

**EVA EMANUELA SOARES DA SILVA BARROS**

**NANOMEDICINAS PARA O CANCRO: O DESENVOLVIMENTO DE  
NOVAS ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS**

**UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PORTO**

**2013**



**EVA EMANUELA SOARES DA SILVA BARROS**

**NANOMEDICINAS PARA O CANCRO: O DESENVOLVIMENTO DE  
NOVAS ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS**

**UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PORTO**

**2013**

**EVA EMANUELA SOARES DA SILVA BARROS**

**NANOMEDICINAS PARA O CANCRO: O DESENVOLVIMENTO DE NOVAS  
ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS**

**TRABALHO APRESENTADO À  
UNIVERSIDADE FERNANDO  
PESSOA COMO PARTE DA  
OBTENÇÃO DO GRAU DE  
MESTRE EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

---

## **SUMÁRIO**

A aplicação da nanotecnologia à medicina permitiu o desenvolvimento de sistemas inovadores transportadores de substância ativas à escala nanométrica, esta que oferece propriedades adicionais às de tamanho vulgar. O cancro é mundialmente determinante na mortalidade. As terapias convencionais conseguiram uma ligeira diminuição na mortalidade, à troca de riscos e efeitos adversos graves que muitas vezes são deixam solução senão arriscar aceitá-los na falta de alternativas terapêuticas. A nanomedicina surgiu como possibilidade de se tornar uma alternativa, demonstrando potencial para minimizar os efeitos adversos e aumentar a sobrevida e qualidade de vida do doente. Através do estudo profundo do ambiente e fisiologia tumoral, e das propriedades únicas da nanoescala tornou possível hoje existir nanomedicinas aprovadas e em uso clínico. Estas que, apesar de pouco desenvolvidas já representam uma alternativa em alguns cancros, abriram principalmente horizontes a novos rumos e novas ideias de investigação na terapia oncológica.

## **ABSTRACT**

The application of nanotechnology in medicine has enabled the development of innovative drug carriers at the nanoscale, offering additional properties when compared to ordinary size. Cancer is determining mortality worldwide. Conventional therapies achieved a slight decrease in mortality, frequently associated to toxicological risks and serious side effects, but in many cases the former are the only solution in the absence of therapeutic alternatives. Nanomedicine has emerged as an alternative, demonstrating its potential to minimize adverse side effects and improve survival and quality of life of the patient. Through in-depth study of the environment and tumor physiology, associated to the unique properties of nanoscale, few nanomedicines have been already approved and many are in clinical use. Although undeveloped, they already represent an alternative in some cancers, and new horizons are opening new ideas and directions towards research in cancer therapy.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>I.1 Definição de nanotecnologia e nanomedicina.....</b>	<b>9</b>
<b>I.2 O Cancro.....</b>	<b>10</b>
<b>I.3 As terapias atuais.....</b>	<b>11</b>
I.3.1 A problemática subjacente às terapias quimioterapêuticas convencionais.....	12
<b>I.4 Ambiente tumoral.....</b>	<b>15</b>
<b>I.5 Barreiras impostas à terapia.....</b>	<b>18</b>
I.5.1 Sistema reticulo endotelial e sistema fagocitário mononuclear.....	18
I.5.2 Filtração renal .....	18
I.5.3 Fluxo sanguíneo irregular .....	19
I.5.4 Pressão intersticial elevada .....	19
I.5.5 Matriz extracelular .....	19
I.5.6 Transporte intracelular.....	19
<b>2. NANOMEDICINAS TERAPÊUTICAS .....</b>	<b>21</b>
<b>I.6 Propriedades chave das terapêuticas nanomedicinas para o cancro.....</b>	<b>22</b>
I.6.1 Direcionamento passivo.....	22
I.6.2 Direcionamento activo.....	25
I.6.3 Direcionamento por propulsão.....	29
<b>I.7 Estratégias de suporte às nanomedicinas terapêuticas .....</b>	<b>30</b>
<b>3. TIPOS DE NANOMEDICINAS TERAPÊUTICAS.....</b>	<b>32</b>
<b>I.8 Lipossomas .....</b>	<b>32</b>
I.8.1 DOXIL <sup>®</sup> .....	33
I.8.2 MYOCET <sup>®</sup> .....	35
I.8.3 DAUNOXOME <sup>®</sup> .....	36
<b>I.9 Polímeros terapêuticos .....</b>	<b>37</b>
<b>I.10 Nanopartículas obtidas a partir de albumina .....</b>	<b>37</b>
I.10.1 ABRAXANE <sup>®</sup> .....	38
<b>I.11 Micelas Poliméricas.....</b>	<b>39</b>
I.11.1 GENEXOL-PM <sup>®</sup> .....	41
<b>I.12 Conjugados Proteína - Polímero .....</b>	<b>41</b>
I.12.1 ONCASPAR <sup>®</sup> .....	42
<b>4. PERSPETIVAS FUTURAS .....</b>	<b>43</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>45</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

WHO – Organização Mundial de Saúde

ADN – Ácido desoxirribonucleico

RES – Sistema Retículo Endotelial

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

BFGF - Fator de crescimento fibroblástico básico

EPR – Efeito de Permeabilidade e Retenção

MDR – Complexo de Multiresistência a Substâncias Ativas

MPS – Sistema Fagocitário Mononuclear

NSCLC - Cancro do pulmão de células não pequenas

PEG – Polietilenoglicol

UPA – Ativador Plasminogénico da Urocinase

HSPC – Fosfatidilcolina de Soja Hidrogenada

DMT – Dose Máxima Tolerada

EPP – Eristrodístesia Palmar Plantar

PGLA – poli-L-ácido-co-glicólico

PCL – poli-E-caprolactona

SPARC – Proteínas ácidas secretadas ricas em cisteína

PVP – Polivinilpirrolidona

pNIPAM – poli-N-isopropilacrilamida

ASNase – Asparaginase

LLA – Leucemia Linfoblástica Aguda

## LISTA DE IMAGENS

- Figura 1** Representação esquemática do percurso de uma nanomedicina terapêutica desde o local de injeção ao local alvo
- Figura 2** Respresentação esquemática do desenvolvimento tumoral inicial até à difusão de nutrientes limitada pelo tamanho
- Figura 3** Representação esquemática de demonstração do efeito de permeabilidade e retenção aumentada das nanopartículas medicinais em tumores
- Figura 4** Representação esquemática das classes principais de primeira geração de nanomedicinas em ensaios clínicos ou em utilização clínica
- Figura 5** Representação esquemática de um corte transversal de lipossoma STEALTH
- Figura 6** Representação esquemática de sistemas direcionados e não direcionados
- Figura 7** Representação esquemática de nanopartículas responsivas a estímulos
- Figura 8** Representação esquemática das nanopartículas inteligentes com *shedding*
- Figura 9** Representação esquemática de um lipossoma revestido de PEG, tal como o MYOCET<sup>®</sup>
- Figura 10** Representação esquemática de ABRAXANE<sup>®</sup>
- Figura 11** Representação esquemática de uma micela polimérica

## 1. Introdução

Durante os últimos anos tem-se vindo a observar um notável interesse na investigação na área das nanociências propulsionado pelo crescente otimismo que a nanotecnologia aplicada à medicina terá avanços significativos no tratamento, diagnóstico e prevenção de doenças (European Science Foundation, 2005)

### 1.1 Definição de nanotecnologia e nanomedicina

O conceito nanotecnologia aplica-se à capacidade de medir, desenhar e manipular materiais à escala atómica, molecular e supramolecular com fim a entender, criar e aplicar estruturas e sistemas com diferentes funções atribuídas pelo tamanho que possuem. Classicamente a definição de nanotecnologia refere-se a matéria com dimensão compreendida num intervalo entre 11 e 100 nanómetros, mas geralmente é alargado até aos 1000 nanómetros. Apesar deste termo ser relativamente recente, a sua génese conceitual, de elaborar partículas de tamanho nanométrico e agregá-las em estruturas ordenadas de forma a obter materiais úteis foi prevista em 1959 pelo Nobel Richard Feynman no seu discurso “*There’s plenty of space in the bottom*” (Venditto and Szoka Jr, 2012). As partículas de tamanho nanométrico exibem propriedades diferentes daquelas que apresentam macrometricamente, e é com base nessa particularidade que trabalhar a essa escala tão pequena que os nanomateriais são tão apelativos de estudar.

A década passada tem vindo a registar inúmeras publicações dedicadas à “nanomedicina”. Convém esclarecer que esta designação está focada somente nas nanotecnologias em torno do panorama clínico e centradas com objetivo de aplicação no doente. Surge portanto como a fusão da nanotecnologia à medicina (Duncan and Gaspar, 2011). São, portanto, sistemas de cedência de substância ativa desenvolvidos para atuar à escala nanométrica com novas propriedades (Foundation, 2005, Amiji, 2006). Segundo o relatório da European Science Foundation de 2005, o domínio da nanomedicina consiste “na ciência e tecnologia do diagnóstico, tratamento e prevenção da doença e injúria traumática, alívio da dor e preservação da saúde humana usando

ferramentas e conhecimento molecular do corpo humano”. Aborda cinco subdisciplinas que se sobrepõem e relacionam no que diz respeito às: ferramentas analíticas, nanoimagemologia, nanomateriais e nanodispositivos, novos sistemas e agentes terapêuticos, e ainda assuntos clínicos, regulatórios e toxicológicos (Foundation, 2005). O alvo da nanomedicina pode ser genericamente definido como a monitorização compreensiva, controlo, construção, reparo, defesa e melhoria dos sistemas biológicos humanos, trabalhando ao nível molecular usando nanoestruturas projetadas para o benefício médico. Assim, a nanoescala deverá compreender componentes ativos ou objetos no intervalo de dimensão desde um a centenas de nanómetros. Estes podem ser incluídos num microdispositivo (com possível macro interface) ou um ambiente biológico. O foco, contudo será sempre nas nano-interações entre o interface maior, ou biologicamente, dentro do sistema subcelular (ou celular) (European Science Foundation, 2005).

## **I.2 O Cancro**

O cancro é uma doença complexa causada por instabilidade genética e acumulação de múltiplas alterações moleculares (Hanahan and Weinberg, 2000). O atual diagnóstico e prognóstico não permitem traduzir toda a heterogenicidade dos tumores e são incapazes de dar uma previsão sobre o sucesso do tratamento (Liotta and Petricoin, 2000, Petricoin et al., 2002). O diagnóstico e tratamento da doença é muitas vezes demasiado tarde, aquando de metastização pelo corpo. À data de apresentação clínica 60% dos pacientes de cancro da mama, pulmão, cólon, próstata e ovário exibem ou escondem já metástases (Menon and Jacobs, 2000). Neste estágio, as modalidades terapêuticas convencionais têm eficiência limitada. As atuais necessidades não solucionadas na oncologia incluem: tecnologias imagiológicas para deteção precoce tumoral; novos métodos para diagnóstico e prognóstico precisos; estratégias para ultrapassar a toxicidade e efeitos adversos para as substâncias ativas quimioterápicos; novas descobertas na biologia tumoral que levem a implementar tratamento para os fenótipos mais agressivos e letais (Nie et al., 2007). O progresso no conhecimento da biologia tumoral levou à diminuição de incidência em alguns tipos de cancro, mas outros permanecem com igual ou superior. Um exemplo é a diminuição da incidência do

cancro do pulmão entre o sexo masculino devido à cessação tabágica, e o aumento entre as mulheres (Shanker et al., 2010).

Num estudo que avaliou o padrão de cancro entre 34 países Europeus, com dados obtidos da Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, WHO) durante os períodos 1990-1994 a 2000-2004 determinou-se que a mortalidade geral de cancro nos países europeus tem vindo a demonstrar uma tendência para a diminuição. Estes dados podem relacionar-se com a crescente implementação tecnologias que permitem rastreios com maior número de deteção de casos com possibilidade de reagirem positivamente a um tratamento precoce (Vecchia et al., 2010). Em Portugal, a WHO, identifica os tipos de cancro que mais mortes causam em Portugal: o cancro do pulmão entre os homens, e cancro da mama entre as mulheres. e do colorectal ocupando segunda posição em ambos os sexos (Ferlay et al., 2008).

### **I.3 As terapias atuais**

Após meio século de investigação de quimioterapia, o cancro permanece uma das doenças mortais mais difíceis de tratar, uma consequência de fatores que incluem limitações nos animais modelo, no conhecimento da diversidade tumoral, na resistência a substâncias ativas e no surgimento de efeitos laterais (Bradbury, 2007).

As terapias atuais envolvem processos intrusivos, como a aplicação de catéteres para a administração dos quimioterapêuticos como fase inicial para diminuição do tamanho tumoral, seguido de cirurgia, se possível, com uma segunda administração de quimioterapêutico e radiação. O objetivo da quimioterapia e radioterapia é aniquilar as células tumorais uma vez que estas lhes são mais suscetíveis por apresentarem um ritmo rápido de divisão celular muito mais rápido que as células normais maduras (Brannon-Peppas and Blanchette, 2012). Os agentes quimioterápicos tratam-se de pequenas moléculas que interferem no funcionamento da maquinaria celular inibindo processos chave como a replicação ou induzindo a apoptose (Feng and Chien, 2003). Foram descobertos durante os anos 60. Os mais proeminentes incluem paclitaxel, doxorrubicina, daunorrubicina, cisplatina, e docetaxel. O paclitaxel e docetaxel pertencem à família dos taxanos, estes que atuam particularmente pela estabilização dos

microtúbulos prevenindo a mitose de progredir a anafase (Rowinsky and Eric, 1997). A doxorubicina e daunorrubicina pertencem à classe das antraciclina. Estas moléculas estão entre as mais eficazes das disponíveis, induzindo o maior grau de citotoxicidade sendo por isso usadas no tratamento a maior variedade de tipos de tumores. (Minotti et al., 2004). Da mesma maneira, a cisplatina, um composto de platina, modifica o ácido desoxirribonucleico (ADN) celular ativando vias de sinalização para a apoptose (Boulikas and Vougiouka, 2003).

### **I.3.1 A problemática subjacente às terapias quimioterapêuticas convencionais**

A grande limitação e ao mesmo tempo única forma de seletividade dos agentes quimioterápicos convencionais reside na atuação apenas nas células em ritmo de divisão acelerado e por consequência incapacidade de distinção entre as células tumorais e células normais com ritmo de renovação naturalmente rápido (Maeda, 2001). É por exemplo o caso dos folículos capilares, epitélio intestinal e medula óssea (Feng and Chien, 2003). É esta característica que lhes associa risco de morbilidade dos pacientes. Consequentemente, os clínicos são obrigados a aceitar a janela terapêutica demarcadamente estreita entre a dose terapêutica da dose com efeitos adversos severos (Ferrari et al., 2011) como única alternativa terapêutica. A limitação da dose, pela janela terapêutica estreita leva a doses menores e mais prolongadas, aumentando desta forma o tempo de contacto com células normais e consequentes efeitos adversos.

Relativamente à formulação das moléculas quimioterápicas, também se colocam diversas questões problemáticas. Estas são administradas na maioritariamente por via intravenosa, e assim colocadas em circulação. A solubilidade é crucial para que a substância ativa alcance o local de ação em determinado tecido. A recorrência a solventes orgânicos tóxicos por vezes é utilizada, fazendo pesar o perfil de efeitos adversos e consequente abandono precoce da terapêutica. Da mesma forma é necessária alcançar a estabilidade de armazenamento da molécula terapêutica, que igualmente traz limitações seja a nível de formulação.

As terapias eficazes desenvolvidas nos últimos anos melhoraram a sobrevivência dos pacientes diagnosticados com cancro. Contudo, a taxa de sobrevivência a cinco anos

permanece desanimadora, estando ainda abaixo dos 15% pelo menos no caso de tumores sólidos de origem epitelial (Greenlee et al., 2000).

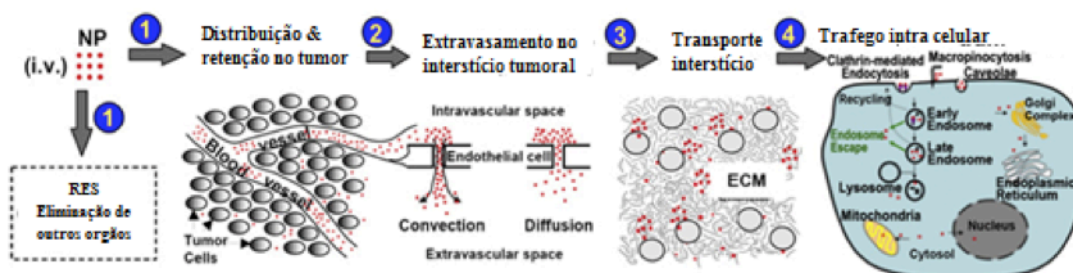
A necessidade de encontrar a “*magic bullet*” referida por Paul Ehrlich, juntou os novos conhecimentos adquiridos da biologia molecular do desenvolvimento do cancro e o conceito de *design* racional de substâncias ativas ou agentes que permitissem estratégias mais específicas, de forma a ultrapassar a barreira da falta de seletividade entre células tumorais e células normais. Surgiram então nos últimos 20 anos agentes como por exemplo o Bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>), com especificidade dirigida exclusivamente a determinados tipos de recetores celulares envolvidos em processos chave do desenvolvimento tumoral e somente expressos na superfície das células tumorais: por exemplo, o receptor HER2 essencial para a transdução de sinal envolvida no crescimento celular e diferenciação (Mendelsohn and Baselga, 2000) que existe sobreexpresso aproximadamente num quarto dos cancros da mama com pior prognóstico e sobrevivência (Alvarez et al., 2010, Morrow et al., 2009). Este foi aprovado e encontra-se em utilização clínica contribuindo em importantes melhorias no tratamento de cancros da mama HER2 positivos. Uma outra estratégia colocada em hipótese é o recurso a segmentos curtos de RNA de interferência (*small interfering*, RNA) que já provaram conseguir induzir *knock down* na expressão de genes com imensa especificidade abrindo uma outra ala de investigação para conceção de substâncias ativas (Petrocca and Lieberman, 2011).

Pela primeira vez descrito por Golub et al.1999 foi referido o *molecular profiling* de tumores. Este consiste na classificação de tumores pelos seus padrões de expressão génica. Com base nesse perfil pode retirar-se informação relativa ao estágio, grau, curso clínico e resposta ao tratamento. O perfil molecular do tumor pode igualmente demonstrar que assinatura de cada metástase é proveniente de uma combinação de fatores presentes no tumor inicial (Golub et al., 1999) (Scherf et al., 2000, Ross et al., 2000). Juntamente com o conhecimento dos marcadores tumorais e o perfil molecular será possível a abordagem de um conceito de medicina preditiva e personalizada (Wang and Thanou, 2010).

Considerando que estes novos agentes são capazes de superar a problemática da especificidade, há que ter em consideração a farmacodinâmica desses mesmos, todo o percurso até ao local alvo. Isto é, que ao longo da via de administração selecionada – maioritariamente a sistémica – a substância ativa terá que manter a sua físicoquímica, preservando a sua integridade farmacológica. Para tal, deverá ser solúvel em meio aquoso, que é o caso do sangue. No entanto, a grande maioria dos quimioterapêuticos é insolúvel, representando uma limitação de formulação da molécula e interferindo com toda a farmacodinâmica e farmacocinética, muitas vezes recorrendo a solventes tóxicos que desenvolvem efeitos adversos pelo uso continuado.

A etapa que seguidamente surgirá será assegurar a dose de substância ativa por tempo suficiente no local alvo, o que permitirá a resposta terapêutica. Portanto, encontrar apenas uma molécula dotada de atividade citotóxica com especificidade não é suficiente. O sistema retículo endotelial (*reticular endothelial system*, RES) é um dos grandes obstáculos nessa rota até ao alvo, tratando-se do conjunto de macrófagos e monócitos responsáveis por removerem da circulação todos os materiais estranhos (Langer et al., 2007).

O transporte no sangue também está sujeito a um sem número de interações não específicas (Ferrari et al., 2011) como proteínas sanguíneas, processos físicos de filtração renal, barreiras físicas celulares entre outros, resultando numa distribuição inespecífica da substância ativa por órgãos saudáveis e consequentemente neles



**Figura 1**

Representação esquemática do percurso da nanomedicina terapêutica desde o local de injeção ao local alvo. (1) Transporte e distribuição para os tumores e outros órgãos via circulação sistémica, incluindo eliminação pelas células do retículo endotelial (RES). (2) Extravasamento pela vasculatura tumoral. (3) Transporte intersticial até atingir as células individuais. (4) Endocitose e tráfego intracelular para sub-organelos (*early* e *late* endossomas, lisossomas, complexo de Golgi, retículo endoplasmático, citosol, mitocôndria e núcleo) (Adaptado de Li et al., 2012)

resultando os efeitos citotóxicos (Ferrari et al., 2011)

Uma vez alcançando o tumor, a substância ativa quimioterápico deparar-se-á com uma série de barreiras físicas e biológicas. É o caso da pressão intersticial intra-tumoral, o fluxo circulatório alterado, a existência de membranas, e a matriz extracelular entre outros (Ferrari, 2010a).

#### **I.4 Ambiente tumoral**

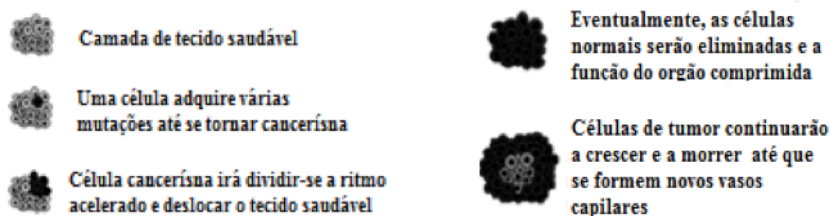
O microambiente tumoral caracteriza-se por um tecido bastante heterogêneo. A sua biologia tem um importante papel na cedência de substância ativa. O entendimento dos fenómenos crescimento, estrutura e fisiologia de um tumor em tudo importam em auxiliar no desenvolvimento de transportadores de substância ativas mais eficientes (Steichen et al., 2013), capazes de ultrapassarem as barreiras normais e advindas da patologia tumoral.

Um tumor surge de uma única célula que sofre uma mutação que faz interromper alguma parte fulcral da via de sinalização apoptótica, causando a sua proliferação descontrolada. A massa crescente de célula atinge uma demanda energética e nutritiva proporcional ao seu ritmo de crescimento e número de células da massa tumoral, competindo com as células normais envolventes e consequentemente movendo-as e destronando-as. Juntamente com um metabolismo acelerado juntam-se-lhes os proporcionais produtos metabólicos. Posto isto, ganha-se um ambiente ácido e hipóxico. Facto esse que, juntamente com a pressão exercida pela massa de células de volume em expansão sobre as células vizinhas, se faz acrescer uma envolvente circulatória sanguínea e linfática deficiente. Esta situação surge pelo desajuste resultante da expansão de tecido tumoral não ser acompanhado da angiogénese equivalente em seu redor (Steichen et al., 2013). Desta forma, nas fases iniciais de crescimento tumoral a nutrição do tumor é assente apenas com base na difusão até ao limite de volume tumoral de  $2 \text{ mm}^3$  (Brown and Giaccia, 1998). A partir deste limite o desenvolvimento do tumor fica dependente de recrutamento de nova vascularização ao tumor – angiogénese – (Brannon-Peppas and Blanchette, 2004, Brown and Giaccia, 1998) que permita continuar a chegada de nutrientes necessários, e remoção dos produtos metabólicos.

Caso não se suceda, no interior do tumor em expansão formar-se-á um centro necrótico. Após iniciar um novo processo de angiogénese, a rede de capilares formados é geralmente heterogeneamente distribuída, com percursos tortuosos e muitas vezes sem continuidade. Os vasos novos surgem com pouco músculo liso e com descontinuidade do pavimento epitelial com aberturas de fenestras de algumas centenas de nanómetros (Jain and Stylianopoulos, 2010) (Hobbs and al., 1998) (Hashimzume, 2000, Brown and Giaccia, 1998) (Baban and Seymour, 1998). O fluxo de sangue desta estrutura será consequentemente heterogéneo. Acrescendo ao facto da drenagem linfática também se demonstrar deficiente, pois só existe na periferia tumoral, ocorre um fenómeno de extravasamento de compostos da circulação, sem drenagem linfática e como tal, resultando num aumento da pressão intersticial tumoral. Esta tem o valor máximo no centro da massa tumoral e decrescente para a periferia. Esta pressão contraria o fluxo no sentido da interiorização das substâncias, seja o caso de substâncias ativas.

Este microambiente tumoral de hipóxia e elevada pressão, contribui também para a seleção das mutações com maior predisposição a formarem metástases, e como tal para o desenvolvimento de resistências. Salienta-se que neste ambiente as células imunitárias ficam fragilizadas e com menor capacidade de deteção, ficando as células tumorais como que invisíveis a deteção (Jain and Stylianopoulos, 2010).

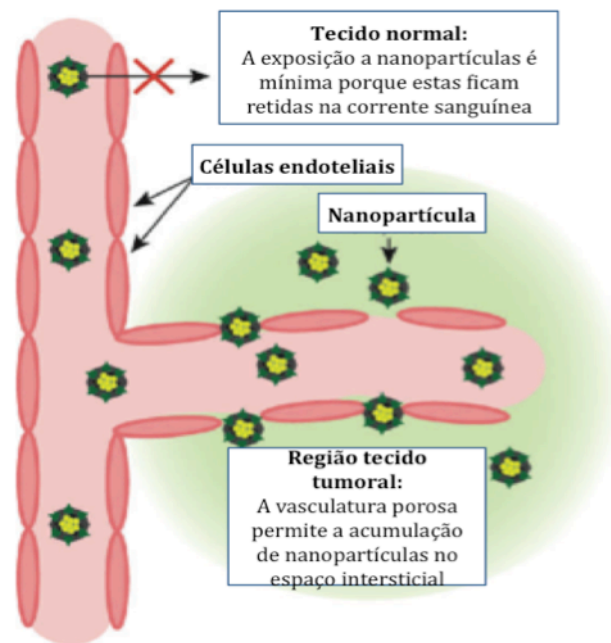
Como acima referido, a vasculatura débil tumoral exhibe poros, fenestras e um sistema linfático pouco definido e funcional. No ambiente tumoral registam-se níveis elevados de moléculas fatores envolvidos na angiogénese: fator de crescimento vascular endotelial (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), que aumenta a permeabilidade



**Figura 2**

Representação esquemática do desenvolvimento tumoral inicial até à difusão de nutrientes limitada pelo tamanho (adaptado de Brannon-Peppas and Blanchette, 2012).

dos vasos sanguíneos pelo aumento do número e tamanho de fenestras entre as células (Roberts and Palade, 1995), fator de crescimento fibroblástico básico (*basic fibroblast growth factor*, BFGF) (Dellian and Witwer, 1996) que recruta células epiteliais durante a angiogênese (Roberts and Palade, 1995) bradicininas em quantidade elevada com depleção de óxido nítrico, que resulta no extravasamento aumentado de macromoléculas pela vasculatura (Matsumura et al., 1988). Dada a insuficiência da drenagem linfática, as moléculas extravasadas de circulação tendem a permanecer retidas na envoltória tumoral.



**Figura 3**

Representação esquemática do efeito de permeabilidade e retenção aumentada das nanopartículas medicinais em tumores. Os vasos normais estão delimitados por células endoteliais, prevenindo o escape de nanopartículas da corrente sanguínea, enquanto os tecidos tumorais sem células endoteliais integras exibem o escape de substâncias e hiperpermeabilidade permitindo acumulação preferencial no espaço intersticial tumoral (Adaptado de Nie et al., 2007).

Todos estes elementos combinados resultam assim num fenómeno apelidado de efeito aumentado de permeabilidade e retenção (*enhanced permeability and retention effect*, EPR) descrito pela primeira vez por Maeda e seus colaboradores explicando a acumulação observada de substâncias ativas lipídicas e outras moléculas ( $M_w > 50kDA$ ) no local do tumor (Maeda, 2001).

Esta hipótese levantou muitas outras que tiveram como objetivo usar este efeito como uma estratégia a depositar mais especificamente as substâncias ativas quimioterápicas nos locais tumorais, principalmente no sentido de prolongar o tempo de circulação de partículas e obter uma maior acumulação – direcionamento passivo.

Sabe-se que há casos em que o EPR não existe. É o caso do cancro do estômago e do pâncreas (Cheng et al., 2012). Barreiras impostas à terapia

## **I.5 Barreiras impostas à terapia**

O transporte do agente terapêutico desde a circulação sistémica até às células tumorais compreende quatro passos: primeiro o transporte pelo sangue até às regiões tumorais pelos vasos sanguíneos; segundo, passarem através da parede do vaso sistémico, passarem através do espaço intersticial tumoral e por último alcançarem as células alvo passando pelas suas membranas celulares (Jain and Stylianopoulos, 2010). Inserido neste trajeto encontram-se diversas barreiras: RES, primeira passagem pela filtração renal, fluxo sanguíneo heterogéneo, pressão intersticial tumoral elevada, matriz extracelular, e transporte intracelular .

### **I.5.1 Sistema reticulo endotelial e sistema fagocitário mononuclear**

O sistema reticulo endotelial e sistema fagocitário mononuclear (*mononuclear phagocyte system*, MPS) consiste no grupo de macrófagos em circulação que tem como função livrar o corpo de objetos estranhos (Owens and Peppas, 2006) e necessitam de opsoninas como agentes de reconhecimento intermediários. As opsoninas, proteínas que englobam imunoglobulinas, sistema complemento (C3, C4 e C5), fibronectinas colagénio tipo I, entre outros. Estas, através do estabelecimento de interações de natureza iónica, eletrostática, hidrófoba, hidrófila e van der Waals (Owens and Peppas, 2006) ligam ao corpo estranho preparando-o para o reconhecimento do RES e sua posterior *clearance* de circulação pela fagocitose de macrófagos e consecutiva digestão numa vesícula intracelular lisossomal (Jones and Harris, 1998).

### **I.5.2 Filtração renal**

A estrutura glomerular consiste num enovelado de um capilar em que todas as partículas dissolvidas no sangue com tamanho inferior a 10 nm são sujeitas a filtração (Davis et al., 2008) (Venturoli and Rippe, 2005).

### **I.5.3 Fluxo sanguíneo irregular**

Resultante dos fenómenos acima referidos, juntamente com a falta de vascularização intratumoral como a da própria vascularização deficiente e heterogénea impõe-se uma barreira tanto pelo alcance ao tumor, pela falta de irrigação, como pela distribuição não uniforme de substância ativa. Isto compromete o alcance de uma acumulação de dose eficaz para obter efeito terapêutico. Demonstrou-se inclusivé que tumores com circulação deficiente são geralmente resistentes ao tratamento (Hori et al., 1991).

### **I.5.4 Pressão intersticial elevada**

O fenómeno observado de pressão intersticial crescente na direção do interior do tumor contraria e impede o fluxo de difusão de substância ativa (Jain, 1998, Liechty and Peppas, 2012).

### **I.5.5 Matriz extracelular**

É composta por proteínas fibrosas como colagénio e elastina juntamente com um fluído viscoso composto de polissacarídeos. Numa situação normal esta composição é uma excelente barreira física à infiltração bacteriana, mas no que diz respeito ao transporte de substâncias ativas nomeadamente a quimioterapêuticos mostra-se capaz de reduzir substancialmente a difusão e distribuição espacial das moléculas de substância ativa no interstício tumoral (Jain, 1998, Jang and Wientjes, 2003).

### **I.5.6 Transporte intracelular**

Quando a substância ativa alcança a célula cancerígena, terá que a internalizar. Este processo é chamado de fagocitose. Daqui se forma uma vesícula intracelular, que se desenvolverá desde o endossoma inicial ao endossoma tardio, pela descida do pH devido às bombas de prótons e inclusão de enzimas proteolíticas. O objetivo desta sequência é a digestão do corpo fagocitado. No entanto, interessa essencialmente que a substância ativa não perca a sua atividade terapêutica (Jones and Harris, 1998). Quando entra por um mecanismo de transporte inespecífico fica sujeito ao fenómeno de

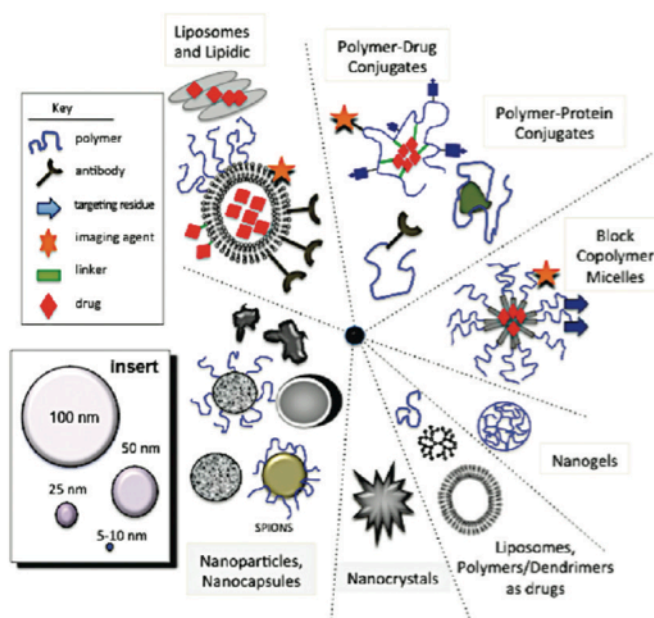
complexo de multiresistência a substâncias ativas (*multidrug resistance complex*, MDR) que possui bombas de efluxo inespecíficas que enviam a molécula fagocitada novamente para o meio intercelular, fenómeno este que se sabe não acontecer quando a internalização é mediada por um recetor (Heidel and Davis, 2011).

## 2. Nanomedicinas terapêuticas

São tipicamente partículas compostas por uma entidade terapêutica, como moléculas de substâncias ativas, péptidos, proteínas e ácidos nucleicos, e componentes que se estruturam/acomodam como entidades terapêuticas. Tais nanomedicinas podem ter efeitos anticancerígenos superiores quando comparadas com os da entidade terapêutica que contêm por si só. Isto deve-se à maior capacidade de especificidade de direcionamento ao tecido tumoral por uma melhor farmacocinética, farmacodinâmica, e cedência intracelular ativa. Estas por sua vez dependem do tamanho, e propriedades de superfície (incluindo a presença de ligandos de direcionamento) das nanopartículas (Davis et al., 2008).

Existe uma tendência na literatura de apelar todas as medicinas nanométricas de nanopartículas (Cho et al., 2008, Petros and DeSimone, 2010). Isto nem é cientificamente correto (pois as nanopartículas constituem uma classe específica de nanomedicinas), nem é de todo uma ajuda pois desvaloriza as características específicas

de cada classe que foram desenvolvidas para o sucesso de cada uma (Duncan and Gaspar, 2011).



**Figura 4**

Representação esquemática das classes principais de primeira geração de nanomedicinas em ensaios clínicos ou em utilização clínica. A imagem exhibe um panorama dos respectivos tamanhos relativos (Duncan and Gaspar, 2011, Cyrus and Ewert, 2012)

A distinção das classes de primeira geração de nanomedicinas compreende essencialmente o tamanho como parâmetro classificador. Surgem os lipossomas (80-200 nm), nanopartículas (20-100 nm), polímeros terapêuticos (5-25 nm), micelas copoliméricas em bloco (50 – 200 nm), nanopartículas de ouro (5-50 nm), e cristais nanométricos

(100 – 1000 nm) (Duncan and Gaspar, 2011).

## **I.6 Propriedades chave das terapêuticas nanomedicinas para o cancro**

As propriedades exploradas pelas novas medicinas veiculadas nanométricamente podem encontrar uma classificação sob um sistema que considera a forma de alcançar a massa tumoral. Poderão surgir individualmente ou conjugados. Consideremos classificação por direcionamento passivo, direcionamento activo, ou direcionamento por pulsátil.

### **I.6.1 Direcionamento passivo**

Esta estratégia de direcionamento tira partido do tamanho ideal, da forma mais conveniente, e da superfície físico-química da partícula nanométrica.

O tamanho deverá em regra estar situado entre 10 nm e 100 nm para que as partículas fiquem confinadas ao sistema circulatório constituído pelos vasos íntegros e normais, pois nestes apenas partículas inferiores a 1-2 nm podem extravasar. Ocorre exceção na irrigação do fígado que permite extravasamento de entidades até 100-150 nm (Davis et al., 2008). O limite inferior impõe-se pela filtração renal, e o limite superior (Venturoli and Rippe, 2005) em função de uma multitude de fatores. Dreher e colaboradores demonstraram experimentalmente que partículas de dextrano com pesos moleculares desde 3.3 kDa até 2 MDa apresentavam permeabilidade decrescente. As maiores ficavam apenas em redor do tumor, enquanto as mais pequenas conseguiram penetrar mais profundamente e com uma distribuição mais homogénea. Este fenómeno relaciona-se com o coeficiente de difusão intersticial que aumenta com a diminuição do peso da molécula que difunde (Dreher et al., 2006). Extrapolando de macromoléculas para partículas nanométricas, o limite superior para participar no EPR é de aproximadamente 400 nm (Alexis et al., 2008). Acima desse valor são incapazes de se difundirem e atingirem uma quantidade com efeito terapêutico (Steichen et al., 2013). No entanto há outros fatores além da participação no EPR. A vasculatura débil e tortuosa em torno do tumor apresenta poros e fenestras de dimensão aproximada entre 50-100 nm que participam como uma das vias de alcance ao tumor. Considerando o

EPR juntamente com a dimensão das janelas derivou-se então um limite superior de 150 nm (Liechty et al., 2011).

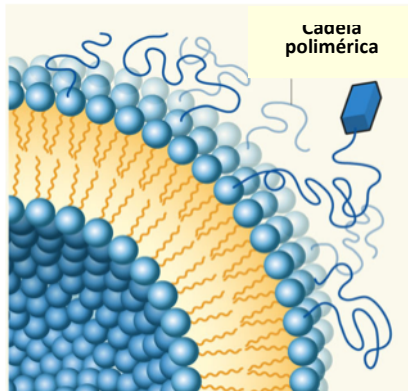
A internalização de partículas foi estudada relativamente ao efeito da forma da partícula: tamanho e geometria. No estudo de Champion e Mitragotri analisou-se como se processava o contacto entre uma partícula esférica ou uma não esférica de poliestireno com macrófagos alveolares. Na forma elíptica de disco, o contacto perante o eixo longitudinal exibia internalização rápida, ao contrário do contacto com o eixo menor que não internalizava nem sequer mais tarde. As esféricas eram rapidamente e totalmente internalizadas. Este efeito mostrou-se independente do tamanho na escala estudada entre 0 a 100% do volume do macrófago. Concluíram que era a simetria responsável por tal eficiência de internalização da partícula esférica (Champion and Mitragotri, 2006). Pouco depois destes resultados, Chan et al. após registarem dados da internalização de partículas esféricas de 14 e 75 nm eram 3.5 a 5 vezes mais que as partículas em bastonete de 74 por 14 nm. O grupo hipotetizou que a diferença poderia estar no grau de curvatura, sendo que quanto menor a curvatura, maior o grau de contacto com a superfície fagocítica e como tal maior propensão para a fagocitose. No entanto, no mesmo estudo foram testadas partículas com o mesmo grau de curvatura e tamanhos 100 e 150 nm. Observou-se que as mais pequenas tinham menor internalização. Daqui se concluiu que a cinética de internalização das partículas são provavelmente ocorre em função da forma e tamanho (Chithrani et al., 2007).

Num outro estudo centrado também na cinética de internalização segundo a forma e tamanho de partículas, comparou-se a taxa de internalização de duas partículas: Ambas cilíndricas, uma com *aspect ratio* (AR = comprimento/diâmetro) 3 e outra AR=1, respetivamente h (altura) = 450 nm com d (diâmetro) = 150 e h = 200 nm e d = 200 nm. As partículas com AR = 3 internalizaram quatro vezes mais rapidamente. No entanto mais tarde ficou visto que não era a alteração de uma das dimensões que ditava a taxa de internalização pois, comparando-a com a de uma terceira partícula com AR = 3 e d = 100 , esta tinha igual taxa à de AR = 1 (Gratton, 2008). Esta relação entre forma e tamanho de partícula permanece por esclarecer, mas assume a importância a ter em conta nos estudos de internalização pelas células do sistema imunitário (Petros and DeSimone, 2010).

A superfície físicoquímica de uma partícula é o meio primário de interação com o ambiente. As partículas nanométricas têm razões superfície/volume elevadas quando comparadas com partículas maiores, e como tal, torna-se crucial o controlo das suas propriedades de superfície, seja para evitar maior número de interações não específicas seja a influência na taxa de dissolução. É necessário figurar todas as interações não específicas que poderão indesejavelmente ocorrer e tentar minimizá-las, já que é impossível removê-las na totalidade. Interações não específicas originariam também entre outras uma distribuição não específica pelo corpo.

É possível trabalhar a superfície em função de alguns parâmetros:

A carga de superfície, representada pelo potencial zeta das partículas, tem vindo a mostrar que influencia a disposição de partículas no interior do tumor. De facto, devido ao tamanho nanométrico a relação superfície/volume ser grande, a carga exibida é crucial. Para se minimizar essa carga utiliza-se polietilenoglicol (PEG), que além de reduzir as interações partícula-partícula também limita eletrostaticamente interações induzidas por outros componentes em circulação (Heidel and Davis, 2011). O reconhecimento pelo RES/MPS é tanto quanto maior for a carga da partícula,



**Figura 5**  
Representação esquemática de um corte transversal de lipossoma STEALTH. O retângulo representa um ligando de especificidade possível de ser acrescentado à cadeia de PEG. (Adaptado de Cyrus and Ewert, 2012)

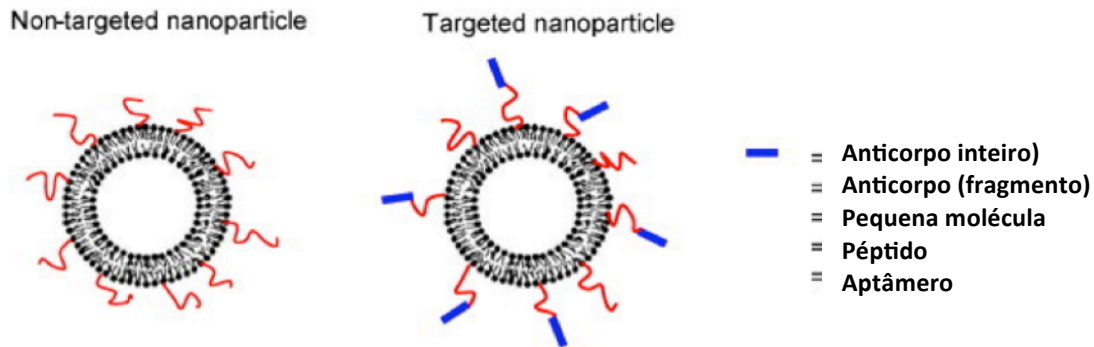
especialmente se tratar de negativa (Fang et al., 2006, Storm et al., 1995). Acresce-se o facto que as superfícies dos vasos sanguíneos e de células apresentam várias cargas negativas estas iriam repelir a nanopartícula, perdendo nestes casos o EPR na zona tumoral (Davis et al., 2008). As proteínas do sangue também sugerem interações com as partículas, e igualmente distribuição não específica resultante (Wang and Thanou, 2010).

Como já foi referido, uma forma de escape da partícula consiste na estabilização estérica através da adição de polímeros hidrófilos e muito flexíveis de polietilenoglicol à sua superfície, um polímero aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA). Este atua escondendo-o do

ambiente através das suas cadeias que formam um emaranhado em torno da partícula e conferindo-lhe propriedades *STEALTH*, impedindo a adsorção das opsoninas (Davis et al., 2008) ao mesmo tempo que diminuem as interações com o ambiente que rodeia. A natureza anfifílica dos lípidos componentes do PEG dispõe-nos em estruturas micelares quando em contacto com a água e a sua inserção na superfície de lipossomas alivia a tensão micelar (Wang and Thanou, 2010). As partículas necessitam de estabilidade tanto *in vitro* (em tampões durante armazenamento) como *in vivo* (estabilidade biológica) (Wang and Thanou, 2010). A forma, densidade e tamanho da cadeia de PEG podem ser modificadas, e ter diferentes efeitos na taxa de *clearance* da partícula. (Steichen et al., 2013). Apesar de não existirem atualmente regras quanto ao tipo e organização de PEG, existem algumas tendências derivadas do extensivo trabalho que tem vindo a ser realizado com lipossomas para terapia do cancro. Estas tendências indicam que o tamanho e densidade de cadeias de PEG são cruciais que controlarão os tempos de circulação e a acumulação nos tumores. Tais camadas de PEG podem interferir com ligandos de direcionamento e inibi-los de interagirem com os recetores correspondentes (Wang and Thanou, 2010). A conformação ideal para o PEG é em escova “*brush*”, para assim conseguir afastar os ligandos, mantendo-os na correta posição de apresentação ao recetor alvo (Wang and Thanou, 2010). Assim, uma vez que já foi provado que a densidade reflete a conformação de PEG (Degennes, 1987), esta toma lugar mais importante que outras características como por exemplo, o tamanho do polímero (Santos et al., 2007). Quanto menor for a *clearance* da partícula e maior tempo de semivida, maior será o tempo de circulação da partícula e assim devido ao EPR se conseguirá obter uma maior acumulação tumoral.

### **I.6.2 Direcionamento activo**

Esta estratégia de atuação usufrui da capacidade de ligandos de reconhecimento/direcionamento encontrarem um recetor complementar a si específico. A adição de uma parte de direcionamento à superfície da partícula nanométrica pretende aumentar a seletividade de ligação e internalização através de endocitose mediada por recetor. Sem a incorporação de ligandos de direcionamento, a partícula fica limitada às interações não específicas com as membranas celulares, estas que após cobertura com polímeros de PEG podem até ficar reduzidas.



**Figura 6**

Representação esquemática de sistemas direcionados e não direcionados. As partículas de direcionamento são funcionalizadas com uma camada externa de ligandos específicos de um recetor, que podem ser anticorpos (inteiros ou fragmentos), pequenas moléculas, péptidos anticorpos ou aptâmeros. A cavidade aquosa pode conter substâncias ativas hidrofílicas (Adaptado de (Wang and Thanou, 2010)).

Na busca da resolução do desafio da seletividade para células tumorais, e lembrando que a superfície destas em pouco se diferencia de uma célula normal, a molécula de ligando deverá demonstrar elevada especificidade para aqueles recetores que caracteristicamente se apresentam em maior concentração à superfície das células tumorais, sem no entanto esquecer que estes também existem mas em menor representação nas células normais. Além de apresentarem elevada especificidade, deverão ser capazes de induzir endocitose mediada por recetor, e escapar ao fenómeno de MDR.

A localização do ligando à superfície da partícula deverá situar-se no topo da camada da *STEALTH*, caso se trate de uma partícula revestida de PEG (Wang et al., 2008), de forma a não esconder o ligando de direcionamento do recetor. Estruturas como anticorpos, proteínas, pequenas moléculas, aptâmeros e péptidos já provaram a capacidade de induzirem este efeito de seletividade em nanopartículas (Wang and Thanou, 2010). Exemplos de ligandos de target com ligação forte aos recetores são seguidamente referidos: anticorpos contra o recetor HER-2, recetor da transferrina (TfR) e o específico contra o recetor do antígeno específico da próstata (PSA). Estes exibem constantes de dissociação na ordem dos nanomolares, remetendo-os para ligações ao recetor muito fortes. (Wang and Thanou, 2010); Os fragmentos de anticorpo, consistem apenas das regiões de ligação Fab, também foram estudados como ligandos de direcionamento. As vantagens destes consistem na ausência da região Fc,

capaz de induzir imunogenicidade (Wang and Thanou, 2010); Proteína ligando natural do recetor da transferrina (TfR), um ligando natural do recetor com grande afinidade de ligação. (Wang and Thanou, 2010); Outra proteína com potencial, o ativador plasminogénico da urocinase (*uracinase plasminogen activator*, UPA), também ligando natural em que o recetor surge sobreexpresso nos cancros do cólon e mama (Wang and Thanou, 2010); Sequências peptídicas são versões de anticorpos ainda mais curtas e pequenas que os fragmentos de anticorpos e proteínas. Derivados de ensaios de *phage display* e de cristalografia de raio-X, são sequências peptídicas pequenas com especificidade ao recetor. É o caso do péptido U11 identificado na região de ligação do recetor do UPA. (Wang and Thanou, 2010). Trabalhos têm sido realizados ao encontro da sua aplicação no cancro da próstata e da mama. (Wang and Thanou, 2010). Um outro exemplo é o péptido RGD, identificado por *phage display* para exibir elevada especificidade ao recetores  $\alpha 5\beta 3$  dos recetores da integrina sobreexpressos na vasculatura angiogénica (Wang and Thanou, 2010); Outros tipos de pequenas moléculas são por exemplo a anisamida, ligando para os recetores sigma sobreexpressos no cancro do pulmão (Banerjee et al., 2004, Li et al., 2008) o ácido fólico, específico para os recetores de folato nas células do ovário (Weitman et al., 1992, Goren et al., 2000, Pan and Lee, 2004).

Acrescendo aos critérios de escolha do ligando direcionamento mais específico para um determinado de tipo cancro há que ter em consideração qual a taxa de internalização (número de moléculas internalizadas por hora) da partícula após ligação ao recetor alvo escolhida. Esta taxa afeta diretamente a acumulação de substância ativa na célula tumoral, que necessita de atingir uma quantidade suficiente à resposta citotóxica em tempo útil aceitável, de acordo com o tempo de circulação no organismo (Wang and Thanou, 2010). Outro parâmetro a ter em consideração é a conjugação do ligando à partícula. Esta deve ser de tal forma ótima que o ligando conjugado à partícula continue a exibir a mesma constante de dissociação do recetor que demonstrou sozinho, e também igual taxa de internalização. Para tal é necessário que a conjugação (e as cadeias de PEG próximas, se for o caso) não interfira na conformação do ligando, idealmente devendo aumentar a interação já existente.

Ambas as partículas, com ligandos de direcionamento ou sem, chegam à vizinhança tumoral via efeito EPR, mas no caso de serem direcionadas terão uma internalização ao tumor melhorada, despoletando o mecanismo de internalização do recetor a que tem afinidade (Wang and Thanou, 2010). Este facto foi já comprovado em numerosas ocasiões, no contexto de vários tipos de sistemas de partículas, que a presença de ligandos de direcionamento não alteram a biodistribuição geral de partículas no tumor mas, em vez disso, aumentam a extensão de internalização celular de partículas que alcançam o tumor – e numa maneira dependente da densidade de ligandos (Choi et al., 2010).

Quanto à concentração de ligandos de superfície, este é outro parâmetro que afeta o efeito de direcionamento de ligandos (Farokhzad and Langer, 2009). As partículas com ligandos podem beneficiar com a adição de mais que um tipo de ligando de superfície, no entanto, a densidade total de ligandos é um parâmetro que necessita de calibração para cada partícula produzida, e que atualmente apenas se pode determinar experimentalmente (Heidel and Davis, 2011).

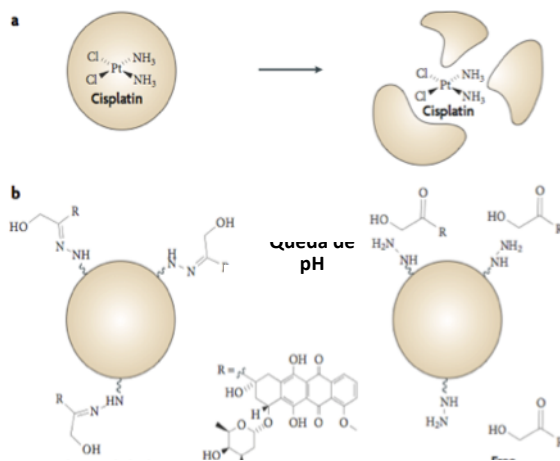
Uma maior concentração de ligandos de superfície não aumenta o número de interações com os recetores celulares (multivalência). Um estudo utilizando um lipossoma com uma quantidade pronunciada de ligandos anticorpos contra o recetor HER-2, levaram a taxas de *clearance* das partículas ligadas mais altas do que das não ligadas (Shmeeda et al., 2009). Pensa-se que uma maior cobertura por ligandos leva à obstrução total da cama de PEG, e por isso cobrindo a sua proteção ao RES e outras interações com proteínas presentes no sistema circulatório (Wang and Thanou, 2010).

Uma análise modelo demonstrou que ligandos de tamanho intermédio ( $M_w \sim 25$  kDa) atingiam os níveis mais baixos de *uptake*, enquanto ligandos mais pequenos que requerem afinidades para o recetor superiores para estabelecerem ligação e ligandos maiores (com afinidades de ligação mais de 100 vezes mais fracas) conseguiam um *uptake* mais elevado (Schmidt and Witturp, 2009). Esta informação é consistente com diversos exemplos publicados de partículas com ligandos (Heidel and Davis, 2011).

Uma das vantagens de adição de ligandos de direcionamento é que esta pode significar uma mais valia na deteção de pequenas metástases ( $<100\text{mm}^3$ ) uma vez que estas ainda não possuem rede vascular própria e logo sem EPR (Cheng et al., 2012). Outra vantagem é que se pensa que ao entrar por transporte mediado por recetor escapa ao MDR (Cheng et al., 2012). No entanto também a partir de uma determinada concentração de ligandos de superfície, estes podem acabar por representar um paradoxo pois poderão esconder as cadeias de PEG e vice versa, perdendo as características vantajosas STEALTH ou especificidade (Wang and Thanou, 2010, Cheng et al., 2012).

### 1.6.3 Direcionamento por propulsão

Um dos maiores benefícios da incorporação de moléculas terapêuticas numa partícula é prolongar a duração do seu efeito terapêutico. Além do aumento do tempo de circulação



**Figura 7**

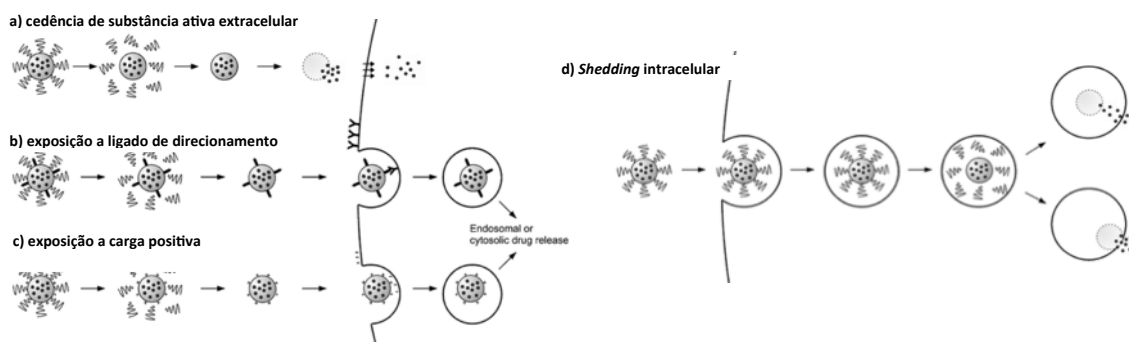
Representação esquemática de nanopartículas responsivas a estímulos. A substância ativa pode estar fisicamente enclausurada (a) ou covalentemente ligada à partícula. (Adaptado de Petros and DeSimone, 2010)

devido a vários fatores já referidos, uma partícula pode ser preparada para ter libertação prolongada da carga de terapêutico de uma forma programada apenas e só quando chegar ao local alvo (Heidel and Davis, 2011) e assim alcançado controladamente a dose terapêutica. Isto é possível pelo desenho de partículas constituídas por materiais responsivos a estímulos – os transportadores responsivos a estímulos. Quanto aos estímulos, estes podem ser internos – como o caso da natureza redutora do citosol comparado com o meio extracelular, ou a queda de

pH que ocorre nos endossomas – ou externos – a exposição a um campo magnético ou a um determinado comprimento de onda. Estes estímulos são usados como por propulsão à quebra de ligações covalentes entre o transportador e a carga, i.e., a partícula e a sua carga de terapêutico, ou como propulsão à destabilização da partícula

facilitando a libertação do seu conteúdo terapêutico assim que chegar ao local alvo programado (Jain, 1987). Num estudo foram ligadas a nanopartículas péptidos penetrantes em células que ficam ativos pelas metaloproteinasas presentes no parênquima tumoral (Cheng et al., 2012). Estudos preliminares sugeriram que péptidos sensíveis a pH formam espontaneamente  $\alpha$ -hélices através das membranas de tumores primários, metástases e em corpos lipídicos necróticos (Cheng et al., 2012).

De forma a poder remover o efeito de escudo de PEG e conseguir melhor penetração intracelular foram desenhadas nanopartículas inteligentes que perdem a sua camada de PEG apenas quando expostos a certos estímulos como cargas positivas ou ligandos de direcionamento, agentes redutores ou proteases (Cheng et al., 2012).



**Figura 8**

Representação esquemática das nanopartículas inteligentes com derrame (*shedding*). Em função do estímulo sentido no microambiente a partícula solta a cobertura STEALTH de forma a mostrar acessíveis os seus ligandos de superfície. Em ambiente extracelular são estímulos os recetores de superfície, cargas positivas membranares. Em ambiente intracelular, os estímulos podem ser o pH lisossomal ou a presença de proteases. (Adaptado de Romberg et al., 2007)

## I.7 Estratégias de suporte às nanomedicinas terapêuticas

Uma das possibilidades de aumentar a permeabilidade tumoral, que pode ser usada para aumentar a acumulação local é a administração de agentes vasoativos como VEGF, trombina, bradicinina, substância P, entre outros. Estes iniciam uma cascata de eventos celulares que resultam na disrupção das junções celulares endoteliais e aumentando assim a permeabilidade vascular. Uma alternativa será subir temporariamente a pressão circulatória sistémica pela infusão de vasoconstritores como a angiotensina II, fazendo diminuir o diferencial entre a pressão sentida no ambiente vascular e avascular tumoral

descrito por Chrastina e Massey, 2011 (Cheng et al., 2012). No entanto permanece a incerteza se estes procedimentos irão originar efeitos adversos que justifiquem a sua utilização, nos vasos saudáveis.

Alternativas mais específicas envolvem o uso de estímulos externos como radiação ionizante para alterar a permeabilidade vascular como descrito em Li et al., 2000, ou a terapia fotodinâmica descrita por Chen et al., 2006 (Cheng et al., 2012). Foi recentemente sugerido que a injeção sistémica de péptido penetrador de tumor (iRGD) poderá também aumentar a permeabilidade vascular e a do tecido de forma específica ao tumor através de interação com a integrina e neurofilina-1 por Sughara et al. 2010 (Cheng et al., 2012).

### 3. Tipos de Nanomedicinas Terapêuticas

Decorridos 50 anos após o discurso de Richard Feynman “*There's plenty of room at the bottom*”, surgem aprovadas e em utilização clínica algumas nanomedicinas, entre as quais seis terapias para o cancro (Venditto and Szoka Jr, 2012).

#### 1.8 Lipossomas

Foi em 1965 que Alec Bangham e colaboradores publicaram a primeira descrição de “sistemas de fosfolípidos intumescidos” (Bangham and Standish, 1965) que vieram a estabelecer a base para os sistemas modelo de membranas (Bangham and Standish, 1965, Bangham et al., 1967). Em poucos anos surgiram variantes de modelos de membranas em bicamada, constituídos de bicamadas individuais, inicialmente apelidados de ‘bangosomes’ e então só depois (Deamer, 2010) foram descritos ‘lipossomas’ (Batzri and Korn, 1973).

Pioneiros como Gregory Gregoriadis, foram responsáveis por demonstrarem que os lipossomas poderiam encerrar substância ativas e funcionarem como sistemas de cedência de substância activa. Outros pioneiros demonstraram que os lipossomas poderiam modificar a distribuição *in vivo* dessas substâncias ativas neles encerradas tal como Alahari et al. 1998, Kimelberg et al. 1976, Poste et al. 1976 e Juliano et al. 1978 (Allen and Cullis, 2012), usando modelos animais tratados com lipossomas contendo citosina arabinósido, registou-se um aumento significativo na sobrevivência de ratinhos com leucemia L1210 (Kobayashi and Tsukagoshi, 1975) (Mayhew et al., 1976). A partir deste muitos estudos se seguiram de forma a verificar qual o efeito de lipossomas de moléculas de outras substâncias ativas como em Alving et al., 1978, Kedar et al. 1980, Cleland et al. 1982, Mehta et al. 1984, Gabizon et al. 1982 (Allen and Cullis, 2012).

Foram as primeiras anfotericina B e doxorubicina lipossomais que originaram os primeiros ensaios clínicos com substâncias ativas lipossomais (Allen and Cullis, 2012). A melhoria dos perfis farmacocinéticos e de biodistribuição registada nesses ensaios levantou a promessa de vir a ser um sistema farmacêutico com benefícios. Hoje existem

cerca de 11 formulações aprovadas para uso clínico, com muitas outras em desenvolvimento pré-clínico (Wang et al., 2012a).

Os lipossomas são vesículas compostas por fosfolípidos com cabeças hidrófilas e cadeias longas hidrófobas, que formam estruturas organizadas esféricas com um núcleo aquoso, e uma camada vesicular. Podem ser compostos de uni ou multibicamadas de lípidos naturais ou sintéticos (Parveen and Sahoo, 2006). Dependendo do seu *design* podem variar desde dezenas de nanómetros aos micrómetros, sendo tipicamente de 100 nm (Torchilin, 2005) ou maiores (Davis et al., 2008). Para terem maior estabilidade de armazenamento e também *in vivo* podem ser cobertos com polímeros PEG (Parveen and Sahoo, 2006). A sua composição é biocompatível e biodegradável, e consegue encapsular agentes hidrófilos no núcleo e hidrófobos na superfície, tornando-os excelentes transportadores de agentes terapêuticos com problemas de solubilidade como quimioterapêuticos e siRNA (Ferrari et al., 2011). A sua superfície é passível de modificação com ligandos de direcionamento ou polímeros (Moghimi et al., 2005).

Os lipossomas, nas suas diversas formas (lipídicas, vesiculares, PEG, etc.) estão entre as nanomedicinas com maior sucesso e com uma *pipeline* em expansão de productos em desenvolvimento (Duncan and Gaspar, 2011).

### **I.8.1 DOXIL<sup>®</sup>**

Foi com o Doxil<sup>®</sup> que em 1995, que esta tecnologia se tornou a primeira nanopartícula a receber aprovação pela FDA para uso. Na Europa tem o nome de Caelyx<sup>®</sup> (Wang et al., 2012b).

O Doxil<sup>®</sup> consiste numa única membrana em bicamada lipídica composta por fosfatidilcolina hidrogenada de soja (*hydrogenated soy phosphatidilcholine*, HSPC) e colesterol com doxorubicina encapsulada no compartimento interno (Gabizon, 2001). O tamanho médio das vesículas compreende-se num intervalo de 80-90 nm (Gabizon et al., 2003). A sua capacidade de carga acima de 15 000 moléculas (Gabizon, 2001). De forma a mitigar a problemática da falta de estabilidade em circulação e sua libertação antecipada foram colocada segmentos de 2000 Da de PEG ligados à sua superfície.

Além de lhe conferirem estabilidade, esta funcionalização torna-as invisíveis ao RES, tornando-se assim partículas STEALTH (Gabizon, 2001, Gabizon et al., 2003).

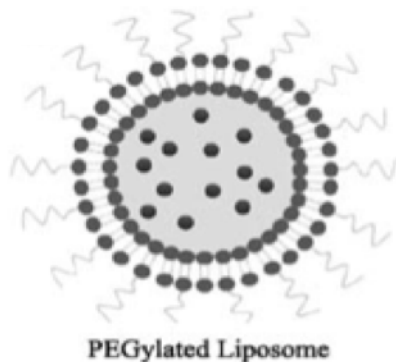
O Doxil<sup>®</sup> baseia-se num mecanismo de direcionamento passivo a fim de acumular nos locais tumorais (Gabizon et al., 2003). Pensa-se que as suas propriedades que o permitem são a combinação de um tempo de circulação longo (semivida 2 a 3 dias) contra 5 minutos da doxorubicina livre (Gabizon, 2001), e a microvascularização dos tumores a par do EPR (Gabizon et al., 1994, Malam et al., 2009). O volume de distribuição é ligeiramente superior ao volume do plasma em si, indicando que ocorre apenas uma pequena extensão de *uptake* pelo tecido saudável. Consequentemente, muitos estudos indicaram que a eficácia do Doxil<sup>®</sup> é substancialmente maior que o da doxorubicina na forma livre numa escala mg-por-mg (Gabizon et al., 2003), devido provavelmente ao mecanismo acima referido. No entanto não existe consenso sobre qual o mecanismo de cedência às células tumorais ou qual a forma de *uptake*. Barenholz (Barenholz, 2012) discute dois mecanismos, mas conclui que o mais provável consiste no colapso do gradiente de sulfato de amónia no fluído intersticial, resultando na libertação da doxorubicina do lipossoma, e seguidamente internalizado pela célula tumoral. Este mecanismo ainda tem falta de provas clínicas evidentes (Wang et al., 2012b).

A sua primeira indicação do DOXIL<sup>®</sup> foi para o tratamento do sarcoma de Kaposi (Gabizon, 2001, Gabizon et al., 2003) e hoje é igualmente aprovado para o cancro do ovário (1998), cancro da mama metastizado (2003) e mieloma múltiplo em combinação com bortezomib (2007) (Davis et al., 2008) (Wang et al., 2012b). Esta formulação não só aumentou o tempo de semivida da doxorubicina 100 vezes comparativamente à molécula livre (Davis et al., 2008), como também diminuiu a cardiotoxicidade e morbilidade (Hamilton et al., 2002). O risco de cardiotoxicidade aumenta após doses de doxorubicina 550 mg/m<sup>2</sup>, o qual tende a ser irreversível (Singal and Iliskovic, 1998). Apesar do seu significativo tempo de circulação superior, o Doxil<sup>®</sup> apresenta número inferior e menos severos efeitos adversos que a molécula livre (Gabizon et al., 1994). Exibe uma queda drástica na cardiotoxicidade da doxorubicina, os anteriores responsáveis pelo efeito limitante da dose. Ensaio clínicos de fase I e II revelaram que a cardiotoxicidade em pacientes com tumores sólidos era insignificante (Gabizon,

2001), atribuído aos níveis de doxorubicina, praticamente insignificantes encontrados em circulação e no próprio coração. A dose máxima tolerada (DMT) de Doxil® foi definida durante ensaios de fase II em 50 mg/m<sup>2</sup> a cada quatro semanas (Muggia et al., 1997). Os efeitos adversos do Doxil® mais comuns são a mucosite e eritrodístesia palmar plantar (EPP) (Gabizon, 2001). A EPP, que é um limitador de dose e posologia dos regimes terapêuticos é o único efeito tóxico do Doxil® (não observado com a doxorubicina livre) e é atribuído ao tempo de circulação alargado dos lipossomas com tendência à acumulação na pele (Gabizon et al., 1997).

### I.8.2 MYOCET®

Está aprovado e no mercado na Europa (2000) e Canadá como tratamento de primeira linha em combinação com ciclofosfamida para cancro da mama metastizado, e nos EUA ainda aguarda aprovação enquanto em ensaio clínico de fase III para cancro da mama HER2 positivo (SopherionTherapeutics, 2001).



**Figura 9**  
Representação esquemática de um lipossoma revestido de PEG, tal como o MYOCET® (Adaptado de (Egusquiaguirre et al., 2012)

É uma formulação cuja maior diferença reside na ausência de funcionalização com PEG à superfície. O lipossoma de Myocet® é composto por uma bicamada membranar de fosfatidilcolina de ovo e colesterol numa razão molar de 55:45. A doxorubicina é introduzida no núcleo aquoso do lipossoma por um processo ativo usando um gradiente de pH; uma vez penetrando o lipossoma as moléculas empilham em fibras que estão não covalentemente ligadas a citrato (SopherionTherapeutics, 2001). Ao contrário do

Doxil®, o Myocet® cede a carga mais rapidamente. Em 24 horas 90% do seu conteúdo é libertado *in vivo* (Alexis et al., 2008). A este fenómeno deve-se à ausência de PEG que estabiliza a membrana e previne a perda de carga do lipossoma (Malam et al., 2009).

As vantagens desta partícula têm relação com a toxicidade, pois sem PEG o tempo de circulação fica significativamente mais curto que com Doxil® (~ 2,5 horas). Estas já

ficam visíveis ao RES, como tal, o Myocet<sup>®</sup> não está associado com EPP e exhibe incidência demarcadamente reduzida de mucosite comparativamente com o Doxil<sup>®</sup> (Alexis et al., 2008). No entanto, continua ainda com tempo de circulação suficientemente grande para assegurar direcionamento passivo dos locais tumorais, e a sua eficácia é essencialmente a mesma que a da doxorubicina na maioria dos testes clínicos (Lammers et al., 2008). A toxicidade mais limitante da dose figurou ser a leucopenia ou neutropenia (Alberts and Muggia, 2004).

### **1.8.3 DAUNOXOME<sup>®</sup>**

O DaunoXome<sup>®</sup> está aprovado nos EUA (1996) e Europa (1996) como primeira linha de tratamento para pacientes com Sarcoma de Kaposi associado a HIV (Galen, 2011) (Allen and Cullis, 2012). Encontra-se atualmente em vários ensaios clínicos a decorrerem ou em recrutamento para ensaios sobre diversas formas de leucemia (Clinicaltrials.gov).

Este lipossoma contém daunorrubicina, uma antraciclina da família da doxorubicina que difere desta apenas num grupo hidroxilo numa posição (Forssen, 1997). Esta molécula foi concebida para superar a baixa estabilidade aquosa da doxorubicina e aumentar a citotoxicidade em certos tipos de tumores (Waterhouse et al., 2001). Este lipossoma consiste numa membrana em bicamada de di-esteroilfosfatidilcolina e colesterol numa razão molar 2:1. A daunorrubicina está sob forma de citrato no núcleo do lipossoma (Fassas and Anagnostopoulos, 2005). As partículas têm aproximadamente 50 nm de diâmetro (Sparano and Winter, 2001) e demonstram elevada estabilidade e perda mínima da daunorrubicina transportada (Forssen and Ross, 1994). Tal como o Doxil<sup>®</sup> e Myocet<sup>®</sup> também funciona mediante mecanismo de direcionamento passivo aos locais tumorais. Devido ao seu tamanho reduzido, rede de carga neutra e incorporação de colesterol e uma molécula lipídica com temperatura de transição de fase elevada, o DaunoXome<sup>®</sup> é capaz de evitar reconhecimento pelo RES e tem um tempo de semivida em circulação de 2-4 horas (Allen and Martin, 2004). Ensaios clínicos iniciais comparativamente à daunorrubicina livre demonstraram maior acumulação tumoral para o DaunoXome<sup>®</sup> do que para a daunorrubicina livre. Após 1 hora os níveis de acumulação tumoral eram de 100 e 9.6 µg/g de tumor, respetivamente

DaunoXome<sup>®</sup> e daunorrubicina livre. Estes resultados nas 11 horas seguintes exibiram nível constante de DaunoXome<sup>®</sup> e progressivamente menores de molécula livre (Forssen, 1997).

## **I.9 Polímeros terapêuticos**

Avanços na ciência dos biomateriais levaram à emergência de nanopartículas poliméricas biodegradáveis e biocompatíveis para inúmeras aplicações. Diversos polímeros sintéticos lineares, ramificados e dendríticos, aprovados pela FDA como o poli-L-ácido-co-glicólico (PGLA) e poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) e naturais (como quitosano, dextranos e polissacarídeos) têm sido investigados para síntese de nanopartículas. Comparativamente aos lipossomas, as nanopartículas poliméricas têm geralmente maior estabilidade, distribuição de tamanho mais precisa, propriedades físico-químicas mais afináveis, perfis de libertação mais sustentados e controláveis e maior capacidade de carga para moléculas terapêuticas com baixa solubilidade aquosa. Esta plataforma polimérica também permite uma maior liberdade na preparação de partículas em função de necessidades específicas. No entanto, apesar destas características apelativas ainda se encontram numa fase precoce de desenvolvimento com apenas um produto aprovado e em uso clínico para o cancro (Zhang et al., 2010) (Duncan and Gaspar, 2011).

Os exemplos seguintes referem nanomedicinas que se inserem na área dos polímeros terapêuticos. A variedade de polímeros trazida pela Química e Nanotecnologia dos polímeros torna possível a criação de diversas nanomedicinas terapêuticas com características inovadoras na cedência de substância ativa. É o caso dos sistemas constituídos por polímeros responsivos a estímulos locais, ou a estímulos externos. Ao mesmo tempo consegue-se que obedeçam aos parâmetros de biodegradabilidade e biocompatibilidade.

## **I.10 Nanopartículas obtidas a partir de albumina**

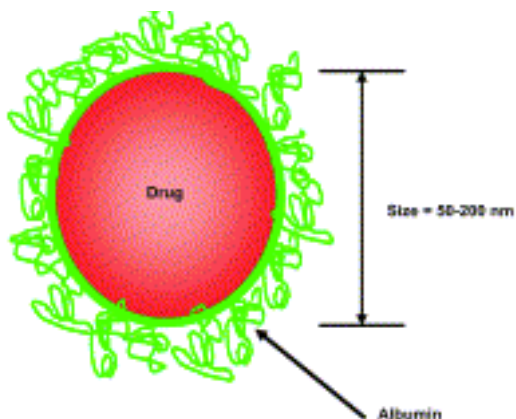
Alguns autores colocam a plataforma que utiliza albumina ligada a uma molécula de substância ativa hidrófoba como transportador terapêutico sob classificação de

nanopartícula polimérica por considerarem a albumina um polímero natural. É o caso de (Egusquiaguirre et al., 2012). No entanto Duncan e Gaspar, 2011, excluem-na da classificação de polímeros terapêuticos e colocam-na sob nanopartícula proteica (Duncan and Gaspar, 2011).

A albumina é uma molécula proteica naturalmente presente na circulação sanguínea como transportador de moléculas hidrófobas através de uma ligação não covalente reversível (Hawkins et al., 2008). Adicionalmente, a albumina pode ligar ao recetor gp60 e mediar transcitose da molécula ligada à albumina (Desai et al., 2006). Estas características tornam-na um vetor apelativo para moléculas hidrófobas.

### I.10.1 ABRAXANE®

O Abraxane® (nab-paclitaxel ou ABI 007) foi introduzido no mercado em 2005 para o tratamento de cancro da mama em pacientes que reportaram progressão da doença



**Figura 10**  
Representação esquemática de ABRAXANE®  
(Cortesia da AbraxisBioscience (Foote, 2007))

mesmo após terem recebido quimioterapia para cancro metastizado após 6 meses de terapia adjuvante em que a terapia anterior teria incluído já uma antraciclina a menos que clinicamente contraindicada (AbraxisBioScience).

Tratam-se de nanopartículas de 130 nm, sem solventes, homogenizadas em albumina de soro humano a 3-4%, pelo que é passível de administrar doses mais elevadas que a dose standard de terapia com paclitaxel livre. Apesar do paclitaxel clinicamente ser muito ativo, está associado e inúmeros efeitos secundários que usualmente impedem o uso mais prolongado em pacientes. Um vasto número desses efeitos adversos têm sido associados aos veículos utilizados na formulação de forma a solubilizar a molécula livre que é hidrófoba. Um desses solventes é o Cremóforo-EL (CrEL) e é responsabilizado pelas reações de hipersensibilidade dos pacientes durante a terapia *in vitro* o CrEL causou edema axonal, desmielinização e degeneração axonal

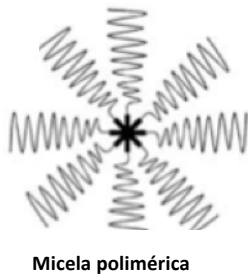
resultando em neuropatias. O uso de CrEL exige portanto prémedicação com antihistamínicos e corticoesteróides para prevenção da hipersensibilidade e apesar da prémedicação aproximadamente 40% dos pacientes apresenta reações menores (por exemplo, *rash*) e 3% irá desenvolver condições de risco de vida. Além destes efeitos graves para o paciente, o CrEL também provoca desgaste dos plásticos de PVC dos sistemas de infusão de administração. Também provoca alterações no perfil lipoproteico com consequente hiperlipidemia do paciente (Cucinotto et al., 2013). Esta nova formulação de paclitaxel permite a entrega ao tumor de 4.5 vezes mais substância ativa que na forma livre, acedendo ao mecanismo de transporte da gp60 para o meio extravascular com posterior invaginação formando *caveolae (cavloin-1)* (Hawkins et al., 2008), vesículas transcitóticas e também acumulação tumoral de nanopartículas ligadas a proteínas ácidas secretadas ricas em cisteína (*secreted protein, acidic and rich in cysteine, SPARC*) que são sobreexpressas em muitos tumores sólidos incluindo bexiga, próstata e pâncreas. (Authier et al., 2000, Ibrahim et al., 2002).

Em ensaio clínico de fase III o nab-paclitaxel demonstrou eficácia superior e toxicidade reduzida quando comparado com a formulação de paclitaxel livre (Taxol) (Egusquiaguirre et al., 2012) (Guarneri et al., 2012). Propôs-se como razão do aumento de eficácia tanto pelo aumento do *uptake* do meio intravascular como pelo aumento do transporte para as células tumorais (Hawkins et al., 2008).

Atualmente, várias outras indicações estão a ser estudadas em ensaios clínicos como primeira linha para cancro da mama metastizado, cancro do pulmão de células não pequenas (non small cell lung cancer, NSCLC), cancro recorrente do ovário, peritoneal, ou das trompas de falópio em pacientes sensíveis às platinas (Wang et al., 2012b). Outras novas tecnologias recentes levaram ao desenvolvimento de formulações novas de paclitaxel como é o caso do Genexol-PM também em mercado (Cucinotto et al., 2013).

### **I.11 Micelas Poliméricas**

As micelas são sistemas coloidais, na escala nanométrica, obtidas a partir da auto-agregação de blocos copoliméricos que podem ser bibloco, tribloco ou copolímeros de



**Figura 11**  
Representação esquemática de uma micela polimérica (Adaptado de Egusquiaguirre et al., 2012).

enxerto (Sutton et al., 2007) que formam agregados macromoleculares anfifílicos em solução aquosa com estrutura de um núcleo lipófilo e uma camada hidrófila (Sahoo and Labhasetwar, 2003). Dependendo do tamanho relativo dos segmentos hidrófobo e hidrófilo e das condições do solvente podem apresentar diferentes morfologias. A maioria das micelas com aplicação em estudo são esféricas. Os tipos de copolímeros disponíveis variam bastante, obedecendo a critérios de biodegradação e biocompatibilidade. O mais comum é o PEG com peso molecular 2-15 kD e pela sua neutralidade de carga consegue reduzir interações inespecíficas com proteínas plasmáticas. Outros exemplos de polímeros hidrofílicos são a polivinilpirrolidona (PVP) ou o poli-N-isopropilacrilamida (pNIPAM). Para o segmento hidrófobo o mais comum é a utilização de materiais como poliésteres hidrófobos, poliéteres, polipéptidos ou poli- $\beta$ -aminoésteres. Os poliésteres e poliamidas que podem sofrer degradação enzimática ou hidrolítica são considerados biodegradáveis. (Sutton et al., 2007). A degradação hidrolítica ou enzimática da ligação entre os blocos copoliméricos pode originar libertação controlada. Por exemplo, Gillies et al. prepararam uma micela que sobre estímulo ácido sofre desagregação da parte hidrófoba levando à libertação do conteúdo do núcleo (Gillies and Frechet, FCF, 2005). Os agentes terapêuticos podem estar acoplados à camada hidrófila, ou encerrados no núcleo hidrófobo da micela se tratarem de substâncias ativas pouco solúveis (Bawarski et al., 2008). A estrutura “núcleo parede” possibilita diversas vantagens por exemplo: a solubilização de quimioterápicos insolúveis no núcleo hidrófobo; permitem um maior tempo de circulação devido à proteção do PEG sob a opsonização e *uptake* RES; pelo seu reduzido tamanho (10-100 nm) permitem administração por injetável e exibem acumulação pelo efeito EPR; por fim, devido à química dos polímeros permitem a multifuncionalização de superfície de forma a aumentar a acumulação e internalização tumoral (Sutton et al. 2007).

As micelas poliméricas permitem aumentar a solubilidade de substâncias ativas quimioterapêuticas e aumentar o seu tempo de semivida com menor toxicidade sistémica (Sutton et al., 2007). Estas propriedades já foram demonstradas em ensaios

clínicos no Japão, Coreia e EUA (Danson et al., 2004, Matsumura et al., 2004, Kim et al., 2004).

### **I.11.1 GENEXOL-PM<sup>®</sup>**

Devido ao sucesso do Abraxane<sup>®</sup>, outras formulações de paclitaxel foram criadas. Neste caso, uma micela polimérica formulada com paclitaxel, sem solvente e hidrossolúvel foi obtida, o Genexol-PM<sup>®</sup> (PEG-poly (D,L-lactide)-paclitaxel) ou (micela PEG-PLA) (Chen, 2010). Esta micela é constituída por copolímeros de PEG e PLA, um poliéster. O diâmetro varia entre 20 – 50 nm (Wang et al., 2012a). É a primeira nanomedicina da classe a ser aprovada, (até à data apenas na Coreia do Sul, 2008) para o tratamento do cancro da mama e do pulmão. Está em ensaio clínico de fase II nos EUA e Rússia. Até agora, no ensaio de fase I, do total de 21 pacientes tratados 14% obtiveram respostas parciais em que 2 desses foram refratários a terapia anterior com taxanos (Kim, 2004). Tal como o Abraxane<sup>®</sup> este não necessita de prémedicação como é o caso da terapia com Taxol. Um ensaio de fase II, em pacientes com cancro da mama metastizado, em 39 pacientes, 5 tiveram respostas completas (13%), 19 parciais (49%) e 13 estabilizaram a doença (3%) e 2 tiveram progressão da doença (5%). No entanto pela neuropatia de grau 3 registada 17 pacientes tiveram que receber redução da dose (Davis et al., 2008). Comparativamente ao taxol, a dose máxima tolerada 390 mg/m<sup>2</sup> (Avramis and Tiwari, 2005) e tempo de semivida aumentam (Sutton et al., 2007).

## **I.12 Conjugados Proteína - Polímero**

O uso de conjugados para cedência de substância ativa foram propostos pela primeira vez em 1975 (Ringsdorf, 1975). Os conjugados têm um *design* tripartido típico: o polímero solúvel em água, um ligante biodegradável e a proteína conjugada reativa (que se poderia tratar dum uma substância ativa). O recurso à utilização de ligantes responsivos ao pH também é possível. Desta forma conseguem libertação da proteína reativa ativando-a no local tumoral (Liechty and Peppas, 2012). Também pode agregar ligandos de direcionamento específico. Uma proteína poder-se-á considerar um polímero de aminoácidos, mas aqui convém diferenciá-los pois a sequência definida de

aminoácidos numa proteína não acontece obrigatoriamente numa sequência de monómeros de um polímero (Avramis and Tiwari, 2005).

### **I.12.1 ONCASPAR®**

A Asparaginase (ASNase), uma enzima naturalmente produzida por microrganismos, catalisa a hidrólise da L-asparagina a ácido aspártico e amónia. Foi identificada como potencial quimioterapêutico para a leucemia linfoblástica aguda (LLA) em 1961. As células LLA necessitam de asparagina e são incapazes de a sintetizar, enquanto as células saudáveis são. Como tal, a ASNase priva as células cancerígenas LLA levando-as à morte celular (Avramis and Tiwari, 2005).

Existem duas formas de ASNase no mercado: uma ASNase derivada de *E.coli* – Elspar da Merck – e a PEGasparase, Oncaspar® da Enzon – a partir da matéria excedentária de produção da Elspar. A conjugação de PEG à enzima por ligação covalente permite aumentar o raio hidrodinâmico, prolongar o tempo de circulação e de retenção, diminuir a proteólise, diminuir a excreção renal e proteger os epítopes antigénicos sem interferir com o local de interação com o substrato, e por este motivo diminuindo o efeito adverso de hiperssensibilidade (Avramis and Tiwari, 2005) (Jarrar et al., 2006). Como tal, comparativamente ao Elspar, permite um menor número de administrações alcançar o mesmo efeito terapêutico (Jarrar et al., 2006, Lenz, 2007). O Oncaspar® está aprovado pela FDA desde 1994 para doentes com LLA, desde 2006 como primeira linha da quimioterapia multiagente em doentes LLA (Lenz, 2007).

## 4. Perspetivas Futuras

São inúmeras as possibilidades de trabalhar à escala nanométrica. Diversas ideias revolucionárias surgem publicadas em primeiros estudos. O papel do *design* da partícula toma lugar de destaque. Seguem-se alguns exemplos. Relativamente ao tamanho, autores como Hubbel (*École Polytechnique Fédérale de Lausanne*, Suíça) dizem que 100 nm não é suficientemente pequeno, pois ao tomar lugar fora de circulação fica encravado ao penetrar o tumor, principalmente quando se tratam de tumores com matrizes ricas em redes de colagénio como o cancro pancreático e mamário. Katoka (*University of Tokyo*, Japão), responsável pelo desenvolvimento do primeiro polímero transportador de substância ativa nos anos 80, está atualmente a liderar um ensaio clínico de fase II com uma partícula polimérica de 30 nm transportadora de cisplatina em doentes com cancro do pâncreas. Os resultados de fase I demonstraram um duplo aumento no tempo de sobrevivência entre os 5 meses até aos 12 meses (Bourzac, 2012).

Uma das mais promissoras aplicações de nanopartículas transportadoras de substâncias ativas consiste na tecnologia de silenciamento de genes em que pequenos segmentos de RNA são enviados para *shut down* de genes cruciais. Este RNA é o RNA de interferência - iRNA. Davis, investigador da *CalTech* Pasadena, Califórnia, desenvolveu um polímero transportador que absorve as cargas positivas assim que é bombeado para o interior de endossomas. Isto cria um gradiente de pressão osmótica que eventualmente rebentará a célula cancerígena e libertando o iRNA antes da destruição (Bourzac, 2012).

Outros investigadores estão a estudar a fusão das tecnologias da robótica e ciência de computadores para a criação de novas ideias terapêuticas. Um protótipo criado pelo grupo de investigação de George Church, na Universidade de Harvard em Cambridge, Massachusetts, consiste numa técnica DNA origami. Através do acionamento de circuitos lógicos, como se de um computador se tratasse, o DNA monta-se sob forma de caixa e cria um furo que abre sob a presença da sua “chave” pela ligação de marcadores de superfície específicos. Church apelidou a partícula de *nanobot*, pois é pela presença de dois inputs presentes (dois marcadores moleculares) na célula tumoral que a caixa se abre libertando a carga de substância ativa. Esta é uma solução a combater tipos de cancro como a leucemia que não exibem apenas um tipo de marcador tumoral, evitando

actuar nas células saudáveis. De momento ainda se encontra em fase de produção de caixas de DNA suficientes para testar em modelos animais (Bourzac, 2012).

Uma outra ideia surgiu de Bhatia, investigadora do *Massachusetts Institute of Technology*, Boston. Bathia está a programar sistemas naturais com robótica para elaborar cocktails inteligentes de terapias anticancerígenas que comunicam entre si, como se tratasse do *quorum sensing* notado nas bactérias que se sentem entre elas. A ideia é tentar alcançar metástases e ao serem detetadas pelas partículas terapêuticas, estas comunicarem essa informação a outras partículas terapêuticas para tal programadas. Demonstrações iniciais resultaram em acumulação de 40 vezes maior quantidade no tumor do que sem esta tecnologia de quimioterapias comunicantes. Bathia explica que a ideia é completar um circuito de mensagem entre as partículas participantes como se de um carreiro de formigas se tratasse (Bourzac, 2012).

Assim, se entende que nanomedicina terapêutica não se resume apenas a formulações monótonas, mas também ao cruzamento da tecnologia com a imaginação. Trata-se de uma vasta área de conhecimento a explorar, a aperfeiçoar, tanto a nível de resultados que façam competição terapêutica e económica às soluções atuais, como pelo surgimento de soluções terapêuticas para cancros sem cura.

## 5. Referências Bibliográficas

- ABRAXISBIOSCIENCE ABRAXANE<sup>®</sup> Healthcare Professional Prescribing Information.  
[http://www.abraxane.com/hcp/download/abraxane\\_prescribing\\_information.pdf](http://www.abraxane.com/hcp/download/abraxane_prescribing_information.pdf)
- ALBERTS, D. & MUGGIA, F. M. 2004. Efficacy and safety of liposomal anthracyclines in phase I/II clinical trials. *Seminars in Oncology*, 31, 53-90.
- ALEXIS, F., PRIDGEN, E., MOLNAR, L. K. & FAROKHZAD, O. C. 2008. "Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles". *Molecular Pharmacology*, 5, 505-515.
- ALLEN, C. & CULLIS, P. R. 2012. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 13.
- ALLEN, T. & MARTIN, F. 2004. Advantages of liposomal delivery systems for anthracyclines. *Seminars in Oncology*, 31, 5-15.
- ALVAREZ, R. H., VALERO, V. & HORTOBAGYI, G. N. 2010. *Journal of Clinical Oncology*. 28, 3366-3379.
- AMIJI, M. M. 2006. *Nanotechnology for Cancer Therapy*.
- AUTHIER, N., GILLET, J. & FIALIP, J. 2000. Description of a short-term Taxol-induced nociceptive neuropathy in rats. *Brain Research*, 887, 239-249.
- AVRAMIS, V. & TIWARI, P. 2005. Asparaginase(native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Nanomedicine*, 1, 241-254.
- BABAN, D. F. & SEYMOUR, L. W. 1998. "Control of vascular permeability". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 34, 109-119.
- BANERJEE, R., TYAGI, P., LI, S. & HUANG, L. 2004. Anisamide targeted STEALTH liposome: a potent carrier for targeting doxorubicin to human prostate cancer cells. *International Journal of Cancer*, 112, 693-700.
- BANGHAM, A. D. & STANDISH, M. M. 1965. Endothelial endocytic pathways: gates for vascular drug delivery. *Current Vascular Pharmacology*, 2, 281-299.
- BANGHAM, A. D., STANDISH, M. M., WATKINS, J. C. & WEISSMAN, G. 1967. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipid membrane system, Protoplasma. *Journal of Molecular Biology*, 63, 183-187.
- BARENHOLZ, Y. 2012. Doxil<sup>®</sup>-the first FDA approved nano drug: lessons learned. *Journal of Controlled Release*, 160, 117-134.
- BATZRI, S. & KORN, E. D. 1973. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochemistry Biophysical Acta*, 16, 1015-1019.
- BAWARSKI, W., CHIDLOWSKY, E. & BHARALI, D. 2008. Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine*, 4, 273-282.
- BOULIKAS, T. & VOUGIOUKA, M. 2003. "Cisplatin and platinum drugs at the molecular level (Review)". *Oncological Repository*, 10, 1663-1682.
- BOURZAC, K. 2012. Carrying drugs. *Nature*.
- BRADBURY, R. 2007. Overview. In: BRADBURY, R. (ed.) *Cancer*. Springer Berlin Heidelberg.
- BRANNON-PEPPAS, L. & BLANCHETTE, J. O. 2004. "Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 1649-1659.
- BRANNON-PEPPAS, L. & BLANCHETTE, J. O. 2012. "Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 206-212.

- BROWN, J. M. & GIACCIA, A. J. 1998. "The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy". *Cancer Research*, 58, 1408-1416.
- CHAMPION, J. A. & MITRAGOTRI, S. 2006. "Role of target geometry in phagocytosis". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103, 4930-4934.
- CHEN, Z. 2010. Small molecule delivery by nanoparticle for anticancer therapy. *Trends in molecular Medicine*, 16, 594-602.
- CHENG, Z., ZAKI, A., HURI, J. Z. & TSOURKAS, A. 2012. "Multifunctional Nanoparticles: Cost versus benefit of adding targeting and imaging capabilities". *Science*, 338, 903-910.
- CHITHRANI, B. D., CHAN, W. C. W. & 2007. "Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes". *Nano Letters*, 7, 1542-1550.
- CHO, K., WANG, X., NIE, S., CHEN, Z. & SHIN, D. M. 2008. "Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer". *Clinical Cancer Research*, 14, 1310-1316.
- CHOI, C. H., ALABI, C. A., WEBSTER, P. & DAVIS, M. E. 2010. "Mechanism of active targeting in solid tumors with transferrin containing gold nanoparticles". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 107, 1235-40.
- CLINICALTRIALS.GOV "Danoxome" AND "Phase 3". <http://clinicaltrials.gov>, National Institutes of Health. Consultado online em Julho 2013.
- CUCINOTTO, I., FIORILLO, L., GUALTIERI, S., ARBITRIO, M., CILIBERTO, D., STAROPOLI, N., GRIMALDI, A., LUCE, A., TASSONE, P., CARAGLI, M. & TAGLIAFERRI, P. 2013. Nanoparticle Albumin Bound Paclitaxel in the Treatment of Human Cancer: Nanodelivery Reaches Prime-Time. *Journal of Drug Delivery*, 10.
- CYRUS, R. S. & EWERT, K. K. 2012. Liposomes derived from molecular vases. *Nature Genetics*, 489, 372-374.
- DAVIS, M. E., CHENG, Z. & SHIN, D. M. 2008. "Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer". *Nature Reviews Drug Discovery*, 7, 771-782.
- DEAMER, D. W. 2010. From "bangosomes" to liposomes: a memoir of Alev Bangham. *FASEB Journal*, 24, 1308-1310.
- DEGENNES, P. G. 1987. "Polymers at an interface - a simplified view". *Advanced Colloidal Interface*, 27, 189-209.
- DELLIAN, M. & WITWER, B. P. 1996. Quantitation and physiological characterization of angiogenic vessels in mice. Effect of basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor, and host environment. *American Journal of Pathology*, 149, 59-71.
- DESAI, N., TRIEU, V. & YAO, Z. 2006. Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free albumin bound paclitaxel, abi-007, compared with cremophor based paclitaxel. *Clinical Cancer Research*, 12, 1317-24.
- DREHER, M. R., LIU, W. & MICHELICH, C. R. 2006. "Tumor vascular permeability, accumulation and penetration of macromolecular drug carriers". *Journal of National Cancer Institute*, 98, 335-344.
- DUNCAN, R. & GASPAR, R. 2011. Nanomedicine(s) under the Microscope. *Molecular Pharmaceutics*, 8.

- EGUSQUIAGUIRRE, S., IGARTUA, M., HERNANDEZ, R. & PEDRAZ, J. 2012. Nanoparticle delivery systems for cancer therapy: advances in clinical and preclinical research. *Advances in Translational Oncology*, 14, 83-93.
- FANG, C., SHI, B. & PEI, Y. 2006. In vivo tumor targeting necrosis factor loaded STEALTH nanoparticles: effect of Me PEG molecular weight and particle size. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27, 27-36.
- FAROKHZAD, O. C. & LANGER, R. 2009. "Impact of nanotechnology on drug delivery". *ACS Nano*, 3, 16-20.
- FASSAS, A. & ANAGNOSTOPOULOS, A. 2005. The use of liposomal daunorubicin in acute myeloid leukemia. *Leukemia and Lymphoma*, 46.
- FENG, S. S. & CHIEN, S. 2003. Chemotherapeutic engineering: application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. *Chemical Engineering Sciences*, 58, 4087-4114.
- FERLAY, J., SHIN, H. R., BRAY, F., FORMAN, D., MATHERS, C. & PARKIN, D. M. 2008. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10, GLOBOCAN. *GLOBOCAN*.
- FERRARI, M. 2010a). Frontiers in cancer nanomedicine: directing mass transport through biological barriers. *Trends in Biotechnology*, 28, 131-132.
- FERRARI, M., BLANCO, E., HSIAO, A., RUIZ-ESPARZA, G., LANDRY, M. G. & MERIC-BERNSTAM, F. 2011. Molecular targeted nanotherapies in cancer: Enabling treatment specificity. *Molecular Oncology*, 5, 492-503.
- FOOTE, M. 2007. Using nanotechnology to improve the characteristics of antineoplastic drugs: Improved characteristics of nab-paclitaxel compared with solvent-based paclitaxel. In: EL-GEWELY, M. R. (ed.) *Biotechnology Annual Review*. Elsevier.
- FORSSEN, E. A. 1997. The design and development of Daunoxome<sup>®</sup> for solid tumor targeting in vivo. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 24, 133-150.
- FORSSEN, E. A. & ROSS, M. E. 1994. Daunoxome<sup>®</sup> treatment of solid tumors preclinical and clinical investigations. *Journal of liposome research*, 4, 481-512.
- FOUNDATION, E. S. 2005. ESF Forward Look on Nanomedicine 2005. In: (EMRC), E. M. R. C. (ed.) *ESF Forward Look on Nanomedicine 2005*. Strasbourg, France: European Science Foundation.
- GABIZON, A. 2001. Pedylated liposomal doxorubicin: metamorphosis of an old drug into a new form of chemotherapy. *Cancer Investigation*, 19, 424-436.
- GABIZON, A., CATANE, B. & UZIELY, B. 1994. Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene glycol coated liposomes. *Cancer Research*, 54, 987-992.
- GABIZON, A., GOREN, D., HOROWITZ, T., TZEMACH, D., LOSSOS, A. & SIEGAL, T. 1997. Long circulating liposomes for drug delivery in cancer therapy: A Review of biodistribution studies in tumor bearing animals. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 24, 337-344.
- GABIZON, A., SCHMEEDA, H. & BARENHOLZ, Y. 2003. Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin: review of animal and human studies. *Clinical Pharmacokinetics*, 42, 419-436.
- GALEN, U. S. 2011. DaunoXome<sup>®</sup>: daunorubicin citrate liposome injection. <http://daunoxome.com/download/Daunoxome%20PI.pdf>, Acedido online em 2/8/2013.
- GILIES, E. & FRECHET.FCF 2005. pH-responsive copolymer assemblies for controled release of doxorubicin. *bioconjugated chemistry*, 16, 361-368.

- GOLUB, T. R., SLONIM, D. K. & TAMAYO, P. 1999. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 286, 531-537.
- GRATTON, S. E. 2008. "The effect of particle design on cellular internalization pathways". *Proc. Natl. Acad. Science USA*, 105, 11613-11618.
- GREENLEE, R. T., MURRAY, T., BOLDEN, S. & WINGO, P. A. 2000. Cancer statistics, 2000. *Cancer Journal for Clinicians*, 50, 7-33.
- GUARNERI, V., DIECI, M. & CONTE, P. 2012. Enhancing intracellular taxane delivery: current role and perspectives of nanoparticle albumin bound paclitaxel in the treatment of advanced breast cancer. *Expert Opinion in Pharmacotherapy*, 13, 395-406.
- HAMILTON, A., BIGANZOLI, L., COLEMAN, R., MAURIAC, L. & 2002. A phase I clinical and pharmacokinetic study of polyethyleneglycol liposomal doxorubicin (Caelyx/Doxil®) at a 6 week interval in patients with metastatic breast cancer. *European Organization for research and treatment of cancer annual review*, 13, 910-918.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- HASHIMZUME, H. 2000. "Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness". *American Journal of Pathology*, 156, 1363-1380.
- HAWKINS, M., SOON-SHIONG, P. & DESAI, N. 2008. Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 876-85.
- HEIDEL, J. D. & DAVIS, M. E. 2011. Clinical Developments in nanotechnology for cancer therapy. *Pharmacological Research*, 28, 187-199.
- HOBBS, S. K. & AL., E. 1998. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 4607-4612.
- HORI, K., SUZUI, M. & TANDA, S. 1991. Characterization of heterogeneous distribution of tumor blood flow in rat. *Cancer Science*, 82, 109-117.
- IBRAHIM, N., DESAI, N. & LEGHA, S. 2002. Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor-free, protein stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel. *Clinical Cancer Research*, 8, 1038-1044.
- JAIN, R. K. 1987. Transport of molecules across tumor vasculature. *Cancer Metastasis Reviews*, 6, 559-593.
- JAIN, R. K. 1998. "Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors". *Journal of Controlled release*, 53, 49-67.
- JAIN, R. K. & STYLIANOPOULOS, T. 2010. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 7, 653-664.
- JANG, S. H. & WIENTJES, M. G. 2003. Drug delivery and transport to solid tumors. *Pharmacological Research*, 20, 1337-1350.
- JARRAR, M., GAYNON, P. & PERCILOU, A. 2006. Asparaginase depletion after pegylated E.coli asparaginase treatment and induction outcome in children with acute lymphoblastic infirt bone marrow relapse: a children's oncology group study. *pediatric blood and cancer*, 47, 141-146.
- JONES, A. & HARRIS, A. L. 1998. New developments in angiogenesis: a major mechanism for tumor growth and target for therapy. *Cancer Journal Scintific American*. 209-217.
- KIM, T. 2004. Phase I and pharmacokinetic study of genexol-pm® a cremophor free, polymeric micelle formulated paclitaxel, in patients with advanced malignancies. *Clinical Cancer Research*, 10, 3708-3716.

- KOBAYASHI, T. & TSUKAGOSHI, Y. S. 1975. Enhancement of the cancer chemotherapeutic effect of cytosine arabinoside entrapped in liposomes in mouse leukemia L-210. *Gann*, 66, 719-720.
- LAMMERS, T., HENNINK, W. E. & STORM, G. 2008. Tumor targeted nanomedicines: principles and practise. *British Journal of Cancer*, 99, 392-397
- LANGER, R., PEER, D., KARP, J. M., HONG, S., FAROKHZAD, S. & MARGALIT, R. 2007. "Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy". *Nature Nanotechnology*, 2, 751-760.
- LENZ, H. 2007. Management and preparedness for infusion and hypersensitivity reactions. *Oncologist*, 12, 601-609.
- LI, S. D., CHONO, S. & HUANG, L. 2008. Efficient oncogene silencing and metastasis inhibition via systemic delivery of siRNA. *Molecular Therapy*, 16, 942-6.
- LI, Y., WANG, J., WIENTJES, M. G. & AU, J. L. S. 2012. Delivery of nanomedicines to extracellular and intracellular compartments of a solid tumor. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 29-39.
- LIECHTY, W. B., CALDORERA-MOORE, M., PHILIPS, M. A., SCHOENER, C. A. & PEPPAS, N. A. 2011. Advanced molecular design of biopolymers for transmucosal and intracellular delivery of chemotherapeutic agents and biological therapeutics. *Journal of Controlled release*, 155, 119-127.
- LIECHTY, W. B. & PEPPAS, N. A. 2012. Expert opinion: Responsive polymer nanoparticles in cancer therapy. *European Journal of Pharmaceutics in cancer therapy*, 80, 241-246.
- LIOTTA, L. & PETRICCINI, E. 2000. Molecular profiling of human cancer. *Nature Reviews Genetics*, 1, 48-56.
- MAEDA, H. 2001. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor selective macromolecular drug targeting. *Advances in Biological Regulation*, 189-207.
- MALAM, Y., LOIZIDOU, M. & SEIFALIAN, A. M. 2009. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30, 592-599.
- MATSUMURA, Y., YAMAMOTO, T. & MAEDA, H. 1988. Involvement of the kinin-generating cascade in enhanced vascular permeability in tumor tissue. *Cancer Science*, 1327-1334.
- MAYHEW, E., PAPAHAADJOPOULOS, D., RUSTUM, Y. M. & DAVA, C. 1976. Inhibition of tumor cell growth in vitro and in vivo by 1-beta-D-arabionofuranosylcytosine entrapped within phospholipid vesicles. *Cancer Research*, 36, 4406-4411.
- MENDELSON, J. & BASELGA, J. 2000. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene*, 19, 6550-6565.
- MENON, U. & JACOBS, I. J. 2000. Recent developments in ovarian cancer screening. *Current opinion in Obstret. Gynecology*, 12, 39-42.
- MINOTTI, G., MENNA, P., SALVATORELLI, F., CAIRO, G. & GINANI, L. 2004. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 56, 185-229.
- MOGHIMI, S. M., HUNTER, A. C. & MURRAY, J. C. 2005. Nanomedicine: Current status and future prospects. *FASEB Journal*, 311-330.
- MORROW, P. K., ZAMBRANA, F. & ESTEVA, F. J. 2009. Recent advances in systemic therapy: advances in systemic therapy for HER2-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research*, 11, 207.

- MUGGIA, F. M., HALNORTH, J. D. & JEFFERS, S. 1997. Phase II study of liposomal doxorubicin in refractory ovarian cancer: antitumor activity and activity and toxicity modification by liposomal encapsulation. *Journal of Clinical Oncology*, 15, 987-993.
- NIE, S., XING, Y., KIM, G. J. & SIMONS, J. W. 2007. Nanotechnology Applications in Cancer. *Annual Reviews of Biomedicine*, 9, 257-288.
- OWENS, D. E. & PEPPAS, N. A. 2006. Oppsonization, biodistribution and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmacology*, 307, 93-102.
- PARVEEN, S. & SAHOO, S. K. 2006. Nanomedicine: clinical applications of polyethylene glycol conjugated proteins and drugs. *Clinical Pharmacokinetics*, 45, 956-958.
- PETRICCOIN, E. F., ZOON, K. C., KOHN, E. C., BARRET, J. C. & LIOTTA, L. 2002. Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1, 683-95.
- PETROCCA, F. & LIEBERMAN, J. 2011. Promise and challenge of RNA interference-based therapy for cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 29, 747-754.
- PETROS, R. & DESIMONE, J. M. 2010. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutics applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9, 615-627.
- RINGSDORF, H. 1975. Structure and properties of pharmacologically active polymers. *Journal of polymer Science Part C: Polymer Symposium*, 51, 135-153.
- ROBERTS, W. C. & PALADE, G. E. 1995. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *Journal of Cell Science*, 108, 2369-2379.
- ROMBERG, B., HENNINK, W. E. & STORM, G. 2007. Sheddable coatings for long circulating nanoparticles. *Pharmaceutical Research*.
- ROSS, D. T., SCHERF, U. & EISEN, M. B. 2000. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nature Genetics*, 24, 227-235.
- ROWINSKY, M. & ERIC, K. 1997. The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. *Annual Reviews of Medicine*, 48, 353-374.
- SAHOO, S. K. & LABHASETWAR, V. 2003. Nanotechnology approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discovery Today*, 8.
- SANTOS, N., ALLEN, C. & DOPPEN, A. M. 2007. Influence of poly(ethylene glycol) grafting density and polymer length on liposomes: relating plasma circulation lifetimes to protein binding. *Biochemistry Biophysical Acta*, 1768, 1367-77.
- SCHERF, U., ROSS, D. T. & WALTHAM, M. 2000. A gene database for the molecular pharmacology of cancer. *Nature Genetics*, 24.
- SCHMIDT, M. N. & WITTURP, K. D. 2009. A modeling analysis of the effects of molecular size and binding affinity. *Molecular Cancer Therapies*, 8, 2861-71.
- SHANKER, M., JIN, J., BRANCH, C. D., MIYAMOTO, S., GRIMM, E. A., ROTH, J. A. & RAMESH, R. 2010. Tumor suppressor gene based nanotherapy: From test tube to the clinic. *Journal of Drug Delivery*, 2011.
- SHMEEDA, H., TZEMACH, D., MAK, L. & GABIZON, A. 2009. HER-2 targeted pegylated liposomal doxorubicin: retention of target specific binding and cytotoxicity after in vivo passage. *Journal of Controlled Release*, 136, 155-60.
- SINGAL, P. K. & ILISKOVIC, N. 1998. Doxorubicin induced cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*, 339, 900-5.
- SOPHERIONTHERAPEUTICS 2001. Myocet®: doxorubicin hydrochloride (liposome) for injection.

- SPARANO, J. & WINTER, E. 2001. Liposomal anthracyclines for breast cancer. *seminars in oncology*, 28, 32-40.
- STEICHEN, S. D., CALDORERA-MOORE, M. & PEPPAS, N. A. 2013. "A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics". *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48, 416-427.
- STORM, G., BELLIO, S. O., DAEMEN, T. & LASIS, D. D. 1995. "Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by mononuclear phagocyte system". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 17, 31-48
- SUTTON, D., NASONGKLA, D., BLANCO, E. & GAO, J. 2007. Functionalized Micellar Systems for Cancer Targeted Drug Delivery. *Pharmaceutical Research*, 26, 1029-1046.
- TORCHILIN, V. P. 2005. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 145-160.
- VECCHIA, C. L., BOSETTI, C., LUCCHINI, F., BERTUCCIO, E., NEGRI, E., BOYLE, P. & LEVI, F. 2010. Cancer mortality in Europe, 2000–2004, and an overview of trends since 1975. *Annals of Oncology*, 21, 1323-260.
- VENDITTO, V. J. & SZOKA JR, F. C. 2012. Cancer Nanomedicines: So many papers and so few drugs!. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 9.
- VENTUROLI, D. & RIPPE, B. 2005. Ficoll and dextran vs. globular proteins as probes for testing glomerular permselectivity: effects of molecular size, shape, charge and deformability. *American Journal of Physiology*, 288, 605-613.
- WANG, A. Z., GU, F. & ZHANG, L. 2008. "Biofunctionalized targeted nanoparticles for therapeutic application". *Expert Opinion Biological Therapy*, 8, 1063-70.
- WANG, A. Z., LANGER, R. & FAROKHZAD, O. C. 2012a. Nanoparticle Delivery of cancer Drugs. *Annual Reviews of Medicine*, 63, 185-198.
- WANG, M. & THANOU, M. 2010. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacological Research*, 62, 90-99.
- WANG, R., BILLONE, P. S. & MULLET, W. M. 2012b. Nanomedicine in action: An overview of cancer nanomedicine on the market and in clinical trials. *Journal of Nanomaterials*, 2013.
- WATERHOUSE, D. N., TARDI, P. G., MAYER, L. D. & BALLY, M. B. 2001. A comparison of liposomal formulations of doxorubicin with drug administered in free form: changing toxicity profiles. *Drug Safety*, 24, 920-937.
- ZHANG, L., ARYZAL, S. & HU, C. J. 2010. Nanoparticle assisted combination therapies for effective cancer treatment. *Therapeutic Delivery*, 1, 323-334.