topotecano incorporado no lipossoma foi superior quando comparada com a induzida pelo topotecano na forma livre. A diferença resulta dos mecanismos envolvidos na entrada do fármaco/nanossistema na célula. No caso do fármaco na forma livre, o composto entra por difusão passiva, enquanto que os lipossomas entram por endocitose. Por outro lado, o topotecano é instável em condições fisiológicas e sofre um processo de hidrólise, reduzindo a sua atividade antineoplásica. Os QDs possibilitaram a monitorização por fluorescência. Os espectros de fluorescência foram examinados e fotografados utilizando um espectrofluorímetro e um microscópio de fluorescência (Seleci *et al.*, 2017).

V. Conclusão

O aumento de número de doentes com cancro e as limitações das terapias convencionais abrem caminho para o desenvolvimento e a aplicação de alternativas terapêuticas. É imprescindível desenvolver tratamentos mais seletivos e direcionados minimizando a toxicidade sistémica e os efeitos secundários. A aplicação da nanotecnologia no cancro permite projetar novas estratégias, apresentando nanossistemas multifuncionais com vantagens.

Os nanossistemas comercializados não incorporam necessariamente fármacos inovadores. Estes apresentam novas formas de administração e veiculação de agentes terapêuticos, em que o seu efeito terapêutico já se encontra descrito.

Os nanossistemas multifuncionais permitem a encapsulação de agentes farmacológicos, compostos bioativos ou co-adjuvantes e, além disso, possibilitam a alteração da sua superfície, permitindo aumentar o tempo de circulação e o desenvolvimento de estratégias direcionadas. Além disso, este tipo de nanossistemas permitem modular a libertação dos agentes antineoplásicos e melhorar o direcionamento para as células cancerígenas. A libertação pode estar dependente de estímulos, como a luz/radiação, pH, temperatura, condições redox e ultrassons. Outra forma de maximizar a eficácia do tratamento passa por combinar a quimioterapia com a fototerapia e terapia génica.

Apesar da maioria das estratégias apresentadas nesta dissertação se manifestarem promissoras, é pertinente realizar mais ensaios para avaliar a potencial toxicidade e o risco - benefício decorrentes da aplicação clínica dos nanossistemas a longo prazo. A longa permanência no organismo humano, de certo modo é desejável para obter a eficácia terapêutica. Contudo, pode despoletar consequências até agora desconhecidas. Além disso, seria pertinente o desenvolvimento de ensaios *ex vivo* com os nanossistemas estudados *in vitro* e *in vivo* de forma a obter os resultados efetivos no organismo humano. Apesar das linhas celulares e os modelos animais usados constituírem uma aproximação da fisiologia humana, não permite extrapolar com exatidão os resultados.

Num futuro próximo pretende-se uma crescente aplicação da nanomedicina teranóstica. Conforme descrito, é uma estratégia que combina o diagnóstico com a terapêutica antineoplásica, através de nanossistemas multifuncionais para o transporte de fármacos

antineoplásicos e agentes de imagiologia, que além do efeito anticancerígeno permite monitorizar em tempo real a libertação do agente anticancerígeno sem recorrer a métodos invasivos.

Das estratégias apresentadas a que considero mais promissora é o teranóstico porque possibilita o direcionamento do nanossistema para o local alvo e ao mesmo tempo a sua monitorização, em tempo real, da eficácia terapêutica.

VI. Referências

- Aggarwal, B. B. (2004). Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell*, 6, pp. 203-8.
- Aggarwal, B. B. and Harikumar, K. B. (2009). Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol*, 41, pp. 40-59.
- Ahmad, J., Akhter, S., Rizwanullah, M., *et al.* (2015). Nanotechnology-based inhalation treatments for lung cancer: state of the art. *Nanotechnol Sci Appl*, 8, pp. 55-66.
- Aliabadi, H. M., Landry, B., Sun, C., *et al.* (2012). Supramolecular assemblies in functional siRNA delivery: where do we stand? *Biomaterials*, 33, pp. 2546-69.
- Allavena, P. and Mantovani, A. (2012). Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clin Exp Immunol*, 167, pp. 195-205.
- Allen, T. M., Hansen, C. B. and de Menezes, D. E. L. (1995). Pharmacokinetics of long-circulating liposomes. *Adv Drug Deliv Rev*, 16, pp. 267-84.
- Almeida, J. P., Figueroa, E. R. and Drezek, R. A. (2014). Gold nanoparticle mediated cancer immunotherapy. *Nanomedicine*, 10, pp. 503-14.
- Alok, A., Panat, S., Aggarwal, A., *et al.* (2013). Nanotechnology: A boon in oral cancer diagnosis and therapeutics. *J Research in Dental Sci*, 4, pp. 154-60.
- Ansar, E. B., Ajeesh, M., Yokogawa, Y., *et al.* (2012). Synthesis and Characterization of Iron Oxide Embedded Hydroxyapatite Bioceramics. *J of the American Ceramic Society*, 95, pp. 2695-99.
- Arun Kumar, H. M. M., Adam Friedman, Eric R. Blough (2013). *Nanomedicine in Drug Delivery*, 1, pp. 4-213.

Ashley, C. E., Carnes, E. C., Phillips, G. K., *et al.* (2011). The targeted delivery of multicomponent cargos to cancer cells by nanoporous particle-supported lipid bilayers. *Nature Materials*, 10, pp. 389.

Babu, A., Muralidharan, R., Amreddy, N., *et al.* (2016). Nanoparticles for siRNA-Based Gene Silencing in Tumor Therapy. *IEEE Trans Nanobioscience*, 15, pp. 849-63.

Baek, J. S. and Cho, C. W. (2017). A multifunctional lipid nanoparticle for co-delivery of paclitaxel and curcumin for targeted delivery and enhanced cytotoxicity in multidrug resistant breast cancer cells. *Oncotarget*, 8, pp. 30369-82.

Balendiran, G. K., Dabur, R. and Fraser, D. (2004). The role of glutathione in cancer. *Cell Biochem Funct*, 22, pp. 343-52.

Banerjee, R. (2001). Liposomes: applications in medicine. *J Biomater Appl*, 16, pp. 3-21.

Bao, L., Haque, A., Jackson, K., *et al.* (2011). Increased expression of P-glycoprotein is associated with doxorubicin chemoresistance in the metastatic 4T1 breast cancer model. *Am J Pathol*, 178, pp. 838-52.

Bareford, L. M. and Swaan, P. W. (2007). Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 59, pp. 748-58.

Bei, D., Meng, J. and Youan, B. B. (2010). Engineering nanomedicines for improved melanoma therapy: progress and promises. *Nanomedicine (Lond)*, 5, pp. 1385-99.

Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., *et al.* (2014). Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv Rev*, 66, pp. 2-25.

Bosi, S., Da Ros, T., Spalluto, G., *et al.* (2003). Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications. *Eur J Med Chem*, 38, pp. 913-23.

Bulte, J. W. and Kraitchman, D. L. (2004). Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed*, 17, pp. 484-99.

Cabane, E., Zhang, X., Langowska, K., *et al.* (2012). Stimuli-responsive polymers and their applications in nanomedicine. *Biointerphases*, 7, pp. 9.

Camacho, K. M., Menegatti, S., Vogus, D. R., *et al.* (2016). DAFODIL: A novel liposome-encapsulated synergistic combination of doxorubicin and 5FU for low dose chemotherapy. *J Control Release*, 229, pp. 154-62.

Catuogno, S., Esposito, C. and de Franciscis, V. (2016). Aptamer-Mediated Targeted Delivery of Therapeutics: An Update. *Pharmaceuticals (Basel)*, 9, pp. 69.

Chen, H., MacDonald, R. C., Li, S., *et al.* (2006). Lipid Encapsulation of Arsenic Trioxide Attenuates Cytotoxicity and Allows for Controlled Anticancer Drug Release. *Journal of the American Chemical Society*, 128, pp. 13348-49.

Chen, W., Deng, W. and Goldys, E. M. (2017). Light-Triggerable Liposomes for Enhanced Endolysosomal Escape and Gene Silencing in PC12 Cells. *Mol Ther Nucleic Acids*, 7, pp. 366-77.

Chen, Y., Du, Q., Guo, Q., *et al.* (2019). A W/O emulsion mediated film dispersion method for curcumin encapsulated pH-sensitive liposomes in the colon tumor treatment. *Drug Dev Ind Pharm*, 45, pp. 282-91.

Chen, Z. J., Zhang, Z., Xie, B. B., *et al.* (2016). Development and evaluation of topotecan loaded solid lipid nanoparticles: A study in cervical cancer cell lines. *J Photochem Photobiol B*, 165, pp. 182-88.

Cho, M., Cervadoro, A., Ramirez, M. R., *et al.* (2017). Assembly of Iron Oxide Nanocubes for Enhanced Cancer Hyperthermia and Magnetic Resonance Imaging. *Nanomaterials (Basel)*, 7, pp. 72.

Clemons, T. D., Singh, R., Sorolla, A., *et al.* (2018). Distinction Between Active and Passive Targeting of Nanoparticles Dictate Their Overall Therapeutic Efficacy. *Langmuir*, 34, pp. 15343-49.

Cosgrove, R. H., Zacharski, L. R., Racine, E., *et al.* (2002). Improved cancer mortality with low-molecular-weight heparin treatment: a review of the evidence. *Semin Thromb Hemost*, 28, pp. 79-87.

Crucho, C. I. (2015). Stimuli-responsive polymeric nanoparticles for nanomedicine. *Chem Med Chem*, 10, pp. 24-38.

Cullion, K., Rwei, A. Y. and Kohane, D. S. (2018). Ultrasound-triggered liposomes for on-demand local anesthesia. *Ther Deliv*, 9, pp. 5-8.

Davis, M. E., Chen, Z. G. and Shin, D. M. (2008). Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 7, pp. 771-82.

Decuzzi, P., Godin, B., Tanaka, T., *et al.* (2010). Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles. *J Control Release*, 141, pp. 320-7.

Deda, D. K. and Araki, K. (2015). Nanotechnology, Light and Chemical Action: an Effective Combination to Kill Cancer Cells. *J of the Brazilian Chemical Society*, 26, pp. 2448-70.

Deguchi, A. (2015). Curcumin targets in inflammation and cancer. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 15, pp. 88-96.

Deshpande, P. P., Biswas, S. and Torchilin, V. P. (2013). Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. *Nanomedicine (Lond)*, 8, pp. 1509-28.

Diasio, R. B. and Harris, B. E. (1989). Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin Pharmacokinet*, 16, pp. 215-37.

Dousset, V., Tourdias, T., Brochet, B., *et al.* (2008). How to trace stem cells for MRI evaluation? *J Neurol Sci*, 265, pp. 122-6.

Dreher, M. R., Liu, W., Michelich, C. R., *et al.* (2006). Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. *J Natl Cancer Inst*, 98, pp. 335-44.

Du, H., Cui, C., Wang, L., *et al.* (2011). Novel tetrapeptide, RGDF, mediated tumor specific liposomal doxorubicin (DOX) preparations. *Mol Pharm*, 8, pp. 1224-32.

Duangjit, S., Pamornpathomkul, B., Opanasopit, P., *et al.* (2014). Role of the charge, carbon chain length, and content of surfactant on the skin penetration of meloxicam-loaded liposomes. *Int J Nanomedicine*, 9, pp. 2005-17.

Duncan, R. and Gaspar, R. (2011). Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol Pharm*, 8, pp. 2101-41.

Edwards, K. A. and Baeumner, A. J. (2006). Liposomes in analyses. *Talanta*, 68, pp. 1421-31.

Egusquiaguirre, S. P., Igartua, M., Hernandez, R. M., *et al.* (2012). Nanoparticle delivery systems for cancer therapy: advances in clinical and preclinical research. *Clin Transl Oncol*, 14, pp. 83-93.

Fadus, M. C., Lau, C., Bikhchandani, J., *et al.* (2017). Curcumin: An age-old anti-inflammatory and anti-neoplastic agent. *J Tradit Complement Med*, 7, pp. 339-46.

Fang, X., Zhao, X., Fang, W., *et al.* (2013). Self-templating synthesis of hollow mesoporous silica and their applications in catalysis and drug delivery. *Nanoscale*, 5, pp. 2205-18.

Fei, W., Zhang, Y., Han, S., *et al.* (2017). RGD conjugated liposome-hollow silica hybrid nanovehicles for targeted and controlled delivery of arsenic trioxide against hepatic carcinoma. *Int J Pharm*, 519, pp. 250-62.

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., *et al.* (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*, 144, pp. 1941-53.

Friberg, S. and Nystrom, A. M. (2015). Nanotechnology in the war against cancer: new arms against an old enemy - a clinical view. *Future Oncol*, 11, pp. 1961-75.

Gabizon, A., Catane, R., Uziely, B., *et al.* (1994). Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Res*, 54, pp. 987-92.

Gabizon, A., Shmeeda, H. and Barenholz, Y. (2003). Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies. *Clin Pharmacokinet*, 42, pp. 419-36.

Gabra, H., Cameron, D. A., Lee, L. E., *et al.* (1996). Weekly doxorubicin and continuous infusional 5-fluorouracil for advanced breast cancer. *Br J Cancer*, 74, pp. 2008-12.

Galluzzi, L. and Kroemer, G. (2008). Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*, 135, pp. 1161-3.

Ganta, S., Devalapally, H., Shahiwala, A., *et al.* (2008). A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. *J Control Release*, 126, pp. 187-204.

Gao, F., Zhang, J., Fu, C., *et al.* (2017). iRGD-modified lipid-polymer hybrid nanoparticles loaded with isoliquiritigenin to enhance anti-breast cancer effect and tumor-targeting ability. *Int J Nanomedicine*, 12, pp. 4147-62.

Geim, A. K. and Novoselov, K. S. (2007). The rise of graphene. *Nature Materials*, 6, pp. 183.

Goncalves, A. S., Macedo, A. S. and Souto, E. B. (2012). Therapeutic nanosystems for oncology nanomedicine. *Clin Transl Oncol*, 14, pp. 883-90.

Gong, Z., Chen, D., Xie, F., *et al.* (2016). Codelivery of salinomycin and doxorubicin using nanoliposomes for targeting both liver cancer cells and cancer stem cells. *Nanomedicine (Lond)*, 11, pp. 2565-79.

Gosk, S., Moos, T., Gottstein, C., *et al.* (2008). VCAM-1 directed immunoliposomes selectively target tumor vasculature in vivo. *Biochim Biophys Acta*, 1778, pp. 854-63.

Grahn, A. Y., Bankiewicz, K. S., Dugich-Djordjevic, M., *et al.* (2009). Non-PEGylated liposomes for convection-enhanced delivery of topotecan and gadodiamide in malignant glioma: initial experience. *J Neurooncol*, 95, pp. 185-97.

Hafez, I. M., Ansell, S. and Cullis, P. R. (2000). Tunable pH-sensitive liposomes composed of mixtures of cationic and anionic lipids. *Biophys J*, 79, pp. 1438-46.

Hilger, I., Fruhauf, K., Andra, W., *et al.* (2002). Heating potential of iron oxides for therapeutic purposes in interventional radiology. *Acad Radiol*, 9, pp. 198-202.

Hortobagyi, G. N., Bodey, G. P., Buzdar, A. U., *et al.* (1987). Evaluation of high-dose versus standard FAC chemotherapy for advanced breast cancer in protected environment units: a prospective randomized study. *J Clin Oncol*, 5, pp. 354-64.

Hsu, C. Y., Wang, P. W., Alalaiwe, A., *et al.* (2019). Use of Lipid Nanocarriers to Improve Oral Delivery of Vitamins. *Nutrients*, 11, pp. 68.

Huang, Y., Cole, S. P., Cai, T., *et al.* (2016). Applications of nanoparticle drug delivery systems for the reversal of multidrug resistance in cancer. *Oncol Lett*, 12, pp. 11-15.

Husseini, G. A. and Pitt, W. G. (2008). Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 60, pp. 1137-52.

Jaguin, M., Houlbert, N., Fardel, O., *et al.* (2013). Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell Immunol*, 281, pp. 51-61.

Jain, R. K., di Tomaso, E., Duda, D. G., *et al.* (2007). Angiogenesis in brain tumours. *Nature Reviews Neuroscience*, 8, pp. 610.

Jain, R. K. and Stylianopoulos, T. (2010). Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 7, pp. 653.

Jankiewicz, B. J., Jamiola, D., Choma, J., *et al.* (2012). Silica-metal core-shell nanostructures. *Adv Colloid Interface Sci*, 170, pp. 28-47.

Jenning, V., Thünemann, A. F. and Gohla, S. H. (2000). Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *Int J of Pharm*, 199, pp. 167-77.

Ji, Z., Lin, G., Lu, Q., *et al.* (2012). Targeted therapy of SMMC-7721 liver cancer in vitro and in vivo with carbon nanotubes based drug delivery system. *J Colloid Interface Sci*, 365, pp. 143-9.

Jiang, C., Cai, H., Peng, X., *et al.* (2017). Targeted Imaging of Tumor-Associated Macrophages by Cyanine 7-Labeled Mannose in Xenograft Tumors. *Mol Imaging*, 16, pp. 1-10.

Jores, K., Mehnert, W., Drechsler, M., *et al.* (2004). Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. *J Control Release*, 95, pp. 217-27.

Jose, A., Ninave, K. M., Karnam, S., *et al.* (2019). Temperature-sensitive liposomes for co-delivery of tamoxifen and imatinib for synergistic breast cancer treatment. *J Liposome Res*, 29, pp. 153-62.

Jose, C., Amra, K., Bhavsar, C., *et al.* (2018). Polymeric Lipid Hybrid Nanoparticles: Properties and Therapeutic Applications. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 35, pp. 555-88.

Jukapli, N. M. and Bagheri, S. (2016). Recent developments on titania nanoparticle as photocatalytic cancer cells treatment. *J of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 163, pp. 421-30.

Kadivar, A., Kamalidehghan, B., Akbari Javar, H., *et al.* (2017). Antiproliferation effect of imatinib mesylate on MCF7, T-47D tumorigenic and MCF 10A nontumorigenic breast cell lines via PDGFR- β , PDGF-BB, c-Kit and SCF genes. *Drug Des Devel Ther*, 11, pp. 469-81.

Kakkar, A. K., Levine, M. N., Kadziola, Z., *et al.* (2004). Low molecular weight heparin, therapy with dalteparin, and survival in advanced cancer: the fragmin advanced malignancy outcome study (FAMOUS). *J Clin Oncol*, 22, pp. 1944-8.

Kamaly, N., Xiao, Z., Valencia, P. M., *et al.* (2012). Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chem Soc Rev*, 41, pp. 2971-3010.

Kang, H., Hu, S., Cho, M. H., *et al.* (2018). Theranostic Nanosystems for Targeted Cancer Therapy. *Nano Today*, 23, pp. 59-72.

Kang, T., Li, F., Baik, S., *et al.* (2017). Surface design of magnetic nanoparticles for stimuli-responsive cancer imaging and therapy. *Biomaterials*, 136, pp. 98-114.

Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*, 441, pp. 431-6.

Kedziorek, D. A., Muja, N., Walczak, P., *et al.* (2010). Gene expression profiling reveals early cellular responses to intracellular magnetic labeling with superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Magn Reson Med*, 63, pp. 1031-43.

Kirpotin, D. B., Drummond, D. C., Shao, Y., *et al.* (2006). Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. *Cancer Res*, 66, pp. 6732-40.

Klostranec, J. M. and Chan, W. C. W. (2006). Quantum Dots in Biological and Biomedical Research: Recent Progress and Present Challenges. *Advanced Materials*, 18, pp. 1953-64.

Kong, D. H., Kim, Y. K., Kim, M. R., *et al.* (2018). Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *Int J Mol Sci*, 19, pp. 1057.

Kong, S. D., Sartor, M., Hu, C. M., *et al.* (2013). Magnetic field activated lipid-polymer hybrid nanoparticles for stimuli-responsive drug release. *Acta Biomater*, 9, pp. 5447-52.

Kraft, J. C., Freeling, J. P., Wang, Z., *et al.* (2014). Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems. *J Pharm Sci*, 103, pp. 29-52.

Kroemer, G., Galluzzi, L. and Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, 87, pp. 99-163.

Kuroki, M., Hachimine, K., Abe, H., *et al.* (2007). Sonodynamic therapy of cancer using novel sonosensitizers. *Anticancer Res*, 27, pp. 3673-7.

Läubli, H., Stevenson, J. L., Varki, A., *et al.* (2006). L-Selectin Facilitation of Metastasis Involves Temporal Induction of Fut7-Dependent Ligands at Sites of Tumor Cell Arrest. *Cancer Research*, 66, pp. 1536.

Laverman, P., Boerman, O. C., Oyen, W. J., *et al.* (1999). Liposomes for scintigraphic detection of infection and inflammation. *Adv Drug Deliv Rev*, 37, pp. 225-35.

Lee, J. J., Saiful Yazan, L. and Che Abdullah, C. A. (2017). A review on current nanomaterials and their drug conjugate for targeted breast cancer treatment. *Int J Nanomedicine*, 12, pp. 2373-84.

Lee, S.-M., Lee, O.-S., O'Halloran, T. V., *et al.* (2011). Triggered Release of Pharmacophores from [Ni(HAsO₃)]-Loaded Polymer-Caged Nanobin Enhances Proapoptotic Activity: A Combined Experimental and Theoretical Study. *ACS Nano*, 5, pp. 3961-69.

Li, M., Luo, Z. and Zhao, Y. (2016). Hybrid Nanoparticles as Drug Carriers for Controlled Chemotherapy of Cancer. *Chem Rec*, 16, pp. 1833-51.

Li, Z., Tan, S., Li, S., *et al.* (2017). Cancer drug delivery in the nano era: An overview and perspectives (Review). *Oncol Rep*, 38, pp. 611-24.

Liang, H. F., Chen, C. T., Chen, S. C., *et al.* (2006). Paclitaxel-loaded poly(γ -glutamic acid)-poly(lactide) nanoparticles as a targeted drug delivery system for the treatment of liver cancer. *Biomaterials*, 27, pp. 2051-9.

Lin, B., Kolluri, S. K., Lin, F., *et al.* (2004). Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell*, 116, pp. 527-40.

Liu, J., Wang, Q., Adu-Frimpong, M., *et al.* (2019a). Preparation, in vitro and in vivo evaluation of isoliquiritigenin-loaded TPGS modified proliposomes. *Int J Pharm*, 563, pp. 53-62.

Liu, K. C., Arivajigane, A., Wu, S. J., *et al.* (2019b). Development of a novel thermal-sensitive multifunctional liposome with antibody conjugation to target EGFR-expressing tumors. *Nanomedicine*, 15, pp. 285-94.

Liu, T., Li, L., Teng, X., *et al.* (2011). Single and repeated dose toxicity of mesoporous hollow silica nanoparticles in intravenously exposed mice. *Biomaterials*, 32, pp. 1657-68.

Liu, X., Jiang, J., Ji, Y., *et al.* (2017). Targeted drug delivery using iRGD peptide for solid cancer treatment. *Mol Syst Des Eng*, 2, pp. 370-79.

Lohade, A. A., Jain, R. R., Iyer, K., *et al.* (2016). A Novel Folate-Targeted Nanoliposomal System of Doxorubicin for Cancer Targeting. *AAPS PharmSciTech*, 17, pp. 1298-311.

Longley, D. B. and Johnston, P. G. (2005). Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*, 205, pp. 275-92.

Lovric, J., Cho, S. J., Winnik, F. M., *et al.* (2005). Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death. *Chem Biol*, 12, pp. 1227-34.

Luyckx, M., Votino, R., Squifflet, J. L., *et al.* (2014). Profile of vintafolide (EC145) and its use in the treatment of platinum-resistant ovarian cancer. *Int J Womens Health*, 6, pp. 351-8.

Mahmoudi, M., Sant, S., Wang, B., *et al.* (2011). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 63, pp. 24-46.

Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., *et al.* (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*, 23, pp. 549-55.

May, J. P. and Li, S. D. (2013). Hyperthermia-induced drug targeting. *Expert Opin Drug Deliv*, 10, pp. 511-27.

Mazo-Zuluaga, J. (2011). *A look at the study and the technological and Biomedical applications of magnetite*. *Revista EIA*, 16, pp. 207-23.

Meng, H., Liong, M., Xia, T., *et al.* (2010). Engineered design of mesoporous silica nanoparticles to deliver doxorubicin and P-glycoprotein siRNA to overcome drug resistance in a cancer cell line. *ACS Nano*, 4, pp. 4539-50.

Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., *et al.* (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*, 56, pp. 185-229.

Mirza, A. Z. and Siddiqui, F. A. (2014). Nanomedicine and drug delivery: a mini review. *International Nano Letters*, 4, pp. 94.

Mondal, S., Manivasagan, P., Bharathiraja, S., *et al.* (2017). Hydroxyapatite Coated Iron Oxide Nanoparticles: A Promising Nanomaterial for Magnetic Hyperthermia Cancer Treatment. *Nanomaterials (Basel)*, 7, pp. 426.

Moreno Vega, A.-I., Quintero, T., *et al.* (2012). Polymeric and Ceramic Nanoparticles in Biomedical Applications. *J Journal of Nanotechnology*. 2012, pp. 10.

Morris, K. V., Chan, S. W., Jacobsen, S. E., *et al.* (2004). Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science*, 305, pp. 1289-92.

Muller, R. H., Maassen, S., Weyhers, H., *et al.* (1996). Phagocytic uptake and cytotoxicity of solid lipid nanoparticles (SLN) sterically stabilized with poloxamine 908 and poloxamer 407. *J Drug Target*, 4, pp. 161-70.

Müller, R. H., Radtke, M. and Wissing, S. A. (2002). Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int J Pharm*, 242, pp. 121-28.

Murad, A. M., Santiago, F. F., Petroianu, A., *et al.* (1993). Modified therapy with 5-fluorouracil, doxorubicin, and methotrexate in advanced gastric cancer. *Cancer*, 72, pp. 37-41.

Needham, D., Anyarambhatla, G., Kong, G., *et al.* (2000). A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: characterization and testing in a human tumor xenograft model. *Cancer Res*, 60, pp. 1197-201.

Niu, M., Naguib, Y. W., Aldayel, A. M., *et al.* (2014). Biodistribution and in vivo activities of tumor-associated macrophage-targeting nanoparticles incorporated with doxorubicin. *Mol Pharm*, 11, pp. 4425-36.

Nomikou, N., Li, Y. S. and McHale, A. P. (2010). Ultrasound-enhanced drug dispersion through solid tumours and its possible role in aiding ultrasound-targeted cancer chemotherapy. *Cancer Lett*, 288, pp. 94-8.

Otsuka, H., Nagasaki, Y. and Kataoka, K. (2003). PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 55, pp. 403-19.

Padera, T. P., Stoll, B. R., Tooredman, J. B., *et al.* (2004). Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. *Nature*, 427, pp. 695.

Pappalardo, J. S., Langellotti, C. A., Di Giacomo, S., *et al.* (2014). In vitro transfection of bone marrow-derived dendritic cells with TATp-liposomes. *Int J Nanomedicine*, 9, pp. 963-73.

Park, J.-H., Oh, C., Shin, S.-I., *et al.* (2003). Preparation of hollow silica microspheres in W/O emulsions with polymers. *J of Colloid and Interface Science*, 266, pp. 107-14.

Park, K. (2012). Polysaccharide-based near-infrared fluorescence nanoprobe for cancer diagnosis. *Quant Imaging Med Surg*, 2, pp. 106-13.

Patil, Y., Amitay, Y., Ohana, P., *et al.* (2016). Targeting of pegylated liposomal mitomycin-C prodrug to the folate receptor of cancer cells: Intracellular activation and enhanced cytotoxicity. *J Control Release*, 225, pp. 87-95.

Piaggio, F., Kondylis, V., Pastorino, F., *et al.* (2016). A novel liposomal Clodronate depletes tumor-associated macrophages in primary and metastatic melanoma: Anti-angiogenic and anti-tumor effects. *J Control Release*, 223, pp. 165-77.

Piktel, E., Niemirowicz, K., Watek, M., *et al.* (2016). Recent insights in nanotechnology-based drugs and formulations designed for effective anti-cancer therapy. *J Nanobiotechnology*, 14, pp. 39.

Qi, S. S., Sun, J. H., Yu, H. H., *et al.* (2017). Co-delivery nanoparticles of anti-cancer drugs for improving chemotherapy efficacy. *Drug Deliv*, 24, pp. 1909-26.

Rajshekar, D., Chaudhari, K., Bhat, P., *et al.* (2013). Evaluation of performance of direct disk diffusion test from positively flagged blood culture broth: A large scale study from South India. *SRM J Res Dent Sci*, 4, pp. 154-60.

Ramasamy, T., Ruttala, H. B., Choi, J. Y., *et al.* (2015). Engineering of a lipid-polymer nanoarchitectural platform for highly effective combination therapy of doxorubicin and irinotecan. *Chemical Communications*, 51, pp. 5758-61.

Rani, V. (2015). Nanomedicine and its applications. *J Chem Pharm Res.*, 7, pp. 216-27.

Raynal, I., Prigent, P., Peyramaure, S., *et al.* (2004). Macrophage endocytosis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: mechanisms and comparison of ferumoxides and ferumoxtran-10. *Invest Radiol*, 39, pp. 56-63.

Raza, A., Hayat, U., Rasheed, T., *et al.* (2018). Redox-responsive nano-carriers as tumor-targeted drug delivery systems. *Eur J Med Chem*, 157, pp. 705-15.

Rehman, S., Nabi, B., Fazil, M., *et al.* (2017). Role of P-Glycoprotein Inhibitors in the Bioavailability Enhancement of Solid Dispersion of Darunavir. *BioMed Res Int*, 1, pp. 1-17.

Richards, D. M., Hettinger, J. and Feuerer, M. (2013). Monocytes and macrophages in cancer: development and functions. *Cancer Microenviron*, 6, pp. 179-91.

Rothenberg, M. L. (2001). Irinotecan (CPT-11): recent developments and future directions-colorectal cancer and beyond. *Oncologist*, 6, pp. 66-80.

Roy Chowdhury, M., Schumann, C., Bhakta-Guha, D., *et al.* (2016). Cancer nanotheranostics: Strategies, promises and impediments. *Biomed Pharmacother*, 84, pp. 291-304.

Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M. D. (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*, 238, pp. 491-7.

Saito, G., Swanson, J. A. and Lee, K. D. (2003). Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities. *Adv Drug Deliv Rev*, 55, pp. 199-215.

Salim, M., Minamikawa, H., Sugimura, A., *et al.* (2014). Amphiphilic designer nano-carriers for controlled release: from drug delivery to diagnostics. *Med Chem Comm*, 5, pp. 1602-18.

Santra, S., Kaittanis, C., Grimm, J., *et al.* (2009). Drug/dye-loaded, multifunctional iron oxide nanoparticles for combined targeted cancer therapy and dual optical/magnetic resonance imaging. *Small*, 5, pp. 1862-8.

Saraiva, J., Marotta-Oliveira, S. S., Cicillini, S. A., *et al.* (2011). Nanocarriers for nitric oxide delivery. *J Drug Deliv*, 2011, pp. 16.

Schafer, F. Q. and Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*, 30, pp. 1191-212.

Seleci, M., Ag Seleci, D., Scheper, T., *et al.* (2017). Theranostic Liposome-Nanoparticle Hybrids for Drug Delivery and Bioimaging. *Int J Mol Sci*, 18, pp. 1422-67.

Sengel-Turk, C. T. and Hascicek, C. (2017). Design of lipid-polymer hybrid nanoparticles for therapy of BPH: Part I. Formulation optimization using a design of experiment approach. *J Drug Deliv Sci Tech*, 39, pp. 16-27.

Seo, M. D., Lee, K. W., Lim, J. H., *et al.* (2008). Irinotecan combined with 5-fluorouracil and leucovorin as second-line chemotherapy for metastatic or relapsed gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol*, 38, pp. 589-95.

Shagufta and Ahmad, I. (2018). Tamoxifen a pioneering drug: An update on the therapeutic potential of tamoxifen derivatives. *Eur J Med Chem*, 143, pp. 515-31.

Shah, S. A., Aslam Khan, M. U., Arshad, M., *et al.* (2016). Doxorubicin-loaded photosensitive magnetic liposomes for multi-modal cancer therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 148, pp. 157-64.

Shapira, A., Livney, Y. D., Broxterman, H. J., *et al.* (2011). Nanomedicine for targeted cancer therapy: towards the overcoming of drug resistance. *Drug Resist Updat*, 14, pp. 150-63.

Sharkey, A. M., Day, K., McPherson, A., *et al.* (2000). Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Human Endometrium Is Regulated by Hypoxia¹. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85, pp. 402-9.

Sharma, R., Mody, N., Agrawal, U., *et al.* (2017). Theranostic Nanomedicine; A Next Generation Platform for Cancer Diagnosis and Therapy. *Mini Rev Med Chem*, 17, pp. 1746-57.

Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., *et al.* (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, 95, pp. 927-37.

Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A., *et al.* (2006). Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer*, 42, pp. 717-27.

Siegel, R., Naishadham, D. and Jemal, A. (2012). Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 62, pp. 10-29.

Singh, N., Karambelkar, A., Gu, L., *et al.* (2011). Bioresponsive mesoporous silica nanoparticles for triggered drug release. *J Am Chem Soc*, 133, pp. 19582-5.

Singha, K., Namgung, R. and Kim, W. J. (2011). Polymers in small-interfering RNA delivery. *Nucleic Acid Ther*, 21, pp. 133-47.

Skorupska, E., Jeziorna, A., Kazmierski, S., *et al.* (2014). Recent progress in solid-state NMR studies of drugs confined within drug delivery systems. *Solid State Nucl Magn Reson*, 57-58, pp. 2-16.

Sonali, Singh, R. P., Singh, N., *et al.* (2016). Transferrin liposomes of docetaxel for brain-targeted cancer applications: formulation and brain theranostics. *Drug Deliv*, 23, pp. 1261-71.

Souto, E. B., Wissing, S. A., Barbosa, C. M., *et al.* (2004). Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations. *Eur J Pharm Biopharm*, 58, pp. 83-90.

Sun, J., Jiang, L., Lin, Y., *et al.* (2017). Enhanced anticancer efficacy of paclitaxel through multistage tumor-targeting liposomes modified with RGD and KLA peptides. *Int J Nanomedicine*, 12, pp. 1517-37.

Sun, Y., Yu, B., Wang, G., *et al.* (2014). Enhanced antitumor efficacy of vitamin E TPGS-emulsified PLGA nanoparticles for delivery of paclitaxel. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 123, pp. 716-23.

Sunil Kumar, B. V., Singh, S. and Verma, R. (2017). Anticancer potential of dietary vitamin D and ascorbic acid: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 57, pp. 2623-35.

Swindell, E. P., Hankins, P. L., Chen, H., *et al.* (2013). Anticancer activity of small-molecule and nanoparticulate arsenic(III) complexes. *Inorg Chem*, 52, pp. 12292-304.

Szasz, A., Szasz, N. and Szasz, O. (2011). Hyperthermia Results and Challenges. *Oncothermia : Principles and Practices*. Dordrecht, Springer Netherlands, 1, pp. 17-88.

Szmigielski, S., Zielinski, H., Stawarz, B., *et al.* (1988). Local microwave hyperthermia in treatment of advanced prostatic adenocarcinoma. *Urological Research*, 16, pp. 1-7.

Tam, F., Goodrich, G. P., Johnson, B. R., *et al.* (2007). Plasmonic Enhancement of Molecular Fluorescence. *Nano Letters*, 7, pp. 496-501.

Tefas, L. R., Sylvester, B., Tomuta, I., *et al.* (2017). Development of antiproliferative long-circulating liposomes co-encapsulating doxorubicin and curcumin, through the use of a quality-by-design approach. *Drug Des Devel Ther*, 11, pp. 1605-21.

Teng, I. T., Chang, Y. J., Wang, L. S., *et al.* (2013). Phospholipid-functionalized mesoporous silica nanocarriers for selective photodynamic therapy of cancer. *Biomaterials*, 34, pp. 7462-70.

Thakor, A. S. and Gambhir, S. S. (2013). Nanooncology: the future of cancer diagnosis and therapy. *CA Cancer J Clin*, 63, pp. 395-418.

Tian, J., Han, M., Wang, Y., *et al.* (2016). Reduction-responsive modification-induced higher efficiency for attenuation of tumor metastasis of low molecular weight heparin functionalized liposomes. *RSC Advances*, 6, pp. 49250-62.

Tran, T. H., Nguyen, H. T., Pham, T. T., *et al.* (2015). Development of a Graphene Oxide Nanocarrier for Dual-Drug Chemo-phototherapy to Overcome Drug Resistance in Cancer. *ACS Appl Mater Interfaces*, 7, pp. 28647-55.

Ulrich, C. M. (2008). Folate and cancer prevention-where to next? Counterpoint. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17, pp. 2226-30.

Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Bourgault, S., *et al.* (2009). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev*, 61, pp. 283-357.

Ventola, C. L. (2017). Progress in Nanomedicine: Approved and Investigational Nanodrugs. *P t*, 42, pp. 742-55.

Vilar, G., Tulla-Puche, J. and Albericio, F. (2012). Polymers and drug delivery systems. *Curr Drug Deliv*, 9, pp. 367-94.

Vlodavsky, I., Ilan, N., Naggi, A., *et al.* (2007). Heparanase: structure, biological functions, and inhibition by heparin-derived mimetics of heparan sulfate. *Curr Pharm Des*, 13, pp. 2057-73.

Wadhwa, R., Colgin, L., Yaguchi, T., *et al.* (2002). Rhodacyanine dye MKT-077 inhibits in vitro telomerase assay but has no detectable effects on telomerase activity in vivo. *Cancer Res*, 62, pp. 4434-8.

Wang, N., Wang, Z., Peng, C., *et al.* (2014). Dietary compound isoliquiritigenin targets GRP78 to chemosensitize breast cancer stem cells via beta-catenin/ABCG2 signaling. *Carcinogenesis*, 35, pp. 2544-54.

Wang, N., Wang, Z., Wang, Y., *et al.* (2015). Dietary compound isoliquiritigenin prevents mammary carcinogenesis by inhibiting breast cancer stem cells through WIF1 demethylation. *Oncotarget*, 6, pp. 9854-76.

Wang, T., Niu, G., Kortylewski, M., *et al.* (2004). Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med*, 10, pp. 48-54.

Wang, X., Yan, F., Liu, X., *et al.* (2018). Enhanced drug delivery using sonoactivatable liposomes with membrane-embedded porphyrins. *J Control Release*, 286, pp. 358-68.

Wang, Z. Y. and Chen, Z. (2008). Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood*, 111, pp. 2505-15.

Wei, Y., Yang, P., Cao, S., *et al.* (2018). The combination of curcumin and 5-fluorouracil in cancer therapy. *Arch Pharm Res*, 41, pp. 1-13.

Wilczewska, A. Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H., *et al.* (2012). Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol Rep*, 64, pp. 1020-37.

Willard, M. A., Kurihara, L. K., Carpenter, E. E., *et al.* (2004). Chemically prepared magnetic nanoparticles. *International Materials Reviews*, 49, pp. 125-70.

Wood, A. K. and Sehgal, C. M. (2015). A review of low-intensity ultrasound for cancer therapy. *Ultrasound Med Biol*, 41, pp. 905-28.

Yan, F., Zhang, C., Zheng, Y., *et al.* (2010). The effect of poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity. *Nanomedicine*, 6, pp. 170-8.

Yang, L. and Zhang, Y. (2017). Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. *J Hematology & Oncology*, 10, pp. 58.

Yang, Y., Lu, X., Liu, Q., *et al.* (2017). Palmitoyl ascorbate and doxorubicin co-encapsulated liposome for synergistic anticancer therapy. *Eur J Pharm Sci*, 105, pp. 219-29.

Yin, Q., Shen, J., Zhang, Z., *et al.* (2013). Reversal of multidrug resistance by stimuli-responsive drug delivery systems for therapy of tumor. *Adv Drug Deliv Rev*, 65, pp. 1699-715.

Yuan, M. Q., Zhu, F., Lou, J. Y., *et al.* (2014). The anti-tumoral efficacy of a docetaxel-loaded liposomal drug delivery system modified with transferrin for ovarian cancer. *Drug Res (Stuttg)*, 64, pp. 195-202.

Yuan, R., Hou, Y., Sun, W., *et al.* (2017). Natural products to prevent drug resistance in cancer chemotherapy: a review. *Ann N Y Acad Sci*, 1401, pp. 19-27.

Zalba, S., Contreras, A. M., Merino, M., *et al.* (2016). EGF-liposomes promote efficient EGFR targeting in xenograft colocal carcinoma model. *Nanomedicine (Lond)*, 11, pp. 465-77.

Zhang, C.-g., Zhu, W.-j., Liu, Y., *et al.* (2016). Novel polymer micelle mediated co-delivery of doxorubicin and P-glycoprotein siRNA for reversal of multidrug resistance and synergistic tumor therapy. *Scientific Reports*, 6, pp. 23859.

Zhang, J., Wang, L., Fai Chan, H., *et al.* (2017). Co-delivery of paclitaxel and tetrandrine via iRGD peptide conjugated lipid-polymer hybrid nanoparticles overcome multidrug resistance in cancer cells. *Sci Rep*, 7, pp. 46057.

Zhang, N., Liu, X., Hou, R., *et al.* (2019). Ultrasound-Triggered Gas-Generating Doxorubicin Poly(lactic-co-glycolic acid)-Nanoparticles for Cancer Therapy. *J Nanosci Nanotechnol*, 19, pp. 5463-68.

Zhang, Q., Vakili, M. R., Li, X.-F., *et al.* (2014). Polymeric micelles for GSH-triggered delivery of arsenic species to cancer cells. *Biomaterials*, 35, pp. 7088-100.

Zhang, X. and Zhang, P. (2016). Nanotechnology for multimodality treatment of cancer (Review). *Oncology Letters*, 12, pp. 4883–86.

Zheng, H., Li, X., Chen, C., *et al.* (2016). Quantum dot-based immunofluorescent imaging and quantitative detection of TOP2A and prognostic value in triple-negative breast cancer. *Int J Nanomedicine*, 11, pp. 5519-29.

Zheng, Y., Yamaguchi, H., Tian, C., *et al.* (2005). Arsenic trioxide (As₂O₃) induces apoptosis through activation of Bax in hematopoietic cells. *Oncogene*, 24, pp. 3339-47.

Zhou, J., Zhao, W. Y., Ma, X., *et al.* (2013). The anticancer efficacy of paclitaxel liposomes modified with mitochondrial targeting conjugate in resistant lung cancer. *Biomaterials*, 34, pp. 3626-38.

Zhou, L., Dong, K., Chen, Z., *et al.* (2015). Near-infrared absorbing mesoporous carbon nanoparticle as an intelligent drug carrier for dual-triggered synergistic cancer therapy. *Carbon*, 82, pp. 479-88.

Zhu, S., Wonganan, P., Lansakara, P. D., *et al.* (2013). The effect of the acid-sensitivity of 4-(N)-stearoyl gemcitabine-loaded micelles on drug resistance caused by RRM1 overexpression. *Biomaterials*, 34, pp. 2327-39.