

Juliana Gomes de Oliveira

**Funcionalização de nanossistemas com anticorpos monoclonais para o
direcionamento ativo: estado da arte**

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2022

Juliana Gomes de Oliveira

**Funcionalização de nanossistemas com anticorpos monoclonais para o
direcionamento ativo: estado da arte**

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2022

Juliana Gomes de Oliveira

**Funcionalização de nanossistemas com anticorpos monoclonais para o
direcionamento ativo: estado da arte**

Atesto a originalidade do trabalho,

Juliana Gomes de Oliveira

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

Porto, 2022

RESUMO

Alguns dos tratamentos convencionais utilizados em determinadas doenças, como as doenças oncológicas, doenças inflamatória/autoimunes, doenças infecciosas, e doenças cardiovasculares, vêm apresentando diversas limitações, seja pela liberação imediata do fármaco na circulação sanguínea, pela falta de especificidade aos recetores de superfície celular, ou pela presença de efeitos colaterais.

A presente dissertação tem como objetivo apresentar as diferentes estratégias de direcionamento/vetorização que podem acompanhar os diferentes nanossistemas como veiculadores de fármacos, com o intuito de ultrapassar as limitações das formas farmacêuticas ditas convencionais. Os nanossistemas apresentam a capacidade de veicular os fármacos para o local alvo (e.g., microambiente tumoral), permitindo proteção adicional do fármaco com o ambiente biológico e uma liberação controlada. Quando se pretende aumentar a quantidade de fármaco que atingiu o local alvo, recorre-se a uma estratégia de direcionamento ativo, como por exemplo, a funcionalização com anticorpos monoclonais (mAbs) à superfície do nanossistema. Os mAbs consistem numa alternativa de ligandos de direcionamento ativo devido à sua capacidade de reconhecer e interagir seletivamente com os recetores de superfície sobreexpressos diferencialmente em determinados órgãos, tecidos, células ou organelos celulares. No entanto, os mAbs têm algumas limitações, devido às suas características estruturais, tais como, o diâmetro elevado.

Estas estratégias têm contribuído, quer seja para obter um tratamento mais direcionado, como no caso do cancro, quer seja para diagnóstico e teranóstico, devido às propriedades fototérmicas inerentes a alguns nanossistemas que permitem a sua utilização como agentes de imagem. Novos estudos têm vindo a ser efetuados nesta área, razão pela qual é de esperar o desenvolvimento de novas estratégias de direcionamento para os nanossistemas, como a substituição dos mAbs por fragmentos de anticorpos.

Palavras-chave: nanossistemas; anticorpos monoclonais; direcionamento ativo.

ABSTRACT

Some of the conventional treatments used in certain diseases, such as oncological diseases, inflammatory/autoimmune diseases, infectious diseases, and cardiovascular diseases, have presented several limitations, either by the immediate release of the drug into the bloodstream, by the lack of specificity to cell surface receptors, or the presence of side effects.

The present dissertation aims to present the different targeting/vectoring strategies that can accompany the various nanosystems as drug carriers, in order to overcome the limitations of the so-called conventional pharmaceutical forms. Nanosystems have the ability to deliver drugs to the target site (e.g., tumor microenvironment), allowing additional protection of the drug from the biological environment and controlled release. When it is intended to increase the amount of drug that has reached the target site, an active targeting strategy is used, such as the functionalization with monoclonal antibodies (mAbs) on the surface of the nanosystem. mAbs are an alternative of active targeting ligands due to their ability to recognize and selectively interact with surface receptors differentially overexpressed in certain organs, tissues, cells or cellular organelles. However, mAbs have some limitations due to their structural characteristics, such as their large diameter.

These strategies have contributed, whether to obtain a more targeted treatment, as in the case of cancer, or for diagnosis and theranostics, due to the photothermal properties inherent to some nanosystems that allow their use as imaging agents. New studies have been carried out in this area, which is why it is expected the development of new targeting strategies for nanosystems, such as the replacement of mAbs by antibody fragments.

Keywords: nanosystems; monoclonal antibodies; active targeting.

Dedico esta dissertação a todas pessoas que estão a lutar contra algum tipo de cancro ou que perderam entes queridos pelo mesmo, em especial, ao meu avô paterno que, neste momento, luta contra um cancro em fase terminal, e à minha avó materna, que faleceu devido ao mesmo.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à minha orientadora, a Professora Doutora Carla Martins Lopes, pela sua dedicação, confiança, disponibilidade para o esclarecimento de dúvidas e pelos seus conhecimentos transmitidos.

À minha família, em especial aos meus pais Maria Elisa e Feliciano, e as minhas irmãs Vanessa e Cátia, por todo o apoio e confiança que depositaram em mim, mesmo à distância, bem como pela força que sempre me transmitiram, impulsionando-me sempre a alcançar os meus objetivos.

Ao meu namorado Gonçalo, por querer sempre o melhor para mim e por ter me incentivado a não desistir dos meus sonhos.

Aos meus amigos, em especial à Filipa e ao Tiago, que estiveram comigo e me apoiaram durante todo o percurso académico, agradeço por todos os conselhos, disponibilidade e amizade.

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

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
AGRADECIMENTOS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. DESENVOLVIMENTO.....	3
2.1 Nanotecnologia na área da saúde	3
2.1.1 Nanossistemas para veiculação de fármacos.....	5
i. Nanossistemas de base orgânica.....	7
ii. Nanossistemas de base inorgânica	16
2.2 Estratégias de direcionamento/vetorização	23
2.2.1 Direcionamento para as células do sistema reticuloendotelial (SRE).....	24
2.2.2 Direcionamento passivo	25
2.2.3 Direcionamento ativo	29
2.3 Anticorpos monoclonais: estrutura e função.....	33
2.3.1 Anticorpos como agentes de direcionamento e o seu mecanismo de ação	38
2.3.2 Tipos de anticorpos monoclonais.....	40
i. mAbs murinos	40
ii. mAbs quiméricos e mAbs humanizados	42
iii. mAbs humanos.....	43
2.4 Nanossistemas conjugados com anticorpos monoclonais ou com fragmentos de anticorpos	47
2.4.1 Vantagens e limitações.....	49
2.4.2 Aplicações biomédicas.....	50
i. Terapêutica	50
ii. Diagnóstico.....	53
iii. Teranóstico	54
III. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	57
IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cronograma dos principais marcos históricos dos nanossistemas.....	6
Figura 2. Classificação dos lipossomas de acordo com o diâmetro e número de bicamadas lipídicas (SUV, LUV e MLV), e o respetivo local de veiculação dos compostos hidrófobos e hidrófilos	8
Figura 3. As diferentes estruturas das NPs poliméricas: (A) nanoesferas, (B) nanocápsulas.....	10
Figura 4. Incorporação de fármaco na matriz lipídica das SLN e dos NLC	12
Figura 5. Representação esquemática da formação da micela	13
Figura 6. Ilustração estrutural de um dendrímero.	15
Figura 7. Exemplos de tipos de AuNPs que são utilizadas para diversas aplicações biomédicas, incluindo na veiculação de fármacos: (A) nanobastões; (B) nanoconchas; (C) nanoestrelas; (D) nanoesferas.....	17
Figura 8. Estrutura das SPIONs, composta por um núcleo de óxido de ferro e por um material de revestimento.....	19
Figura 9. Representação esquemática da estrutura dos MSNs.....	20
Figura 10. Estrutura dos QDs com a presença de grupos funcionais acoplados à superfície do nanossistema.....	21
Figura 11. Representação das PSiNPs com a presença de poros cheios de ar	22
Figura 12. Ilustração das diferenças de um tecido saudável e de um tecido com o EPR (tecido afetado por patologia), no qual este último apresenta um epitélio descontínuo com as junções das células endoteliais soltas, e o posterior extravasamento dos nanossistemas	26
Figura 13. (A) Adsorção das opsoninas no nanossistema por reconhecimento de uma substância estranha; (B) Efeito furtivo com a funcionalização do nanossistema com cadeias de PEG	28

Figura 14. Exemplos de ligandos utilizados na funcionalização dos nanossistemas para o direcionamento ativo	32
Figura 15. Estrutura básica de uma molécula de Ig	34
Figura 16. Representação dos processos de indução de morte celular (ADCP, ADCC e CDC) comumente usados pelos anticorpos	39
Figura 17. Diferentes tipos de mAbs, segundo a sua nomenclatura.....	40
Figura 18. Representação esquemática dos mecanismos mais comuns de funcionalização de nanossistemas com mAbs	48
Figura 19. Comparação de resultados na avaliação da (A) viabilidade celular e (B) apoptose celular das diferentes conjugações das NPs e o controlo	51
Figura 20. Exemplo representativo do resultado da tomografia de projeção ótica de um ratinho saudável (controlo) e aterosclerótico, localizando a molécula VCAM-1 no arco aórtico	54
Figura 21. Imagens microscópicas, in vitro, das colónias GCSCs quando estas estão submetidas sob o tratamento com GNS-PEG-CD44v6 e GNS-PEG, após a irradiação com o laser NIR.....	55

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de mAbs que foram aprovados pela FDA e/ou EMA para uso terapêutico, preventivo e/ou de diagnóstico.	45
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ADC: Conjugados anticorpo-fármaco (do inglês, *antibody-drug conjugates*)

ADCC: Citotoxicidade celular dependente de anticorpos (do inglês, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*)

ADCP: Fagocitose celular dependente de anticorpos (do inglês, *antibody-dependent cellular phagocytosis*)

AuNPs: Nanopartículas de ouro

AuNRs: Nanobastões de ouro (do inglês, *gold nanorods*)

AuNSs: Nanoconchas de ouro (do inglês, *gold nanoshells*)

BHE: Barreira hematoencefálica

Cascata 'CAPIR': Circulação, acumulação, penetração, internalização e libertação (do inglês, *circulation, accumulation, penetration, internalization, drug release*)

CD: Cluster de diferenciação

CDC: Citotoxicidade dependente do complemento (do inglês, *complement-dependent cytotoxicity*)

CDRs: Regiões determinantes de complementaridade (do inglês, *complementary determining regions*)

CdSe: Cádmio-selênio

CH: Região constante da cadeia pesada (do inglês, *heavy chain constant region*)

CHO: Células de ovário de hamster chinês (do inglês, *chinese hamster ovary cell*)

CL: Região constante da cadeia leve (do inglês, *light chain constant region*)

CMC: Concentração micelar crítica

C1q: Componente complemento 1q

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

DOX: Doxorrubicina

EGFR: Recetor do fator de crescimento epidérmico (do inglês, *epidermal growth factor receptor*)

EMA: Agência Europeia do Medicamento (do inglês, *European Medicines Agency*)

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

Fab: Fragmento de ligação ao antigénio (do inglês, *fragment antigen-binding*)

Fc: Fragmento cristalino (do inglês, *fragment crystallizable*)

FDA: *Food and Drug Administration*

FRs: Recetores de folato (do inglês, *folate receptors*)

FGFRs: Recetores de fatores de crescimento de fibroblastos (do inglês, *fibroblast growth factor receptors*)

Fu: Fucoïdan

GCSCs: Células-tronco cancerígenas gástricas (do inglês, *gastric cancer stem cells*)

GNS: Nanoestrelas de ouro (do inglês, *gold nanostars*)

GRAS: Geralmente reconhecidos como seguros (do inglês, *generally recognized as safe*)

HACA: Anticorpos humanos anti-quiméricos (do inglês, *human anti-chimeric antibody*)

HAHA: Anticorpos humanos anti-humanos (do inglês, *human anti-human antibodies*)

HAMA: Anticorpos humanos anti-murinos (do inglês, *human anti-mouse antibodies*)

HDL: Lipoproteína de alta densidade (do inglês, *high density lipoprotein*)

HER2: Recetor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (do inglês, *human epidermal growth factor receptor 2*)

HFt: Cadeia pesada de ferritina (do inglês, *ferritin heavy chain*)

HPPS: Péptido-fosfolípido do tipo HDL (do inglês, *HDL-mimicking peptide phospholipid scaffold*)

Igs: Imunoglobulinas

IL: Interleucina

ISO: *International Organization for Standardization*

LUV: Vesículas unilamelares grandes (do inglês, *large unilamellar vesicles*)

mAbs: Anticorpos monoclonais (do inglês, *monoclonal antibodies*)

MAC: Complexo de ataque à membrana (do inglês, *membrane attack complex*)

MAL: Maleimida

MLV: Vesículas multilamelares (do inglês, *multilamellar vesicles*)

MSNs: Nanopartículas de sílica mesoporosa (do inglês, *mesoporous silica nanoparticles*)

NHS: N-hidroxisuccinimida

NIR: Infravermelho próximo (do inglês, *near infrared*)

NK: *Natural killer*

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

NPs: Nanopartículas

N3: Nutlin-3

PAMAM: Poliamidoamina

PBS: Tampão fosfato (do inglês, *phosphate buffered saline*)

PEG: Polietilenoglicol

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

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

PLL: Poli-L-lisina

PPI: Polipropilenoimina

PSi: Silício poroso (do inglês, *porous silicon*)

PSiNPs: Nanopartículas de silício poroso (do inglês, *porous silicon nanoparticles*)

Pt: Cisplatina

PTAs: Agentes de transdução fototérmica (do inglês, *photothermal transduction agents*)

PTT: Terapia fototérmica (do inglês, *photothermal therapy*)

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

Rit: Rituximab

RM: Ressonância magnética

RNA: *Ribonucleic acid*

ROS: Espécies reativas de oxigênio (do inglês, *reactive oxygen species*)

scFv: Fragmentos variáveis de cadeia única (do inglês, *single-chain variable fragment*)

siRNA: *Small interfering RNA*

SLN: Nanopartículas lipídicas sólidas (do inglês, *solid lipid nanoparticles*)

SMF: Sistema mononuclear fagocitário

SPIONs: Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (do inglês, *superparamagnetic iron oxide nanoparticles*)

SRE: Sistema reticuloendotelial

ssDNA: *Single stranded DNA*

SUV: Vesículas unilamelares pequenas (do inglês, *small unilamellar vesicles*)

TAMs: Macrófagos associados ao tumor (do inglês, *tumor-associated macrophage*)

TC: Tomografia computadorizada

TfRs: Recetores de transferrina (do inglês, *transferrin receptors*)

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

US: Ultrassonografia

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

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

VEGFR: Recetor do fator de crescimento endotelial vascular (do inglês, *vascular endothelial growth factor receptor*)

VH: Região variável da cadeia pesada (do inglês, *heavy chain variable region*)

VL: Região variável da cadeia leve (do inglês, *light chain variable region*)

ZnS: Sulfeto de zinco

I. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a nanomedicina tem demonstrado apresentar um grande potencial devido aos resultados terapêuticos obtidos, como por exemplo, aumento da biodisponibilidade dos fármacos (Morales-Cruz *et al.*, 2019; Pearce *et al.*, 2019). Algumas das razões para estes acontecimentos resultam do facto de os nanossistemas conseguirem veicular e proteger os fármacos, bem como, a sua capacidade de direcionamento/vetorização do fármaco (Li *et al.*, 2017c; Pearce *et al.*, 2019).

O direcionamento é um mecanismo conhecido em diferentes áreas da saúde, que auxilia na entrega direcionada e específica do fármaco para o local alvo (Kraft *et al.*, 2014; Smerkova *et al.*, 2020). A entrega específica, por sua vez, permite um aumento da concentração de fármaco no local pretendido e, conseqüentemente, um alcance de resultados terapêuticos desejáveis e uma redução dos efeitos secundários (Deshpande *et al.*, 2013).

Estes benefícios permitem que a estratégia de direcionamento apresente a capacidade de tratar, prevenir e diagnosticar diversas doenças, nomeadamente as doenças oncológicas (e.g., cancro do pescoço, colorretal, pulmão de não pequenas células, mama), doenças inflamatórias/autoimunes (e.g., esclerose múltipla, artrite reumatoide, doença de Crohn), doenças infecciosas (e.g., bacterianas, fúngicas e virais), e doenças cardiovasculares (e.g., hipercolesterolemia familiar, hemoglobinúria paroxística noturna, trombose pós-operatório), como é retratado na literatura (Weissig *et al.*, 2014; Shepard *et al.*, 2017; Smerkova *et al.*, 2020). Entre as doenças citadas, o cancro é das doenças mais pesquisadas e utilizadas na terapia direcionada, uma vez que é a segunda doença que provoca mais mortes no mundo (Morales-Cruz *et al.*, 2019). Adicionalmente, os tratamentos convencionais para o cancro não apresentam especificidade para o microambiente tumoral, resultando na destruição de células e tecidos saudáveis, possibilitando a presença de efeitos colaterais associados (Ponziani *et al.*, 2020).

Uma das alternativas para alcançar o direcionamento do fármaco ao local alvo, é a utilização dos anticorpos monoclonais (mAbs, do inglês *monoclonal antibodies*) como ligandos de direcionamento (Noble *et al.*, 2014). Os mAbs são ligandos excelentes para a terapia direcionada por apresentarem diversas vantagens, as quais serão descritas nas secções posteriores.

Considerando todos os aspetos descritos anteriormente, o principal objetivo desta dissertação é apresentar o estado da arte relativo às diferentes estratégias de direcionamento associadas aos nanossistemas como sistemas de veiculação dos fármacos, abordando especificamente as características, as vantagens e as desvantagens da utilização dos mAbs como uma alternativa de ligando de direcionamento ativo.

A motivação para explorar esta temática surgiu pelo interesse e curiosidade pessoal em compreender o funcionamento dos novos sistemas terapêuticos que vêm evoluindo a cada ano, como é o caso dos nanossistemas funcionalizados com mAbs, os quais podem tratar doenças que ainda hoje são consideradas fatais, como os tumores.

Este trabalho baseou-se numa revisão narrativa da literatura sobre a funcionalização de nanossistemas com mAbs para o direcionamento ativo, fornecendo informações atualizadas sobre a temática a desenvolver. Para a elaboração desta revisão efetuou-se uma pesquisa, entre outubro de 2021 e agosto de 2022, de artigos publicados nos últimos 10 anos nas seguintes bases de dados: *PubMed*, *Science Direct*, *Google Scholar*, *Elsevier*, *B-On*. Da pesquisa, resultou um total de 237 artigos que, posteriormente, foi realizado a seleção destes de acordo com a avaliação do texto completo para saber se, de facto, atendem aos critérios de pesquisa, conferindo 174 artigos para esta dissertação. A estratégia de pesquisa utilizada foi: *monoclonal antibody* AND (nanosystem* OR nanocarrier*) AND active targeting*.

II. DESENVOLVIMENTO

2.1 Nanotecnologia na área da saúde

A nanotecnologia é definida como qualquer tecnologia que visa a manipulação da matéria a nível atômico, molecular e supramolecular, ou seja, pesquisa e desenvolve estruturas à escala nanométrica, as quais apresentam novas propriedades e funções devido às dimensões bastante reduzidas que apresentam, como sejam os nanossistemas (Silva *et al.*, 2014; Paradise, 2019). Quanto às suas dimensões, ainda não existe um consenso universal entre as várias entidades. Por exemplo, segundo a ISO (do inglês, *International Organization for Standardization*), os nanossistemas possuem dimensões compreendidas no intervalo de 1 nanómetro (nm) a 100 nm (ISO, 2008), enquanto que o *Science and Technology Committee (House of Lords)* refere que o intervalo de tamanho dos nanossistemas pode ser mais alargado, compreendido entre 1 nm e 1000 nm (Robson, 2010).

O conceito de nanotecnologia foi introduzido na comunidade científica pela primeira vez, em 1959, pelo físico vencedor de um Prémio Nobel, Richard Feynman, na sua palestra intitulada “*Theres Plenty of Room at the Bottom, An Invitation to Enter a New Field of Physics*”, apresentada na reunião anual da *American Physical Society* (Feynman, 1960). Desde então, a nanotecnologia tem sido amplamente explorada pelas suas vantagens e aplicada nas mais variadas áreas, como na química, física, biologia, engenharia, eletrónica, alimentação, agricultura, cosmética e, sobretudo, na saúde (Fornaguera *et al.*, 2017; Bayda *et al.*, 2019).

Com a introdução da nanotecnologia na área da saúde surgiu o termo de nanomedicina (Wang *et al.*, 2020), aplicado, pela primeira vez, após a publicação do livro “*Unbounding the Future: the Nanotechnology Revolution*” por Drexler, Peterson e Pergamit (Drexler *et al.*, 1991). A nanomedicina explora as propriedades físicas, químicas e biológicas dos materiais à escala nanométrica, tendo impacto na prevenção, no diagnóstico precoce, monitorização e tratamento de várias patologias (Bayda *et al.*, 2019). A nanomedicina tem permitido implementar uma mudança promissora na prática clínica pela melhoria no diagnóstico e em algumas terapias já existentes (Bayda *et al.*, 2019). Adicionalmente, a aplicação da nanotecnologia à saúde tem revelado potencialidades em vários campos, tais como: no desenvolvimento de sistemas de veiculação de fármacos

(Silva *et al.*, 2014); na imagiologia e diagnóstico (Duncan *et al.*, 2011); na aplicação terapêutica (i.e., terapia e diagnóstico combinados num nanossistema) (Soares *et al.*, 2018a); no desenvolvimento de materiais implantáveis (Paradise, 2019); e na engenharia de tecidos e medicina regenerativa (Duncan *et al.*, 2011).

Na área farmacêutica, os nanossistemas têm melhorado algumas terapêuticas, como por exemplo, terapêuticas relacionadas com o cancro, doenças cerebrais (e.g., doença de Parkinson), e doenças da pele (e.g., infecções de natureza viral, bacteriana, fúngica ou parasitária), comparativamente à veiculação dos fármacos nas formas farmacêuticas ditas convencionais, as quais apresentam frequentemente limitações em termos de estabilidade, de toxicidade e de eficácia (Li *et al.*, 2017a; Sguizzato *et al.*, 2021). Estas limitações relacionam-se principalmente com dificuldades em algumas etapas da farmacocinética, como seja, na absorção e na distribuição dos fármacos para os locais alvo. O desenvolvimento de nanossistemas para veicular fármacos tem sido reconhecido como uma das estratégias mais eficazes para ultrapassar os referidos obstáculos das formas farmacêuticas convencionais, permitindo modular o perfil de libertação do fármaco (Conniot *et al.*, 2014).

Neste contexto, os nanossistemas apresentam várias vantagens, como por exemplo (Soares *et al.*, 2018a; Kopeckova *et al.*, 2019): (i) explorar diferentes e vários mecanismos de ação terapêutica (e.g., hipertermia, terapia fotodinâmica); (ii) melhorar a estabilidade e a biodisponibilidade de fármacos hidrófobos; (iii) evitar a degradação de compostos sensíveis; (iv) veicular o fármaco para o local específico da ação terapêutica (i.e., local alvo) e controlar a sua libertação, aumentando a eficácia terapêutica e reduzindo a toxicidade e os efeitos secundários; (v) capacidade de atravessar as barreiras biológicas, dependendo do seu diâmetro e outras características físico-químicas. Estas vantagens permitem uma melhoria no estilo de vida dos doentes, como também um aumento da adesão terapêutica.

No entanto, existem algumas adversidades referentes às implicações na segurança toxicológica e ambiental, incluindo efeitos tóxicos agudos e elevado custo (Kargozar *et al.*, 2018). Ao mesmo tempo que os nanossistemas são promissores em várias situações clínicas, com potencial para aumentar a eficácia terapêutica e diminuição de efeitos toxicológicos pela libertação controlada do fármaco, o tamanho reduzido e a elevada reatividade dos nanossistemas facilita a sua penetração nas estruturas biológicas, podendo

implicar efeitos indesejáveis. Quanto aos efeitos tóxicos causados pelos nanossistemas, verificou-se uma baixa incidência da sua ocorrência, no entanto, alguns investigadores defendem uma análise minuciosa dos riscos toxicológicos e ambientais de cada tipo de nanossistema com base científica (McMillan *et al.*, 2011; Papakostas *et al.*, 2011).

Existem diversos tipos de nanossistemas, de natureza orgânica ou inorgânica, que podem ser desenvolvidos para veicular os fármacos, os quais podem estar localizadas na matriz ou à superfície do nanossistema. Adicionalmente, na composição dos nanossistemas podem estar presentes outros materiais auxiliares, como sejam, agentes solubilizantes ou ligandos de superfície. Estes últimos permitem direcionar o nanossistema para o local alvo (Wang *et al.*, 2020).

2.1.1 Nanossistemas para veiculação de fármacos

Tal como referido anteriormente, os nanossistemas são sistemas transportadores de fármacos, apresentando dimensões nanométricas (i.e., apresentam diâmetro compreendido entre 1 e 100/1000 nm), conferindo-lhes propriedades únicas. Para que os nanossistemas possam ser considerados elegíveis, para aplicação *in vivo* (na área da saúde), devem ser formulados com materiais que apresentem determinadas propriedades/especificações, nomeadamente (Duncan *et al.*, 2011; Houshmand *et al.*, 2020): biodegradáveis, biocompatíveis e não tóxicos; permanecerem estáveis após a sua administração.

Na década de 1950 iniciou-se o desenvolvimento de nanossistemas, com a síntese do primeiro conjugado polímero-fármaco. Desde então, os nanossistemas tiveram diversos marcos históricos em diferentes décadas, como são apresentados na Figura 1.

Funcionalização de nanossistemas com anticorpos monoclonais para o direcionamento ativo: estado da arte

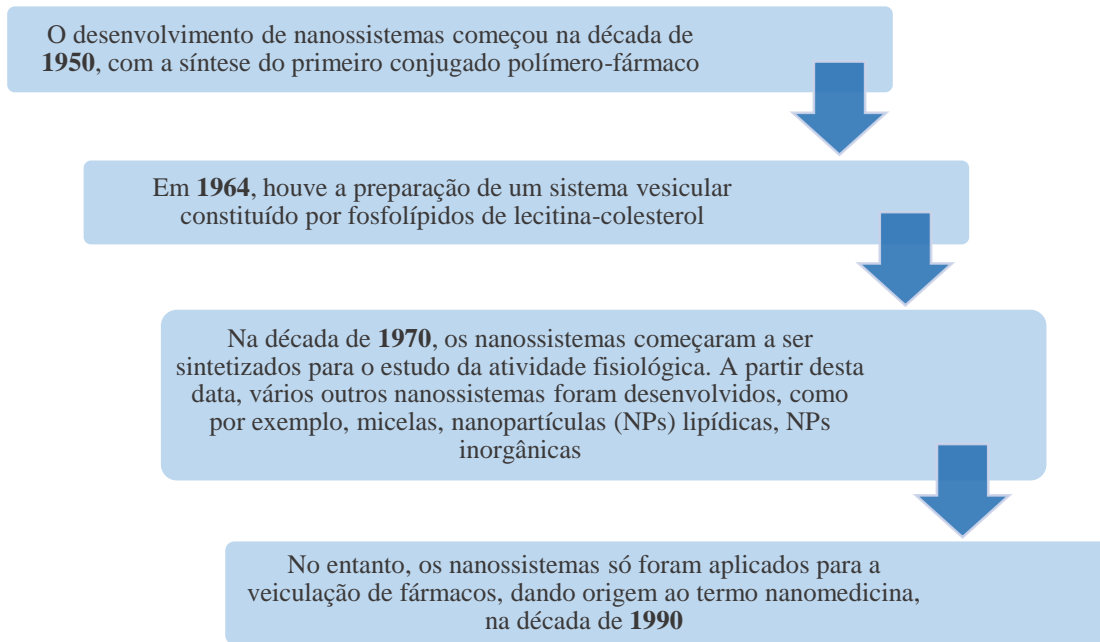


Figura 1. Cronograma dos principais marcos históricos dos nanossistemas (Jatzkewitz, 1955; Bangham *et al.*, 1964; Scheffel *et al.*, 1972; Merisko-Liversidge *et al.*, 1996).

Os nanossistemas podem veicular os fármacos através de diferentes vias de administração (e.g., oral, tópica, ocular, intravenosa, pulmonar, entre outras vias) até atingirem o tecido alvo, no qual seguem por diversas vias biológicas e diferentes barreiras (Duncan *et al.*, 2011). Quando administrados pela via intravenosa, por exemplo, os nanossistemas necessitam passar pela cascata 'CAPIR', que corresponde a cinco etapas (i.e., circulação, acumulação, penetração, internalização e libertação; do inglês *circulation, accumulation, penetration, internalization, drug release*) (Xu *et al.*, 2019a). Na primeira etapa, o nanossistema entra na circulação sistémica e deve permanecer em circulação por um tempo suficiente para que, posteriormente, consiga distribuir-se e acumular-se no tecido alvo. Com a acumulação, é possível ocorrer a penetração nesse tecido e a internalização dele, se o alvo for intracelular. Quando o alvo é atingido, o nanossistema liberta o fármaco para que exerça o seu efeito local. Para que sejam alcançados resultados terapêuticos desejáveis, importa que o nanossistema apresente um bom desempenho em cada etapa (Xu *et al.*, 2019a).

Na década de 70, por exemplo, os nanossistemas produzidos não apresentavam nenhum revestimento à superfície. Desta forma, estas estruturas eram facilmente reconhecidas pelas células que compõem o sistema reticuloendotelial (SRE), também designado de sistema mononuclear fagocitário (SMF), diminuindo o tempo de circulação

e, conseqüentemente, diminuindo as hipóteses de alcançar o tecido-alvo. Com o intuito de ultrapassar esta limitação, na década de 90, foram desenvolvidas novas estratégias, com a adição de cadeias hidrófilas à superfície do nanossistema, baseando no princípio físico-químico da repulsão estérica (Couvreur, 2019). Esta abordagem será melhor desenvolvida posteriormente.

Quanto à composição química, os nanossistemas podem ser classificados genericamente em (Seaberg *et al.*, 2021; Vitorino *et al.*, 2021): (i) nanossistemas orgânicos, compostos por materiais à base de carbono; (ii) nanossistemas inorgânicos, compostos por elementos inorgânicos; (iii) nanossistemas híbridos, compostos por componentes inorgânicos/orgânicos, porções acessórias e arquitetura de hibridização. Adicionalmente, os sistemas nanoestruturados compostos por alótropos de carbono (e.g., fulerenos, folhas de óxido de grafite, nanotubos de carbono e pontos quânticos de grafeno) podem ser considerados como um grupo separado, ou podem ser utilizados como materiais híbridos para a funcionalização de nanossistemas orgânicos ou inorgânicos (Pirzada *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2019).

Na secção seguinte será apresentada uma descrição de alguns dos nanossistemas de base orgânica e inorgânica que apresentam algum estudo de funcionalização com mAbs. Posteriormente, será abordada as vantagens (além da possibilidade de adicionar ligandos de direcionamento ativo à sua superfície) e as limitações da sua aplicação.

i. Nanossistemas de base orgânica

Alguns dos nanossistemas de base orgânica utilizados para veicular e direcionar os fármacos ao funcionalizar com mAbs incluem (Julien *et al.*, 2011; Kuo *et al.*, 2014): lipossomas, nanopartículas (NPs) poliméricas, NPs lipídicas, micelas e dendrímeros.

Lipossomas

Os lipossomas são sistemas vesiculares constituídos por uma ou mais bicamadas lipídicas, normalmente formulados à base de fosfolípidos, que podem ser de origem natural ou sintética. As camadas de fosfolípidos, dispostas concêntricamente, envolvem compartimentos aquosos internos. Ao contrário do que se acontece com as emulsões, os lipossomas são considerados estruturas termodinamicamente estáveis com capacidade de

se formarem espontaneamente quando os lípidos são colocados em meio aquoso (Ipar *et al.*, 2019).

Considerando o diâmetro e o número de bicamadas fosfolipídicas, os lipossomas podem ser classificados em (Dianat-Moghadam *et al.*, 2018; Soares *et al.*, 2018b): (i) vesículas unilamelares pequenas (SUV, do inglês *small unilamellar vesicles*) que apresentam apenas uma bicamada lipídica e dimensões compreendidas entre 20 e 100 nm; (ii) vesículas unilamelares grandes (LUV, do inglês *large unilamellar vesicles*), apresentando uma bicamada lipídica e um diâmetro entre 100 e 500 nm e (iii) vesículas multilamelares (MLV, do inglês *multilamellar vesicles*) que apresentam múltiplas bicamadas lipídicas com diâmetros superiores a 500 nm, como representado na Figura 2. Conforme a composição lipídica dos lipossomas, quer a variação da rigidez (por exemplo, a adição de colesterol na bicamada fosfolipídica confere alguma estabilidade e aumenta a rigidez destes nanossistemas), quer a carga superficial são aspetos que podem influenciar a interação com o ambiente biológico e, conseqüentemente, alterar o efeito terapêutico (Ipar *et al.*, 2019; Houshmand *et al.*, 2020; Ferreira *et al.*, 2021).

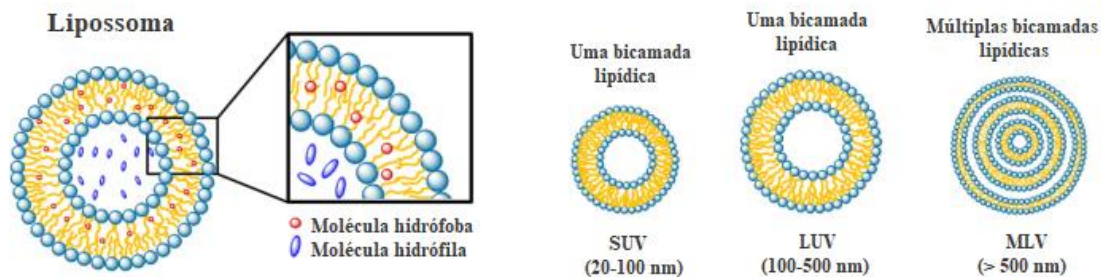


Figura 2. Classificação dos lipossomas de acordo com o diâmetro e número de bicamadas lipídicas (SUV, LUV e MLV), e o respetivo local de veiculação dos compostos hidrófobos e hidrófilos. Adaptado de (Conniot *et al.*, 2014).

A composição à base de fosfolípidos contribui para algumas das vantagens dos lipossomas, nomeadamente o facto de apresentarem elevada biocompatibilidade e biodegradabilidade, serem não imunogénicos e apresentarem baixa toxicidade para o organismo, devido às semelhanças com as membranas biológicas (Alok *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2021). Adicionalmente, a natureza anfifílica dos fosfolípidos permite a veiculação de compostos hidrófilos, no interior aquoso do lipossoma, de compostos hidrófobos, entre as suas bicamadas fosfolipídicas (Figura 2), ou mesmo de compostos

anfifílicos (Li *et al.*, 2017c; Ipar *et al.*, 2019). Outra vantagem associada aos lipossomas é a sua versatilidade em termos de tamanho, composição lipídica, método de preparação e carga da superfície, além de serem flexíveis e fáceis de penetrar nos tecidos (Lúcio *et al.*, 2021).

No entanto, existem algumas limitações associadas aos lipossomas, como por exemplo, instabilidade *in vivo*, sendo os lipossomas convencionais rapidamente removidos da circulação pelas células do SRE, reduzindo o tempo de circulação destes nanossistemas na corrente sanguínea. Uma estratégia para ultrapassar este constrangimento, é a adição à superfície do lipossoma de polímeros hidrófilos, como por exemplo, o polietilenoglicol (PEG), contribuindo para uma maior estabilização estérica (Steichen *et al.*, 2013; Conniot *et al.*, 2014). Nestes casos, os lipossomas são denominados de lipossomas furtivos (“*stealth liposomes*”) ou de longa circulação. Outras limitações que os lipossomas apresentam incluem (Lúcio *et al.*, 2021): elevados custos associados à sua produção; limitada capacidade de encapsulação; baixa estabilidade físico-química durante o período de armazenamento; as vias de administração são limitadas (principalmente intravenosa e intranasal); dificuldade de transposição para a produção industrial.

Os lipossomas foram um dos primeiros nanossistemas aprovados pelas entidades reguladoras e, atualmente, existem várias formulações lipossomais aprovadas para utilização na prática clínica. Alguns exemplos incluem: o AmBisome[®] e o Abelcet[®] que veiculam a anfotericina B para o tratamento de infecções fúngicas, vários produtos para o tratamento de cancro (e.g., Doxil[®], Mepact[®], Myocet[®], Margibo[®], Oniyyde[®], Vyxeos[®]), produtos para afeções a nível ocular (e.g., Visudyne[®]) e tratamento da dor (e.g., Depodur[®] e Exparel[®]) e várias vacinas (e.g., Inflexal V[®], Epaxal[®]), inclusivamente as vacinas usadas para a prevenção da COVID-19 (BNBNT162b2 da BioNTech e Pfizer e mRNA-1273 da Moderna) (Houshmand *et al.*, 2020; Vitorino *et al.*, 2021).

Nanopartículas poliméricas

As NPs poliméricas representam um dos nanossistemas mais investigados para a veiculação de fármacos, devido à biocompatibilidade e biodegradabilidade dos polímeros que são normalmente utilizados na sua preparação. Estas partículas apresentam, geralmente, um diâmetro compreendido entre os 100 e os 300 nm. As NPs poliméricas

podem servir como vetores para formular ou para proteger o fármaco, quer por encapsulação, dissolução, adsorção, ou por incorporação do fármaco na matriz polimérica (Kumar *et al.*, 2013; Ahmad *et al.*, 2015; Friberg *et al.*, 2015).

As NPs poliméricas podem ser constituídas por polímeros sintéticos ou semissintéticos biodegradáveis, tais como o ácido polilático (PLA, do inglês *polylactic acid*), o poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA, do inglês *poly(lactic acid-co-glycolic acid)*), ou por polímeros naturais, como por exemplo, o quitosano, o alginato e o ácido hialurônico (Kumar *et al.*, 2013).

As NPs poliméricas podem ser preparadas adquirindo duas estruturas diferentes: nanoesferas ou nanocápsulas (Conniot *et al.*, 2014). As nanoesferas são sistemas matriciais formados por uma matriz polimérica, na qual as moléculas de fármaco estão dispersas ou dissolvidas, de forma homogênea, no polímero, e a libertação do fármaco ocorre por um mecanismo de difusão da estrutura da matriz polimérica e da capacidade de absorção de fluidos. As nanocápsulas são considerados sistemas reservatório, no qual o fármaco está aprisionado num núcleo separado do ambiente através de uma membrana polimérica, e a libertação do fármaco ocorre pela saturação do núcleo e, posteriormente, por difusão quase constante através da membrana, como apresentado na Figura 3 (Steichen *et al.*, 2013; Conniot *et al.*, 2014).

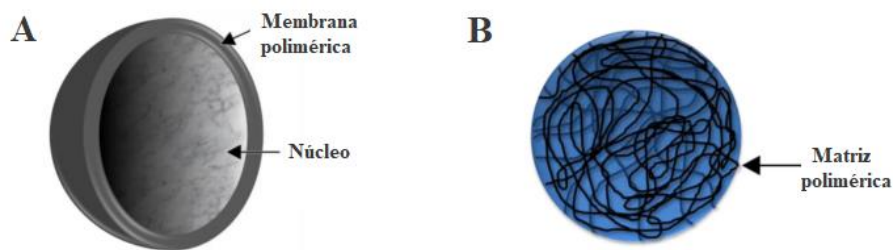


Figura 3. As diferentes estruturas das NPs poliméricas: (A) nanoesferas, (B) nanocápsulas.

Adaptado de (Steichen *et al.*, 2013).

As NPs poliméricas apresentam diversas vantagens para a veiculação de fármacos, nomeadamente (Kamaly *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2013; Zielinska *et al.*, 2020): melhoria da estabilidade do fármaco, uma vez que as moléculas estão protegidas, revelando-se principalmente importante quando se trata de compostos voláteis ou facilmente degradados; elevada capacidade de encapsulação de compostos hidrófilos e hidrófobos; possibilidade de controlar a libertação do fármaco; métodos de produção laboratorial

simples e económico, podendo ser ajustado o tamanho, a estabilidade e a estrutura química; composto principalmente por polímeros biocompatíveis, biodegradáveis, pouco tóxicos e não imunogénicos. As NPs poliméricas conseguem também superar algumas limitações dos nanossistemas lipídicos, por exemplo quando comparados com os lipossomas, como seja a falta de estabilidade *in vivo* e durante o período armazenamento (Kamaly *et al.*, 2012).

Como principais desvantagens, estes nanossistemas apresentam (Zielinska *et al.*, 2020; Lúcio *et al.*, 2021): risco de toxicidade residual nas formulações finais devido ao uso de solventes orgânicos em alguns métodos de produção das NPs; dificuldade na transposição para a escala industrial; a libertação do fármaco é dependente da degradabilidade do polímero; heterogeneidade físico-química das NPs produzidas, resultando na falta de reprodutibilidade entre lotes.

Alguns exemplos de NPs poliméricas aprovadas pela FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) e pela Agência Europeia do Medicamento (EMA, do inglês, *European Medicines Agency*) incluem (Greish *et al.*, 2018): o Eligard[®] para o cancro da próstata; o Renagel[®] para o tratamento da hiperfosfatemia em doentes com doença renal crónica; Pegasys[®] para o tratamento da hepatite B e da hepatite C; Copaxone[®] que é indicado para redução e recaídas em esclerose múltipla; Somavert[®] para o tratamento da acromegalia.

Nanopartículas lipídicas

As NPs lipídicas são dispersões coloidais, com diâmetros compreendidos entre os 10 e os 1000 nm, e que apresentam uma matriz lipídica sólida, na qual os fármacos hidrófobos podem ser veiculados, e uma interface constituída por agente tensioativo à superfície que auxilia na dispersão destes nanossistemas em meio aquoso (Eskandari *et al.*, 2020; Lúcio *et al.*, 2021).

Existem duas gerações de NPs lipídicas: as nanopartículas lipídicas sólidas (SLN, do inglês *solid lipid nanoparticles*) e os vetores lipídicos nanoestruturados (NLC, do inglês *nanostructured lipid carriers*). As SLNs são sistemas cuja matriz lipídica é constituída por lípido sólido, estabilizada utilizando diferentes tensioativos num ambiente aquoso, e os fármacos estão dissolvidos no seio da matriz lipídica. Nos NLCs, a matriz lipídica é composta por uma mistura de lípido líquido e lípido sólido (Eskandari *et al.*, 2020).

No geral, as NPs lipídicas apresentam vantagens relevantes para a sua utilização na veiculação de fármacos, nomeadamente (Ipar *et al.*, 2019; Eskandari *et al.*, 2020; Lúcio *et al.*, 2021): elevada biocompatibilidade e biodegradabilidade; baixa toxicidade; são compostos por lípidos fisiológicos e excipientes geralmente reconhecidos como seguros (GRAS, do inglês *generally recognized as safe*); não requer a utilização de solventes orgânicos durante a preparação; são eficazes para a entrega direcionada de fármacos para o SRE por reconhecimento, por parte das células que compõem o SRE, dos componentes lipídicos do nanossistema (estrutura hidrófoba). No entanto, as SLNs apresentam determinadas limitações, que incluem (Sultana *et al.*, 2013; Morales *et al.*, 2015): capacidade limitada de encapsulação e de mobilidade dos fármacos devido ao núcleo sólido e a uma estrutura cristalina organizada e, conseqüentemente, na facilidade de expulsão do fármaco durante o período de armazenamento.

Para tentar ultrapassar estas limitações, foram desenvolvidos os NLCs, que combinam as vantagens das SLN, bem como evitam algumas das suas desvantagens. Estruturalmente, os NLCs apresentam um espaço maior entre as moléculas lipídicas devido às imperfeições existentes na rede cristalina, permitindo veicular uma quantidade superior de fármacos e apresentam uma melhor estabilidade (Figura 4) (Morales *et al.*, 2015).

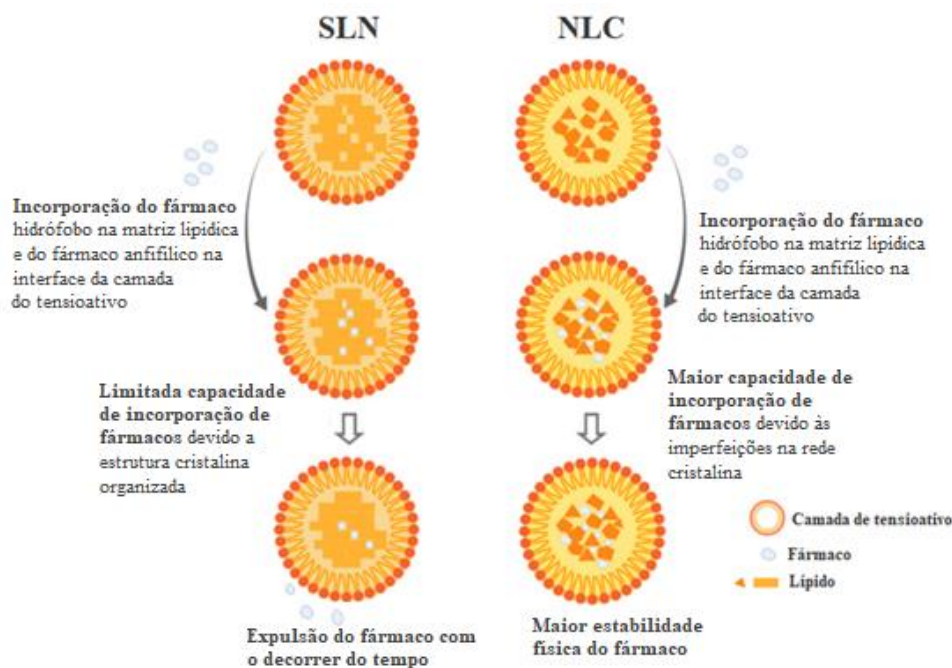


Figura 4. Incorporação de fármaco na matriz lipídica das SLN e dos NLC. Adaptado de (Borges *et al.*, 2020).

Apesar disso, estes nanossistemas apresentam algumas desvantagens, como menor tempo de circulação sistêmica por serem facilmente capturados pelas células do SRE, e possível toxicidade quando estes, apresentam na sua estrutura, elevadas concentrações de tensioativos (da Silva Santos *et al.*, 2019; Samaridou *et al.*, 2020). Além disso, estes nanossistemas sofrem com facilidade transformações polimórficas na matriz lipídica, ou seja, apresentam a tendência de se cristalizarem em diferentes estruturas durante o armazenamento. Com a ocorrência das transformações polimórficas, é geralmente alterado a morfologia dos nanossistemas, influenciando na capacidade de incorporação do fármaco, bem como na sua liberação (da Silva Santos *et al.*, 2019).

Alguns exemplos de NPs lipídicas que estão atualmente aprovadas para prática clínica são: Onpattro[®], que foi aprovado em 2018 pela FDA para o tratamento de polineuropatia em indivíduos com amiloidose hereditária por transtirretina; GIVLAARI[™], que foi aprovado em 2019 pela FDA e em 2020 pela EMA para adultos com porfiria hepática aguda (Hu *et al.*, 2020).

Micelas

As micelas são formadas por moléculas com propriedades anfifílicas que se autoagregam espontaneamente em meio aquoso, quando se encontram acima de uma concentração bem definida, a concentração micelar crítica (CMC), com formação de um núcleo hidrófobo, constituído pelas caudas hidrófobas, rodeado por uma porção hidrófila, contendo as cabeças hidrófilas das moléculas anfifílicas, direcionadas para o meio aquoso (Figura 5). Estes nanossistemas apresentam geralmente diâmetros inferiores a 100 nm, reduzindo a sua acumulação nos órgãos do SRE e prolongando o tempo de circulação (Steichen *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2015).

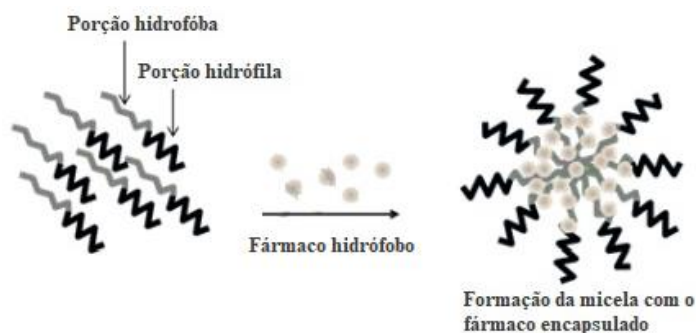


Figura 5. Representação esquemática da formação da micela. Adaptado de (Sakai-Kato *et al.*, 2015).

As micelas podem ser compostas por polímeros, fosfolípidos, ou uma mistura de ambos, sendo as micelas poliméricas as mais investigadas pelo facto de estas serem mais estáveis que as micelas lipídicas, quando submetidas a processos de diluição, através da possível ligação dos fosfolípidos aos componentes da circulação sanguínea e teciduais (Lúcio *et al.*, 2021). Adicionalmente, as micelas poliméricas têm maior capacidade de encapsulamento de fármacos que as micelas lipídicas, e apresentam uma grande variedade de grupos funcionais para a conjugação com moléculas de fármaco (Silva *et al.*, 2015; Lúcio *et al.*, 2021).

Outras vantagens que as micelas apresentam, no geral, é a possibilidade de proteger uma variedade de fármacos pouco solúveis em água e/ou fármacos instáveis, e são biocompatíveis, biodegradáveis e pouco tóxicos (Silva *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017c). Adicionalmente, as micelas permitem modificar a velocidade de libertação do fármaco, assim como, permitem o direcionamento para locais-alvo do organismo (Steichen *et al.*, 2013; Catuogno *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2016b).

Relativamente às limitações, as micelas apresentam baixa estabilidade *in vivo* ao longo do tempo, podendo ocorrer a libertação imediata dos fármacos devido à destabilização da estrutura micelar (Kamaly *et al.*, 2012). Quanto às micelas poliméricas, estes nanossistemas apresentam um potencial toxicidade resultante da possível presença de resíduos de solventes orgânicos, os quais podem não ser totalmente removidos durante o método de produção, e a falta de reprodutibilidade entre lotes, resultando numa heterogeneidade físico-química (Vitorino *et al.*, 2021).

Alguns dos produtos aprovados contendo micelas poliméricas incluem (Lu *et al.*, 2013; Ranade *et al.*, 2013; Kopeckova *et al.*, 2019): o Genexol PM[®] e o Nanoxel PM[®] aprovados para doentes com cancro do ovário, da mama e do pulmão de não pequenas células, e o EstrasorbTM que é um derivado de estrogénio para o tratamento de sintomas vasomotores moderados a graves decorrentes da menopausa.

Dendrímeros

Os dendrímeros são macromoléculas poliméricas altamente ramificados com uma estrutura tridimensional esférica complexa, com dimensões geralmente compreendidas entre os 1 nm e os 100 nm. Estruturalmente, os dendrímeros contêm unidades de repetição (i.e., monómeros) de ramificações poliméricas ligadas covalentemente a um núcleo

central interno (átomo único ou grupo de átomos), organizadas em camadas concêntricas, designadas de gerações, e que terminam com grupos de superfície funcionais que podem ter diferente carga superficial, como está apresentado na Figura 6 (Li *et al.*, 2017c; Kopeckova *et al.*, 2019; Montane *et al.*, 2020). Os dendrímeros de geração inferior apresentam uma tolerância superior comparativamente com os de gerações superior no que diz respeito à citotoxicidade, imunogenicidade e biocompatibilidade (Zhu *et al.*, 2019).

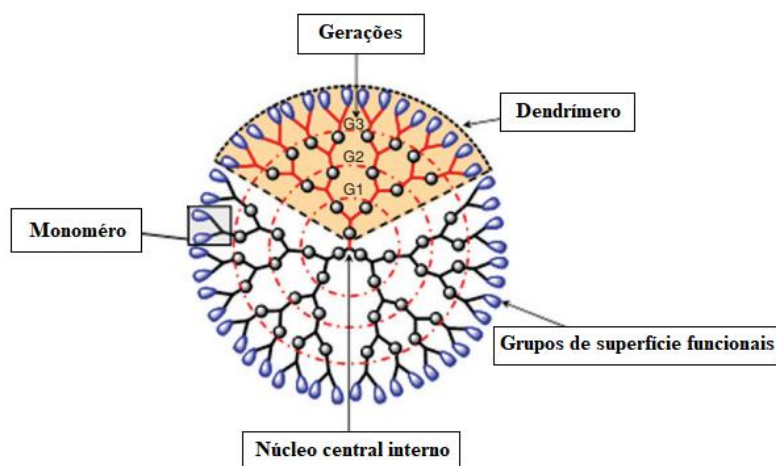


Figura 6. Ilustração estrutural de um dendrímero. Adaptado de (Malkoch *et al.*, 2012).

Quanto à composição dos dendrímeros, os polímeros mais utilizados são: a poliamidoamina (PAMAM), a polipropilenoimina (PPI) e a poli-L-lisina (PLL), sendo os dendrímeros de PAMAM os primeiros a serem sintetizados e os mais investigados (Silva *et al.*, 2015; Montane *et al.*, 2020).

Estes nanossistemas podem veicular o fármaco dentro da sua arquitetura dendrítica, através de um aprisionamento físico (por exemplo, por interações eletrostáticas, interações hidrófobas e pontes de hidrogénio) ou, alternativamente, podem formar conjugados covalentes fármaco-dendrímero (Zhu *et al.*, 2019).

Os dendrímeros apresentam um grande interesse como transportadores de fármacos, devido à elevada capacidade de atravessar as barreiras biológicas por possuírem diâmetros pequenos (Ipar *et al.*, 2019). Outras vantagens que estes nanossistemas apresentam, incluem (Li *et al.*, 2017c; Vitorino *et al.*, 2021): reduzida probabilidade de serem capturadas pelas células do SRE; capacidade de encapsular compostos hidrófilos, hidrófobos ou anfifílicos; biocompatibilidade; capacidade de proteger as moléculas

veiculadas; altamente homogêneos e monodispersos; facilmente eliminados do organismo; suscetibilidade de controlar a funcionalização à superfície, otimizando o reconhecimento celular; suscetibilidade de veicular agentes terapêuticos, de diagnóstico e de transfecção.

As dimensões reduzidas dos dendrímeros podem potencializar a sua citotoxicidade, uma vez que têm a capacidade de interagir com alguns elementos celulares, causando a desestabilização da membrana celular e provocando eventual lise celular quando estão presentes grupos catiónicos na sua superfície. Para suprimir esta situação, são, geralmente, adicionadas à superfície dos dendrímeros cadeias de PEG ou outras macromoléculas biológicas, como anticorpos ou hidratos de carbono (Li *et al.*, 2017c; Montane *et al.*, 2020). Os dendrímeros com carga positiva são mais tóxicos do que os que apresentam carga negativa ou neutra ou, mesmo, comparativamente com dendrímeros PEGuilados (Zhu *et al.*, 2019). Outras limitações dos dendrímeros incluem (Pérez-Herrero *et al.*, 2015; Vitorino *et al.*, 2021): complexidade da sua síntese; suscetibilidade de apresentarem toxicidade resultante da utilização de solventes orgânicos durante os métodos de produção; toxicidade e biocompatibilidade dependem da geração (ou seja, do diâmetro) e dos grupos funcionais presentes à superfície; elevado custo de produção; dificuldade em obter reprodutibilidade dos sistemas.

Como produtos aprovados, alguns exemplos incluem (Duncan *et al.*, 2011; Malkoch *et al.*, 2012; Vitorino *et al.*, 2021): (i) produtos para fins terapêuticos, o VivaGel BV[®] para o tratamento e alívio sintomático da vaginose bacteriana, e o Superfect[®] para a terapia génica pela transfecção celular (e.g., introdução de ácido nucleicos nas células); (ii) produtos para fins de diagnóstico, dispositivo médico de sistema de diagnóstico de cuidados agudos Stratus CS (*Siemens Healthcare Diagnostics*) para a medição de biomarcadores cardíacos, e o dispositivo Gadomer 17 como agente de contraste para imagens vasculares em exame de ressonância magnética (RM).

ii. Nanossistemas de base inorgânica

As NPs inorgânicas têm adquirido um interesse crescente nos últimos tempos, devido à capacidade de serem utilizados em diferentes aplicações médicas, como na bioimagem, nos biossensores, na terapia fototérmica (PTT, do inglês *photothermal therapy*) e na veiculação de fármacos (Montane *et al.*, 2020).

Alguns dos nanossistemas inorgânicos utilizados para veicular os fármacos e que apresentam algum estudo de funcionalização com mAbs, incluem (Turner *et al.*, 2015; Fatima *et al.*, 2021): nanopartículas de ouro (AuNPs), NPs magnéticas (nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SPIONs, do inglês *superparamagnetic iron oxide nanoparticles*), nanopartículas de sílica mesoporosa (MSNs, do inglês *mesoporous silica nanoparticles*), pontos quânticos (QDs, do inglês *quantum dots*) e nanopartículas de silício poroso (PSiNPs, do inglês *porous silicon nanoparticles*).

Nanopartículas de ouro (AuNPs)

As AuNPs são NPs metálicas compostas por um núcleo de átomo de ouro envolvido por grupos reativos negativos na superfície que podem ser, simplesmente, modificados e fixados com várias moléculas (Lombardo *et al.*, 2019).

Existem diferentes estruturas que as AuNPs podem assumir e serem utilizadas para a veiculação e direcionamento dos fármacos ao local alvo e como agentes de imagem. Alguns exemplos são os nanobastões, as nanoconchas, as nanoestrelas e as nanoesferas tradicionais, como é demonstrado na Figura 7 (Turner *et al.*, 2015; Farahavar *et al.*, 2019).

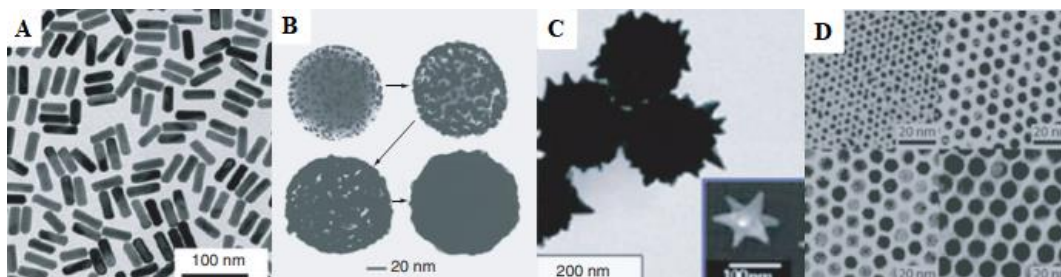


Figura 7. Exemplos de tipos de AuNPs que são utilizadas para diversas aplicações biomédicas, incluindo na veiculação de fármacos: (A) nanobastões; (B) nanoconchas; (C) nanoestrelas; (D) nanoesferas. Adaptado de (Li *et al.*, 2015).

As AuNPs apresentam diversas vantagens, nomeadamente (Kong *et al.*, 2017; Montane *et al.*, 2020): reduzida toxicidade; facilidade de sintetizar diferentes formas e tamanhos; facilidade de funcionalizar a superfície devido à presença de carga negativa; elevada permeabilidade celular; boa estabilidade; diâmetro pequeno e monodisperso; boa biocompatibilidade; elevada capacidade de encapsulação de fármacos; propriedades anfífilas e fototérmicas.

Como limitações, as AuNPs (Richards *et al.*, 2017; Vitorino *et al.*, 2021): apresentam baixa biodegradabilidade; pode contribuir para a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*); e há um desconhecimento da interação das AuNPs com as células.

Um exemplo de produto aprovado contendo AuNPs é o dispositivo médico Verigene[®] para a detecção de agentes patogênicos entéricos (Huang *et al.*, 2016a). A maioria dos produtos que contêm este nanossistema ainda se encontram em ensaios clínicos, como é o caso da Aurimmune[™] (CYT-6091) (AuNPs PEGuiladas) que se encontra em ensaios clínicos de Fase I para o tratamento de carcinoma adrenocortical, sarcoma, melanoma, e cancro do ovário, da mama, do fígado, do rim, do pâncreas, do intestino e colorretal; e o Auroshell[®] que também se encontra em ensaios clínicos de Fase I, e é indicado para doentes com cancro do pulmão (Fornaguera *et al.*, 2017; Eskandari *et al.*, 2020).

Nanopartículas magnéticas

As NPs magnéticas são estruturalmente formadas por um núcleo magnético (e.g., maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), magnetite (Fe_3O_4), dióxido de cromo, cobalto), revestido por material inorgânico ou polimérico, ou até mesmo com NPs magnéticas precipitadas no interior dos poros de uma matriz polimérica. De todos os componentes magnéticos, a magnetite é a mais utilizada por causa da sua elevada biocompatibilidade, elevada estabilidade e baixo custo (Vitorino *et al.*, 2021). As NPs magnéticas de óxido de ferro com um diâmetro inferior a 30 nm apresentam um efeito de superparamagnetismo (nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro – SPIONs, do inglês *superparamagnetic iron oxide nanoparticles*) (Figura 8), isto é, magnetização das NPs até à sua saturação na presença de um campo magnético aplicado; contudo, não é detetado qualquer magnetismo residual aquando da remoção do campo magnético (Sensenig *et al.*, 2012; Lombardo *et al.*, 2019). Estas NPs respondem a campos magnéticos, podendo libertar os fármacos no local alvo com base em rearranjos estruturais diretos induzidos magneticamente ou como subproduto do efeito hipertérmico do campo magnético (Lombardo *et al.*, 2019).

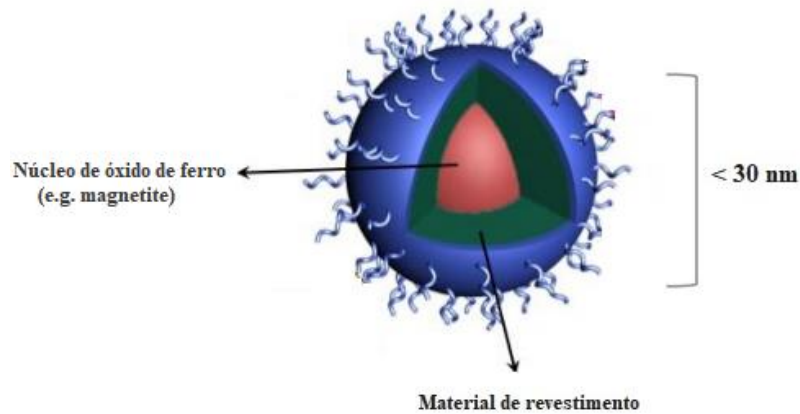


Figura 8. Estrutura das SPIONs, composta por um núcleo de óxido de ferro e por um material de revestimento. Adaptado de (Li *et al.*, 2017b).

Como principais vantagens, estes nanossistemas apresentam (Turner *et al.*, 2015; Vitorino *et al.*, 2021): facilidade de funcionalizar com ligandos de direcionamento; tamanho apropriado para evitar a depuração renal; elevada capacidade de encapsulação; tamanhos ajustáveis entre os 1 nm e os 100 nm; excelente alternativa para aplicação de RM por apresentar a propriedade de superparamagnetismo; quimicamente estáveis; podem ser identificados e manipulados por campos magnéticos remotos; acumulação nos locais pretendidos através da libertação ativa por campos magnéticos.

No entanto, existem algumas limitações, como (Duncan *et al.*, 2011): potencial toxicidade resultante da sobrecarga de ferro e produção de ROS induzidos pelo ferro, bem como uma funcionalização desordenada da superfície.

Alguns exemplos de produtos aprovados contendo NPs magnéticas incluem (Patra *et al.*, 2018; Anselmo *et al.*, 2019; Shetab Boushehri *et al.*, 2020): (i) produtos para fins terapêuticos, o Feraheme[®] para o tratamento da anemia por deficiência de ferro em doentes com doença renal crónica, e o Nanotherm[®] indicado para o glioblastoma, cancro do pâncreas e cancro da próstata; (ii) produtos para fins de diagnóstico, como agente de imagem em RM (e.g., GastroMARK[™], Resovist[®], Feridex[®]).

Nanopartículas de sílica mesoporosa (MSNs)

As NPs de sílica são frequentemente designadas como nanopartículas de sílica mesoporosa (MSNs) porque estruturalmente, as MSNs apresentam uma estrutura sólida contendo poros com diâmetros controlados que variam entre os 2 nm e os 50 nm (com

distribuição de poros estreitos) e uma elevada superfície específica (Bharti *et al.*, 2015). A superfície das MSNs apresenta compostos ativos de grupos silanol e é facilmente funcionalizada, auxiliando no transporte do fármaco, na interação destes nanossistemas com as moléculas alvo e na posterior libertação do fármaco (Figura 9) (Zhou *et al.*, 2018b).

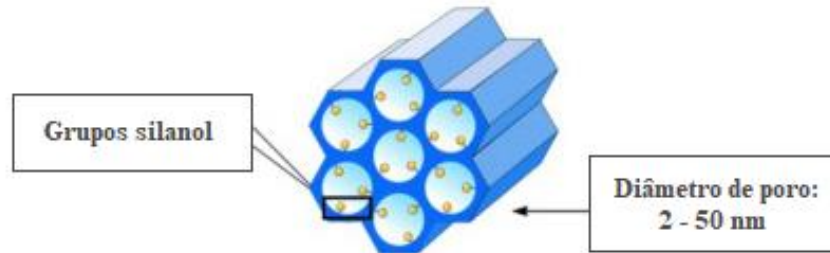


Figura 9. Representação esquemática da estrutura dos MSNs. Adaptado de (Parra *et al.*, 2021).

As MSNs apresentam como vantagens (Kumar *et al.*, 2013; Bharti *et al.*, 2015): baixa toxicidade; estrutura porosa ordenada; altamente biodegradáveis e biocompatíveis; elevada resistência à degradação e stress mecânico pela forte ligação Si-O; quimicamente estáveis e de síntese simples; elevada capacidade para encapsular fármacos hidrófilos e hidrófobos; pode ser utilizado como material de revestimento.

A principal desvantagem deste nanossistema reside no seu efeito hemolítico, resultante da interação entre os grupos silanol e a superfície dos fosfolípidos das membranas das hemácias (Shahbazi *et al.*, 2012). Outra desvantagem associada às MSNs, é a possível formação de melanoma induzida pelas alterações metabólicas provocadas pelas NPs de sílica porosa (Bharti *et al.*, 2015)

De acordo com a pesquisa efetuada, não foram encontrados produtos aprovados contendo MSNs, no entanto, estão a ser realizados ensaios clínicos contendo estes nanossistemas. Um exemplo de MSNs em ensaio clínico, é o Cornell prime dots (C' dots), que se encontra em ensaios clínicos de Fase I e de Fase II como agente de imagem para fins de diagnóstico (Miao *et al.*, 2021).

Pontos Quânticos (QDs)

Os QDs são nanocristais que podem ser definidos como qualquer entidade inorgânica que apresente uma disposição cristalina de átomos, contendo um diâmetro que varia entre os 2 nm e os 10 nm. (Diaz-Gonzalez *et al.*, 2020). Estes nanossistemas

oferecem propriedades óticas, fotoquímicas, catalíticas e semicondutoras excepcionais devido ao confinamento quântico, como consequência do seu tamanho, estrutura e composição química (Patra *et al.*, 2018; Vitorino *et al.*, 2021). Estruturalmente, os QDs são constituídos por um núcleo semicondutor de elementos químicos dos grupos II-VI e III-V, como o cádmio-selênio (CdSe), por um invólucro inorgânico que tem a função de estabilizar o núcleo e aprimorar as propriedades físicas e óticas do nanossistema, como o sulfeto de zinco (ZnS), e por um revestimento polimérico (Jha *et al.*, 2018) O revestimento da superfície com grupos funcionais (e.g., PEG, amina (-NH₂) e ácido carboxílico (-COOH)) acoplados por ligação covalente é necessário após a sua síntese, uma vez que os QDs resultantes são insolúveis em água, além de serem benéficos para direcionar a terapia medicamentosa, como é apresentado na Figura 10 (Jha *et al.*, 2018; Diaz-Gonzalez *et al.*, 2020; Tosat-Bitrian *et al.*, 2020).

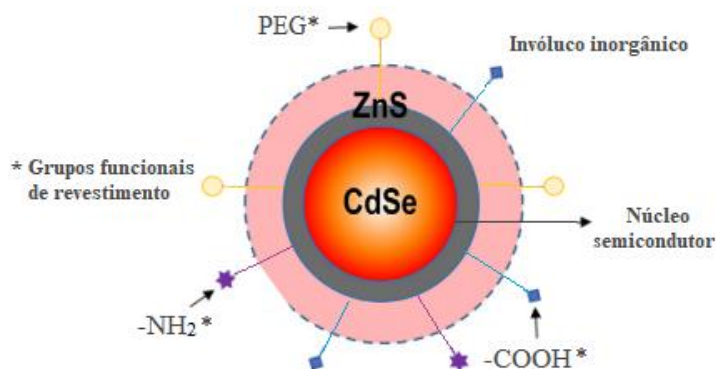


Figura 10. Estrutura dos QDs com a presença de grupos funcionais acoplados à superfície do nanossistema. Adaptado de (Tosat-Bitrian *et al.*, 2020).

Os QDs apresentam determinadas vantagens, como por exemplo (Patra *et al.*, 2018; Diaz-Gonzalez *et al.*, 2020): elevada fluorescência (elevado rendimento quântico) com emissão de luz ajustável por tamanho e com baixa fotodegradação; emissão de infravermelho próximo (NIR, do inglês *near infrared*); tamanho pequeno e monodisperso; boa estabilidade química e fotográfica; facilidade de modificação de superfície.

No entanto, existem algumas desvantagens associadas a estes nanossistemas, tais como (Diaz-Gonzalez *et al.*, 2020; Vitorino *et al.*, 2021): baixa eficácia de direcionamento; desconhecimento do seu processo de metabolização, degradação, acumulação e eliminação dentro do organismo; citotoxicidade provocada pelos efeitos

tóxicos dos componentes centrais inorgânicos (e.g., metais pesados como o mercúrio, cádmio, selênio, telúrio), pela indução de ROS, e/ou pelos solventes orgânicos utilizados durante o processo de síntese; agregação na superfície celular pelo efeito estabilizador dos ligandos de superfície.

Um exemplo de produto vendido no mercado, para fins de diagnóstico, é a sonda Qdot[®] ITK[™], utilizados para aplicações de imagem que necessitem sinais fluorescentes ou brilhantes e/ou rastreamento em tempo real (Brunetti *et al.*, 2018).

Nanopartículas de silício poroso (PSiNPs)

Na década de 50 e 60, o silício poroso (PSi, do inglês *porous silicon*) foi acidentalmente descoberto através da observação de formação e propagação de buracos finos na estrutura das NPs, e que mais tarde relataram a visualização de um leve brilho avermelhado de uma amostra de PSi (Sailor, 2012). Na década de 90, concluiu-se que o PSi emitia fotoluminescência vermelho-laranja forte à temperatura ambiente, sendo atribuída essa iluminação à presença de fios quânticos em escala nanométrica (Abu-Thabit *et al.*, 2020). As PSiNPs são nanossistemas com características estruturais específicas que permitem diversas aplicações tecnológicas. As PSiNPs são uma classe de nanossistemas fotônicos compreendendo poros cheios de ar com diâmetro inferior a 150 nm (Figura 11) (Abu-Thabit *et al.*, 2020).

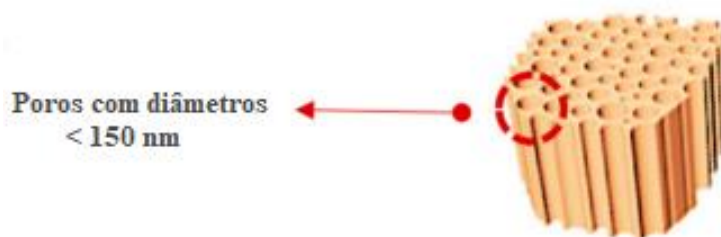


Figura 11. Representação das PSiNPs com a presença de poros cheios de ar. Adaptado de (Lee *et al.*, 2018).

Existem diversas vantagens associadas a este nanossistema, que incluem (Santos *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2019): excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade; elevada superfície específica e volume interno, permitindo transportar quantidades consideráveis de fármaco; estrutura mesoporosa favorável e facilmente ajustável; fotoluminescência intrínseca à temperatura ambiente, que permite a monitorização tanto da degradação como da acumulação dos nanossistemas, sem a necessidade de marcadores

fluorescentes; facilidade de produção em larga escala; diâmetro e superfície facilmente ajustável, sendo possível escapar da captação das células do SRE e aumentar o tempo de circulação sistêmica. No que concerne a produção de compostos tóxicos e efeitos colaterais prejudiciais *in vivo*, este nanossistema representa uma alternativa aos QDs convencionais que contêm metais pesados e solventes orgânicos (Park *et al.*, 2019).

No entanto, as PSiNPs apresentam baixa estabilidade química quando expostos a meios aquosos ou corrosivos, conduzindo ao enfraquecimento prematuro do sinal fluorescente e impossibilitando a detecção dos nanossistemas presentes (Jung *et al.*, 2021).

Alguns exemplos de produtos aprovados contendo PSiNPs incluem, para fins terapêuticos, o Iluvien[®] e o Retisert[®] para o tratamento de problemas de visão associados a uveíte crônica e ao edema macular diabético crônico (Kumeria *et al.*, 2017).

2.2 Estratégias de direcionamento/vetorização

O transporte direcionado, também designado por vetorização, do fármaco tem como propósito obter, de forma seletiva, um aumento da concentração do fármaco no tecido ou órgão onde se pretenda que exerça a sua ação, maximizando a eficácia do tratamento ao mesmo tempo que minimiza a exposição sistêmica (Pérez-Herrero *et al.*, 2015). Esta situação não acontece quando o sistema de veiculação do fármaco está isento de moléculas que promovem o seu direcionamento. Neste caso, o sistema de veiculação é normalmente distribuído, de forma uniforme, pelo organismo, e ocorre uma liberação imediata do fármaco e/ou possível inativação do fármaco durante o seu percurso até o local alvo. Como consequência destes acontecimentos, é necessário a administração de elevadas quantidades ou de administrações repetidas de fármaco para atingir a concentração terapêutica eficaz, traduzindo-se num aumento do custo da terapia, uma menor adesão à terapêutica e na presença de efeitos colaterais (Hirsjärvi *et al.*, 2011; Kamaly *et al.*, 2012; Attia *et al.*, 2019).

O conceito de terapia direcionada foi introduzido, nos primeiros anos da década de 1900, por Paul Ehrlich, através do termo “*magic bullet*”. De acordo com este investigador, os fármacos deveriam ser direcionados especificamente para os alvos celulares pretendidos, podendo atuar com maior eficácia contra os microrganismos que estavam na origem das infeções e deveriam ser inofensivos para os tecidos saudáveis

(Houshmand *et al.*, 2020). Inicialmente, este conceito foi associado às doenças infecciosas e, posteriormente, foi ampliado para outras doenças, como os tumores (Friberg *et al.*, 2015). Nesta temática, as células tumorais são alvos muito explorados, recorrendo quer ao conceito de direcionamento passivo quer de direcionamento ativo, devido ao microambiente tumoral, o qual apresenta especificações fisiológicas e estruturais peculiares.

A falta de seletividade no direcionamento dos fármacos para o local alvo de ação é uma grande preocupação para algumas terapias específicas, principalmente em terapias direcionadas ao cancro, uma vez que, uma parte dos agentes quimioterápicos atuam em células saudáveis e provocam efeitos indesejáveis/toxicidade no tecido saudável e, conseqüentemente, ocorre uma diminuição da eficácia do tratamento (Baeza *et al.*, 2015).

Uma das características mais interessantes dos nanossistemas, enquanto sistemas de veiculação, consiste na capacidade do seu direcionamento/vetorização da carga, de maneira a que o fármaco seja libertado no local alvo (Steichen *et al.*, 2013). As estratégias de direcionamento dos nanossistemas podem subdividir-se em (Riaz *et al.*, 2018): (i) direcionamento para o SRE; (ii) direcionamento passivo; (iii) direcionamento ativo.

2.2.1 Direcionamento para as células do sistema reticuloendotelial (SRE)

O SRE é um componente crucial do sistema imunológico que está localizado em diferentes órgãos, como o fígado, baço, pulmões, medula óssea, pâncreas e pele (Gutknecht *et al.*, 2014; Varma *et al.*, 2021). Este sistema é constituído por várias células responsáveis pelo processo de opsonização, ou seja, uma espécie de sinalização dos elementos circulantes, como reconhecimento da presença de uma substância estranha. As células do SRE possuem recetores superficiais para diversos componentes plasmáticos, designados de opsoninas, que ficam adsorvidos à superfície das partículas, tal como, os nanossistemas, promovendo a internalização destes e a sua conseqüente eliminação da corrente sanguínea (Riaz *et al.*, 2018; Morales-Cruz *et al.*, 2019).

Quando o objetivo é tornar os nanossistemas visíveis às células do SRE, ao contrário do que geralmente se pretende, os nanossistemas devem ser rapidamente reconhecidos pelas células dos órgãos que compõem o SRE. Neste caso, o tratamento encontra-se direcionado para patologias que afetam diretamente as células fagocitárias

destes órgãos, como por exemplo, o tratamento de doenças infecciosas, como a Leishmaniose, ou em processos inflamatórios, por exemplo do fígado. Adicionalmente, esta estratégia também tem vantagem em exames de diagnóstico, como na realização de uma RM numa lesão de fígado/baço (Weissig *et al.*, 2014; Varma *et al.*, 2021).

O fenômeno do direcionamento para as células do SRE está relacionado com determinadas características que o nanossistema pode ou não apresentar, como por exemplo, o diâmetro e as características da superfície (Baeza *et al.*, 2015).

Determinadas características físico-químicas do nanossistema, como dimensões maiores, carga superficial negativa e superfície hidrófoba, influenciam na eliminação mais rápida dos nanossistemas da circulação sanguínea pelo seu reconhecimento pelas células do SRE. Desta forma, em situações em que se pretenda direcionar o nanossistema para as células fagocitárias, a formulação deve apresentar esse tipo de características para que, quando entre na circulação sanguínea, ocorra a interação entre o nanossistema e as opsoninas por passar a ser reconhecido como uma substância estranha pelo SRE e, posteriormente, seja internalizado pelas células que constituem este sistema (Riaz *et al.*, 2018; Attia *et al.*, 2019)

2.2.2 Direcionamento passivo

O direcionamento passivo é uma estratégia pela qual o nanossistema é dirigido para o local alvo sem necessidade de funcionalizar a sua superfície (Kamaly *et al.*, 2012). Este tipo de direcionamento refere-se à tendência espontânea dos nanossistemas se acumularem em determinadas células, tecidos ou órgãos específicos baseado nas propriedades físico-químicas do nanossistema (e.g., diâmetro do nanossistema, carga de superfície, solubilidade, etc.), e nas características fisiopatológicas do local alvo, como por exemplo, o efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR, do inglês, *enhanced permeability and retention*) que se verifica nas células tumorais (Houshmand *et al.*, 2020; Arslan *et al.*, 2021).

O efeito EPR consiste em alcançar o alvo por extravasamento dos nanossistemas através da maior permeabilidade da vasculatura tumoral devido à angiogênese acelerada, juntamente com a deficiente drenagem linfática no tecido tumoral que dificulta a remoção correta das partículas do tecido (Pérez-Herrero *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2018a; Attia *et*

al., 2019). Os tecidos considerados saudáveis apresentam vasos sanguíneos lineares ligados por pericitos, enquanto numa região tumoral, os vasos sanguíneos apresentam um epitélio descontínuo e carecem da membrana base das estruturas vasculares usuais, alterando o fluxo sanguíneo. Desta forma, o déficit de vasos linfáticos funcionais e a permeabilidade vascular aumentada contribuem para uma libertação e acumulação dos nanossistemas no espaço intersticial dos endotélios capilares do microambiente tumoral (Pérez-Herrero *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2018a; Attia *et al.*, 2019).

Outra forma de alcançar um direcionamento passivo apresentando um mecanismo parecido com EPR acontece nos processos inflamatórios. Nos processos inflamatórios, apesar da drenagem linfática funcionar normalmente com a remoção das partículas no tecido, há, na zona inflamada, um aumento da permeabilidade da vasculatura que possibilita a extravasão de células fagocitárias, bem como outras partículas (e.g., nanossistemas) que estejam em circulação (Kraft *et al.*, 2014). Os nanossistemas, mesmo possuindo diâmetros reduzidos, apresentam dificuldades em atravessar o endotélio capilar de tecidos saudáveis, exceto o baço e o fígado, onde o endotélio é fenestrado; no entanto, em situações em que a integridade deste é afetada, como acontece em processos inflamatórios e nos tumores sólidos, os nanossistemas conseguem extravasar através do endotélio (Figura 12) (Bozzuto *et al.*, 2015; Morales-Cruz *et al.*, 2019).

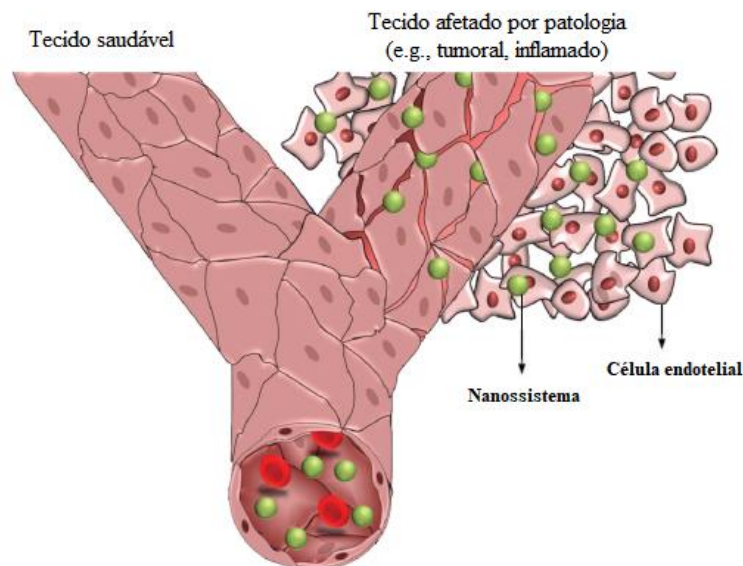


Figura 12. Ilustração das diferenças de um tecido saudável e de um tecido com o EPR (tecido afetado por patologia), no qual este último apresenta um epitélio descontínuo com as junções das células endoteliais soltas, e o posterior extravasamento dos nanossistemas. Adaptado de (Nehoff *et al.*, 2014).

Para que o direcionamento passivo regulado pelo EPR seja possível, é necessário que os nanossistemas permaneçam na circulação sanguínea por um período de tempo prolongado, com o objetivo de alcançar uma acumulação, em concentrações suficientes, no local alvo e promover as interações com o alvo terapêutico, não podendo ser reconhecidos e capturados pelas células do SRE (Baeza *et al.*, 2015). Além disso, o EPR fornece apenas 20-30% de especificidade da entrega em comparação com os órgãos normais, uma vez que é altamente dependente da biologia intrínseca do tumor e de outros fatores associados, como a dificuldade em distinguir entre tecidos saudáveis e tecidos doentes e a sua absorção inespecífica (Bazak *et al.*, 2015; Attia *et al.*, 2019; Subhan *et al.*, 2021).

O diâmetro do nanossistema é um parâmetro que tem um impacto no direcionamento passivo. Este parâmetro, além de influenciar o processo da captação por parte das células do SRE, também influencia a depuração renal (Attia *et al.*, 2019). Se o objetivo do tratamento não for dirigido aos órgãos que apresentam células do SRE, o diâmetro do nanossistema deve ser superior a 10 nm, para evitar que o sistema de veiculação seja eliminado pelo rim, e não deve exceder os 100 nm, uma vez que diâmetros superiores são mais suscetíveis de serem fagocitadas pelo SRE (Morales-Cruz *et al.*, 2019). Estas características aumentam o tempo de circulação dos nanossistemas na corrente sanguínea. Quanto às características fisiopatológicas da vasculatura do tumor e de tecidos inflamados, o diâmetro dos nanossistemas deve ser inferior a 400 nm para conseguir tirar vantagem do efeito EPR (Kraft *et al.*, 2014).

Tal como referido anteriormente, as características de superfície exercem um papel importante na interação com os elementos na circulação sanguínea. No caso de o tratamento ser direcionado para órgãos que não pertençam ao SRE, a superfície do nanossistema deve ser hidrófila, fazendo-se normalmente o revestimento com polímeros hidrófilos (e.g. PEG), fornecendo a proteção contra a adsorção de opsoninas à superfície do nanossistema, como é demonstrado na Figura 13 (Pérez-Herrero *et al.*, 2015).

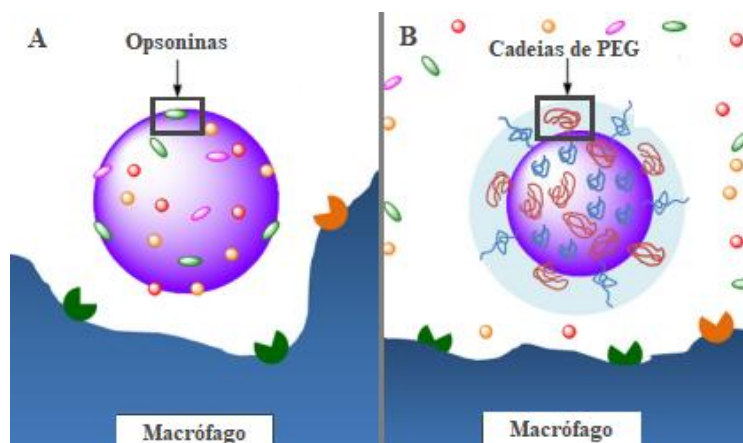


Figura 13. (A) Adsorção das opsoninas no nanossistema por reconhecimento de uma substância estranha; (B) Efeitofurtivo com a funcionalização do nanossistema com cadeias de PEG.

Adaptado de (Conniot *et al.*, 2014).

Os PEG são polímeros hidrófilos biocompatíveis, aprovados pela FDA, que podem revestir a superfície dos nanossistemas, e que tem como função prevenir/retardar a opsonização dos nanossistemas e a sua depuração pelo SRE (Marques-Gallego *et al.*, 2014; Riaz *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020). Desta forma, o revestimento com polímeros hidrófilos previne as interações não específicas das células do SRE com os componentes plasmáticos do nanossistema, o qual pode destabilizar a membrana do mesmo e, conseqüentemente, promover a libertação do fármaco antes de atingir o local alvo, comprometendo o seu direcionamento. Para além disso, a PEGuilação também previne a agregação dos nanossistemas (Noble *et al.*, 2014; Attia *et al.*, 2019). Esta estratégia foi utilizada num produto aprovado pela FDA, no início da década de 90, o Doxil[®], que consiste numa formulação lipossomal para veicular a doxorrubicina (DOX, i.e., um agente anticancerígeno). Estão reportadas várias vantagens associadas a este produto, nomeadamente (Marques-Gallego *et al.*, 2014): tempo de circulação sistémica mais prolongado, melhor estabilidade e libertação controlada do fármaco. No entanto, o revestimento com o PEG pode apresentar alguns inconvenientes, como seja a falta de seletividade no local alvo e, portanto, não é o revestimento mais aconselhado em tratamentos direcionados a locais específicos (Yan *et al.*, 2020).

Outro parâmetro que influencia o direcionamento passivo é a carga de superfície do nanossistema. Os nanossistemas com carga superficial neutra ou levemente aniônica permitem uma diminuição das interações entre o nanossistema e os componentes aniônicos do soro, evitando, conseqüentemente, a sua rápida eliminação da circulação

sanguínea (Pérez-Herrero *et al.*, 2015). Contudo, quando estamos a referir de tecidos tumorais, os nanossistemas com carga positiva (i.e., catiónicos) podem ser considerados mais vantajosos para o direcionamento passivo, uma vez que tendem a localizar-se em vasos tumorais recém-formados por adsorção celular, aumentando significativamente a penetração tumoral, apesar de apresentar uma eliminação mais rápida dos nanossistemas (Zhao *et al.*, 2011).

2.2.3 Direcionamento ativo

Para ultrapassar algumas das limitações referidas anteriormente, uma estratégia possível para alcançar o local terapêutico é a incorporação de um ligando específico à superfície do nanossistema, ou seja, é adotado o direcionamento ativo. Desta forma, os ligandos podem (Conniot *et al.*, 2014; Pérez-Herrero *et al.*, 2015): (i) ser reconhecidos e estabelecer interações com os recetores de superfície de células patológicas (alvo ativo para recetores de superfície celular); ou (ii) ser direcionados para a vasculatura/microambiente patológico (e.g. células tumorais); ou, alternativamente, (iii) direcionados para os macrófagos associados ao tumor (TAMs, do inglês *tumor-associated macrophage*). Considerando o tema desta dissertação, será apenas explorado o direcionamento ativo para recetores de superfície celular.

O direcionamento ativo é relevante para o transporte e a libertação de vários compostos, como fármacos, genes, agentes de teranóstico (e.g., os radiofármacos) num local específico, uma vez que, evita a deposição em tecidos e órgãos considerados saudáveis e aumenta a quantidade do composto no local alvo comparativamente ao composto administrado na sua forma livre ou veiculado em nanossistemas com direcionamento passivo. Desta forma, esta estratégia possibilita uma melhor eficácia terapêutica e a diminuição dos efeitos colaterais associados (Attia *et al.*, 2019).

O direcionamento ativo consiste na funcionalização da superfície dos nanossistemas através da adesão de moléculas específicas, designadas de ligandos. Os ligandos dos nanossistemas conseguem interagir seletivamente com a estrutura de alguns recetores de superfície que existem em órgãos, tecidos, células ou organelos celulares particulares (i.e. com patologias associadas), que são marcadores específicos ou

sobreexpressos diferencialmente, fazendo com que o nanossistema seja internalizado no local pretendido (Baeza *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2018a; Ahmad *et al.*, 2019).

Quando o tratamento é dirigido a um determinado tumor, por exemplo, em algumas células cancerígenas pode ocorrer uma maior expressão de determinados recetores de superfície celular em comparação com as células saudáveis. Desta forma, os nanossistemas podem ser funcionalizados à sua superfície com frações de direcionamento para promover a veiculação do nanossistema especificamente para as células cancerígenas (Yan *et al.*, 2020).

Alguns exemplos de recetores presentes à superfície das células cancerígenas incluem (Pérez-Herrero *et al.*, 2015; Riaz *et al.*, 2018): i) recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR, do inglês *epidermal growth factor receptor*) ou HER1, que é um recetor de tirosina quinase que se expressa na superfície de tumores sólidos, como os cancros do pulmão de não pequenas células, colorretal, ovário, mama e próstata; ii) recetores de fatores de crescimento de fibroblastos (FGFRs, o inglês *fibroblast growth factor receptors*), que correspondem a tirosina quinases transmembranares, e estão presentes nos cancros da bexiga, pulmão, próstata, entre outros; iii) recetores de folato (FRs, do inglês *folate receptors*), que são recetores de superfície expressos em várias células cancerígenas, como as da mama, do pulmão, entre outros; iv) recetores de transferrina (TfRs, do inglês *transferrin receptors*), em que a atividade terapêutica pode ser localizada no fígado (uma vez que a transferrina é uma proteína transportadora de ferro sérico Fe^{3+} , e os seus recetores presentes na superfície são expressos com o aumento da necessidade de ferro por estas células cancerígenas) e no cérebro, devido à sobreexpressão deste recetor na superfície das células endoteliais da barreira hematoencefálica (BHE).

Para um sistema de direcionamento ativo, os ligandos requerem cumprir alguns parâmetros, nomeadamente (Bitounis *et al.*, 2012): ser suscetível de se ligar ao sistema de veiculação, de preferência através de uma ligação covalente, sem influenciar o reconhecimento por parte do marcador; não ser facilmente reconhecido pelas células fagocitárias; apresentar elevada afinidade com os marcadores específicos ou sobreexpressos nas células não saudáveis, sendo que, após a ligação ligando-marcador, esta ligação deve ser consideravelmente forte para evitar a remoção do nanossistema do local e, posteriormente, ocorra a libertação do fármaco nas células alvo. A libertação do

fármaco nas células alvo pode ocorrer por internalização do nanossistema pelas células e, posterior, liberação intracelular do fármaco, ou através da liberação do fármaco no local e, conseqüente, difusão através da membrana plasmática (Gbian *et al.*, 2022).

Para ter utilidade na prática clínica, os nanossistemas de direcionamento ativo devem superar algumas das limitações quando presentes na circulação sistêmica, nomeadamente, não devem ser facilmente reconhecidos pelas células do SRE. Para ultrapassar este inconveniente, uma estratégia geralmente utilizada consiste na ligação dos ligandos específicos à extremidade funcionalizada do PEG (Riaz *et al.*, 2018).

Pela informação referida anteriormente, é possível constatar que o direcionamento ativo enfrenta vários desafios, tais como (Deshpande *et al.*, 2013; Lúcio *et al.*, 2021): a afinidade ligando/alvo, o número de recetores que existem na superfície celular e a influência da PEGuilação na interação entre os ligandos e os recetores celulares. Por exemplo, é importante que o ligando se ligue de forma eficaz e em quantidade suficiente à superfície do nanossistema para ocorrer uma afinidade ótima para os recetores de superfície celular e produzir o efeito ao nível das células não saudáveis. Desta forma, uma densidade elevada de ligandos à superfície do nanossistema comprovou ser benéfica para estabelecer um aumento da fração dos nanossistemas ligados aos recetores de superfície celular (Alkilany *et al.*, 2019). Contudo, a funcionalização da superfície dos nanossistemas com elevada densidade de ligandos é, por vezes, difícil e dispendiosa, como é o caso específico da funcionalização com anticorpos (Deshpande *et al.*, 2013). Adicionalmente, as estratégias de direcionamento ativo para melhorar a internalização dos nanossistemas nos tecidos alvo depende da sobreexpressão seletiva de certos recetores de superfície nas células com patologia. Por vezes, as células saudáveis não apresentaram uma expressão de recetores de superfície significativamente diferente das células não saudáveis e, conseqüentemente, o direcionamento deixa de ser específico. Finalmente, a PEGuilação dos nanossistemas com o intuito de prolongar a circulação sanguínea pode interferir com a capacidade dos nanossistemas exporem os seus ligandos de superfície para interagir com os recetores celulares. Neste contexto, são necessárias novas estratégias para associar os ligandos ao terminal das cadeias de PEG, ou, em alguns casos, é necessária utilizar moléculas hidrolisáveis de PEG que possam libertar o polímero dos nanossistemas quando atingem os tecidos celulares alvo (por exemplo, ceramida de PEG que pode ser hidrolisável por ceramidases), expondo, desta forma, os

ligandos da superfície do nanossistema (Deshpande *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2020).

Existe uma extensa gama de ligandos utilizados para funcionalizar a superfície dos nanossistemas, tais como (Figura 14) (Conniot *et al.*, 2014; Kumari *et al.*, 2016; Riaz *et al.*, 2018): proteínas (e.g., anticorpos ou fragmentos destas moléculas); moléculas pequenas (e.g., ácido fólico ou folato); péptidos (e.g., arginina-glicina-ácido aspártico ou sequência peptídica RGD); aptâmeros (i.e., pequenos oligonucleótidos de cadeia simples, de RNA (do inglês, *ribonucleic acid*) ou ssDNA (do inglês, *single stranded DNA*)); e glicoproteína (transferrina). Estes ligandos são os mais explorados para o direcionamento ativo de nanossistemas contendo agentes quimioterápicos dirigidos para o local do tumor (Kumari *et al.*, 2016).

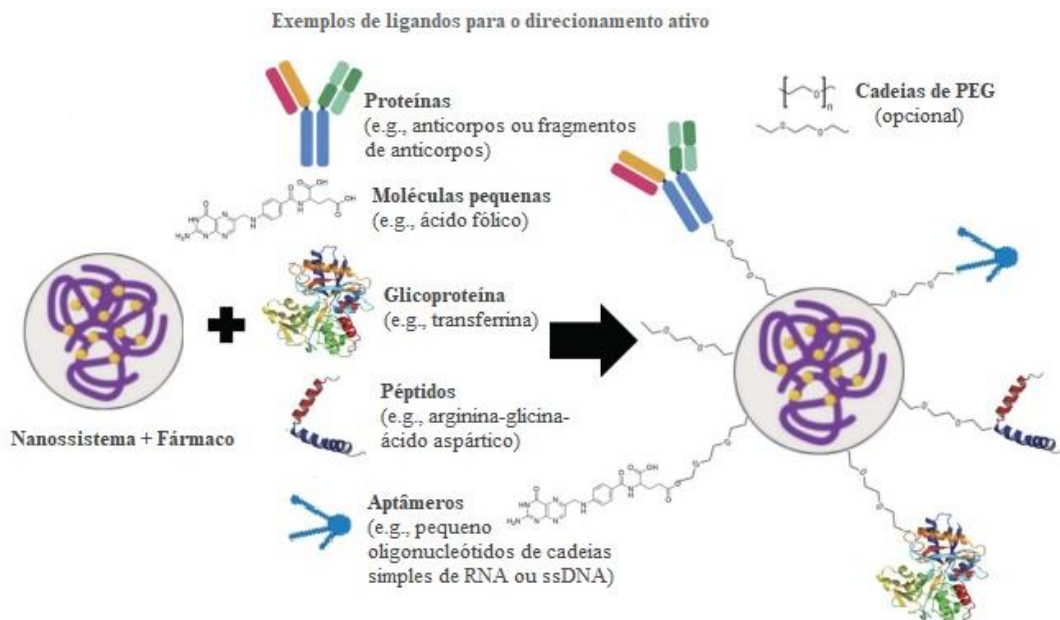


Figura 14. Exemplos de ligandos utilizados na funcionalização dos nanossistemas para o direcionamento ativo. Adaptado de (Riaz *et al.*, 2018; Morales-Cruz *et al.*, 2019).

As principais vantagens do uso de moléculas pequenas (e.g., ácido fólico ou folato) e glicoproteína (e.g., transferrina) como ligandos de direcionamento ativo incluem (Ahmad *et al.*, 2019; Houshmand *et al.*, 2020): facilidade e densidade adequada para a conjugação à superfície dos nanossistemas, estabilidade, baixo custo, menor peso molecular e menor imunogenicidade em comparação com os anticorpos. Todavia, esses ligandos apresentam naturalmente uma elevada concentração no organismo, uma vez que são fornecidos pela ingestão de alimentos e acabam por competir com o nanossistema na

ligação ao recetor celular, diminuindo, desta forma, a libertação de fármacos nos locais alvo (Houshmand *et al.*, 2020). Por outro lado, os anticorpos são moléculas altamente específicas, contudo, o seu diâmetro elevado implica na indução da imunogenicidade e possível captação pelas células do SRE, entre outras adversidades (Kamaly *et al.*, 2012; Bazak *et al.*, 2015).

Os péptidos apresentam vantagens semelhantes às moléculas pequenas e à glicoproteína referidas anteriormente, além da maior viabilidade obtida durante a produção em grande escala. Por outro lado, a especificidade de ligação é mais limitada em comparação com os anticorpos (Houshmand *et al.*, 2020). Por fim, os aptâmeros apresentam como vantagens relativamente aos anticorpos o diâmetro mais reduzido, elevada estabilidade *in vivo*, facilidade de sintetizar e caracterizar, toxicidade limitada e não imunogenicidade (Baeza *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2020). Adicionalmente, estes ligandos têm como limitações o tempo de meia-vida sanguínea curta, em consequência da degradação pela ação das nucleases séricas e a ligeira depuração renal, e o facto de a ligação aptâmero-recetor ser bastante dependente de sua estrutura tridimensional, o que pode influenciar as condições ambientais envolvidas (Morita *et al.*, 2018).

2.3 Anticorpos monoclonais: estrutura e função

A função imunológica pode ser dividida em imunidade inata e imunidade adaptativa. A imunidade inata reconhece muitos invasores sem nenhuma especificidade, e que inclui as citocinas, proteínas solúveis e barreiras físicas. A imunidade adaptativa apresenta uma alta especificidade do alvo e pode ser dividida em resposta celular, mediada por células, e em humoral, mediada por anticorpos. Desta forma, os anticorpos desempenham um papel essencial na imunidade e no combate às doenças (Marrocco *et al.*, 2019).

Os anticorpos, também conhecidos por imunoglobulinas (Igs), são glicoproteínas produzidos pelo sistema imunológico quando este deteta algum elemento estranho (mais conhecido como antigénio), sejam eles microrganismos, células tumorais ou substâncias capazes de desencadear alguma resposta alérgica (Ali *et al.*, 2020). Até ao momento, foram reconhecidas 5 subclasses (isótipos) principais de Igs, nomeadamente a IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, com diferentes características estruturais e funções efetoras, sendo a IgG

a subclasse dominante de Igs humanas, com a presença de subtipos diferenciáveis, incluindo o IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 (Farahavar *et al.*, 2019). Desta forma, a maioria dos anticorpos desenvolvidos para as aplicações biomédicas, incluindo terapia, diagnóstico e direcionamento, são do isótipo IgG (Chiang *et al.*, 2020).

Estruturalmente, os anticorpos são constituídos por duas cadeias polipeptídicas curtas ou leves (L, do inglês *light*) e duas cadeias polipeptídicas longas ou pesadas (H, do inglês *heavy*) com interações hidrófobas para manter a integridade e a estabilidade química da estrutura da Ig, e são ligadas por pontes de dissulfureto para manter a estrutura do anticorpo intacta (Farahavar *et al.*, 2019; Arslan *et al.*, 2021). Uma molécula de anticorpos tem, basicamente, a forma de um “Y” (Figura 15) (Hnasko, 2015).

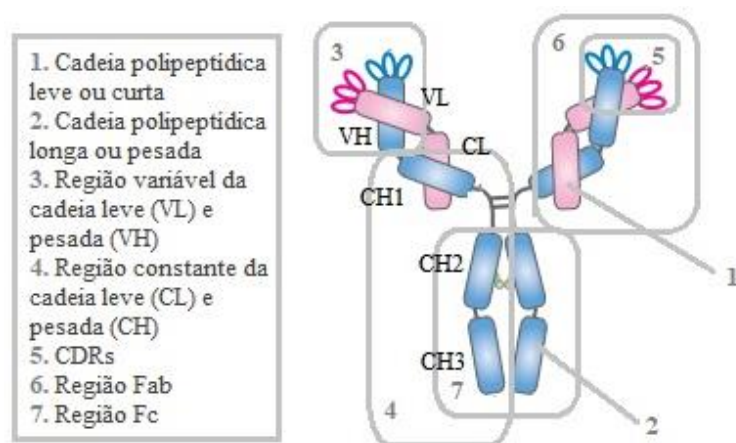


Figura 15. Estrutura básica de uma molécula de Ig. Adaptado de (Tiller *et al.*, 2015).

As cadeias dos anticorpos possuem duas regiões (ou domínios), conhecidas como região variável da cadeia leve e pesada (VL, do inglês *light chain variable region* e VH, do inglês *heavy chain variable region*) e região constante da cadeia pesada e leve (CH, do inglês *heavy chain constant region* e CL, do inglês *light chain constant region*). As Igs são subdivididas em classes estabelecidas pelas regiões constantes das suas cadeias pesadas, podendo apresentar três ou quatro estruturas (CH1, CH2, CH3 e CH4) que são fortemente protegidas e pouco variam de um anticorpo para outro.

As regiões constantes da cadeia pesada são responsáveis por algumas funções efetoras dos anticorpos. A região variável, por sua vez, diferencia-se de um anticorpo para outro e é responsável pela ligação ao antígeno. A principal diferença da região variável está nas três pequenas sequências de aminoácidos hipervariáveis, responsáveis pela

interação e especificidade para diferentes antigénios, habitualmente conhecidas como regiões determinantes de complementaridade (CDRs, do inglês *complementary determining regions*) (Farahavar *et al.*, 2019; Marrocco *et al.*, 2019).

A região variável e a região superior constante das cadeias leves e pesadas compõem a região Fab (fragmento de ligação ao antigénio, do inglês *fragment antigen-binding*), que corresponde ao local de ligação dos anticorpos aos antigénios e/ou aos recetores celulares após o processo de reconhecimento. Para além disso, os anticorpos podem ligar-se a uma grande variedade de antigénios específicos devido à diversidade da região variável (Santamaria *et al.*, 2019; Ailuno *et al.*, 2021). Por outro lado, a região Fc (fragmento cristalino, do inglês *fragment crystallizable*) é constituída por regiões constantes das cadeias pesadas e é responsável pela ativação do sistema imunitário (por exemplo, recrutamento de células natural killers (NK), macrófagos ou neutrófilos) e, consequentemente, pela destruição do antigénio que se liga ao anticorpo, como também, corresponde à região de ligação aos fármacos e/ou aos nanossistemas (Arslan *et al.*, 2021).

Nos últimos tempos, foram realizadas grandes melhorias no *design* e na produção de novos anticorpos, nomeadamente os denominados mAbs (Marabelle *et al.*, 2015). Os mAbs são definidos como cópias sintéticas produzidas em laboratório a partir de um clone de um linfócito B (anticorpo específico), que possuem afinidade monovalente (ou seja, são monoespecíficos), e que são projetados para reconhecer e ligar-se especificamente ao mesmo epítopo das proteínas envolvidas na fisiopatologia da doença (Turner *et al.*, 2015; Farahavar *et al.*, 2019). Eles podem ser utilizados tanto como agentes terapêuticos como agentes de direcionamento (Wang *et al.*, 2018).

Os alvos dos mAbs podem ser classificados em dois grupos: antigénios solúveis e antigénios ligados à membrana. Alguns exemplos de antigénios solúveis incluem: o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*), as citocinas (interleucina 6, 12 e 17 (IL-6, IL-12 e IL-17, respetivamente)), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , do inglês *tumour necrosis factor alpha*) e outros mediadores da doença (IgE e C5). Como exemplos de antigénios ligados à membrana podem citar-se os marcadores de superfície tumoral (recetor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2, do inglês *human epidermal growth factor receptor 2*), cluster de diferenciação 19 e 20 (CD19 e CD20, respetivamente)), recetores de tirosina quinase

(recetor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR, do inglês *vascular endothelial growth factor receptor*) e EGFR) e um recetor de citocina (IL-6) (Igawa *et al.*, 2016).

Apesar de na área da saúde, a eficiência das moléculas de Ig tenha sido demonstrada em 1890, foi somente em 1975, por Köhler e Milstein, que foi desenvolvido com sucesso o primeiro mAb recorrendo à tecnologia de produção de hibridoma (Kizhedath *et al.*, 2017). Com este marco, que lhes valeu o Prémio Nobel de Medicina no ano de 1984, a utilização dos mAbs expandiu-se para diferentes áreas de terapia, como oncologia, hematologia, imunologia, cardiologia, oftalmologia, infeciologia, bem como diagnóstico e imagem (Köhler *et al.*, 1975; Kizhedath *et al.*, 2017). A descoberta da técnica de hibridoma permitiu a produção de um único anticorpo específico em quantidades suficientes (Dostalek *et al.*, 2013).

No ano de 1986, a FDA aprovou o primeiro mAb de origem murina produzido por hibridomas para uso em humanos, o Orthoclone-OKT[®]3 CD3 indicado para casos de rejeição a transplante renal (Ning *et al.*, 2021).

Os mAbs possuem a vantagem de se direcionarem para um antígeno específico e, por isso, são aplicados para uma ampla variedade de condições clínicas, tais como, em terapia para o cancro, em doenças autoimunes e para prevenir a rejeição após o transplante de órgãos (Lu *et al.*, 2020). Adicionalmente ao papel na terapia de determinadas patologias e como meio de diagnóstico e imagem, os mAbs são também utilizados como sistemas de veiculação, quer como ligando de superfície do nanossistema contendo o fármaco, quer pela conjugação de anticorpo-fármaco (ADC, do inglês *antibody-drug conjugates*). Posteriormente, é realizado o seu direcionamento ativo para células, tecidos e/ou órgãos alvo, e a libertação do fármaco no local alvo (Kizhedath *et al.*, 2017; Arslan *et al.*, 2021).

Apesar dos mAbs serem extremamente interessantes do ponto de vista biofarmacêutico, muitos deles aprovados pela FDA demonstraram efeitos secundários, como por exemplo a imunogenicidade, arritmias cardíacas, leucoencefalopatia multifocal progressiva, função hepática anormal, inflamação intraocular, febre, arrepios, broncoespasmo, complicações intestinais, anafilaxia aguda, defeitos congénitos,

neuropatia, síndrome de libertação de citocinas, entre outros sintomas (Turner *et al.*, 2015; Kizhedath *et al.*, 2017).

Outro motivo limitante da utilização dos mAbs relaciona-se com a origem das resistências provocadas nos mAbs. A resistência pode ser intrínseca, na qual o anticorpo não exerce o seu efeito, mesmo que o antigénio esteja presente, ou uma resistência adquirida, em que apresenta uma sensibilidade no início ao tratamento, mas após um certo período deixam de responder. O motivo da resistência ao tratamento com mAb pode ser a perda ou modificação/mutação dos antigénios (Marrocco *et al.*, 2019). Um exemplo de resistência ocorreu com o rituximab (Rit), sendo um dos mecanismos responsáveis a perda de expressão do CD20 (Pavanello *et al.*, 2017).

Outro aspeto importante a considerar relaciona-se com a especificidade dos mAbs. Se o mAb não apresentar uma especificidade absoluta para o antigénio alvo, pode originar reações cruzadas com células saudáveis que também expressam a proteína de superfície semelhante à que está expressa no antigénio alvo (Sultana *et al.*, 2013). Ou, em situações contrárias (i.e., quando são preparados mAbs com elevada afinidade ao local alvo), estes compostos podem provocar o chamado “efeito de barreira do sítio de ligação”, no qual, no momento em que se liga ao local de ligação, impede a penetração adicional de outros constituintes no local patológico (Turner *et al.*, 2015). Adicionalmente, o custo elevado e a complexidade na produção dos mAbs dificulta o seu fabrico à escala industrial (Nagy *et al.*, 2017).

Com a evolução da tecnologia, foram produzidas novas alternativas para os mAbs, como a utilização de fragmentos de anticorpos e anticorpos biespecíficos (Bossaller *et al.*, 2013). Os fragmentos de anticorpos, como por exemplo, o fragmento Fab monovalente ou fragmentos variáveis de cadeia única (scFv, do inglês *single-chain variable fragment*), são anticorpos que possuem um diâmetro menor em relação ao anticorpo inteiro e, por possuírem esta característica, apresentam determinados benefícios em relação aos mAbs e que serão posteriormente referidas (Yan *et al.*, 2020). Estruturalmente, os fragmentos de anticorpo Fab são compostos por um domínio variável e um domínio constante de cada uma das cadeias leve e pesada, como já referido anteriormente, enquanto os scFv são uma mistura das regiões variáveis das cadeias leve e pesada (Bazak *et al.*, 2015). Por outro lado, os anticorpos biespecíficos são anticorpos que possuem numa mesma molécula dois domínios de ligação ao antigénio, sendo

possível ligar simultaneamente a dois alvos diferentes especificamente (o que não acontece com os anticorpos IgG naturais, que são anticorpos monoespecíficos) (Nagy *et al.*, 2017).

2.3.1 Anticorpos como agentes de direcionamento e o seu mecanismo de ação

Na área farmacêutica, os anticorpos têm sido muito explorados devido à sua capacidade de direcionar epítomos específicos por vários mecanismos, através de processos neutralizantes ou não neutralizantes (Ali *et al.*, 2020). Nos processos neutralizantes, os anticorpos ligam-se a um epítomo específico e impedem a entrada do antígeno na célula hospedeira (Ali *et al.*, 2020). Por outro lado, nos processos não neutralizantes, o anticorpo apresenta a capacidade de se ligar ao antígeno alvo e induzir a morte da célula pela região Fc, no qual pode desencadear a destruição da célula por mecanismos efetores imunes do hospedeiro (Marabelle *et al.*, 2015; Ali *et al.*, 2020). A indução da morte da célula pode ser feita por diferentes mecanismos, que incluem (Panowski *et al.*, 2014; Marabelle *et al.*, 2015): citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC, do inglês *antibody-dependent cellular cytotoxicity*), citotoxicidade dependente de complemento (CDC, do inglês *complement-dependent cytotoxicity*) e fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP, do inglês *antibody-dependent cellular phagocytosis*).

O processo ADCC é um mecanismo de morte celular que acontece quando o anticorpo se encontra ligado ao antígeno de superfície celular alvo e, subsequentemente, ocorre a ativação de células efectoras imunes, tais como as células NK, macrófagos ou neutrófilos, por via recetores Fc do anticorpo e da célula efetora, e que, posteriormente, permite a lise celular (Marabelle *et al.*, 2015; Marrocco *et al.*, 2019). No processo CDC, o anticorpo ligado ao respetivo antígeno de superfície celular, permite a ligação das proteínas do sistema do complemento (e.g., componente complemento 1q (C1q), um complexo proteico que faz parte da imunidade inata) ao complexo antígeno-anticorpo que, seguidamente, ativa as enzimas citotóxicas necessárias para a produção do complexo de ataque à membrana (MAC, do inglês *membrane attack complex*), conduzindo à lise do elemento estranho (Martin *et al.*, 2013). Relativamente ao processo ADCP, pode induzir a morte celular por ativação dos monócitos/macrófagos e, posteriormente, ocorre a

fagocitose (Marabelle *et al.*, 2015) Na Figura 16 é apresentado, esquematicamente, os três processos de indução de morte celular.

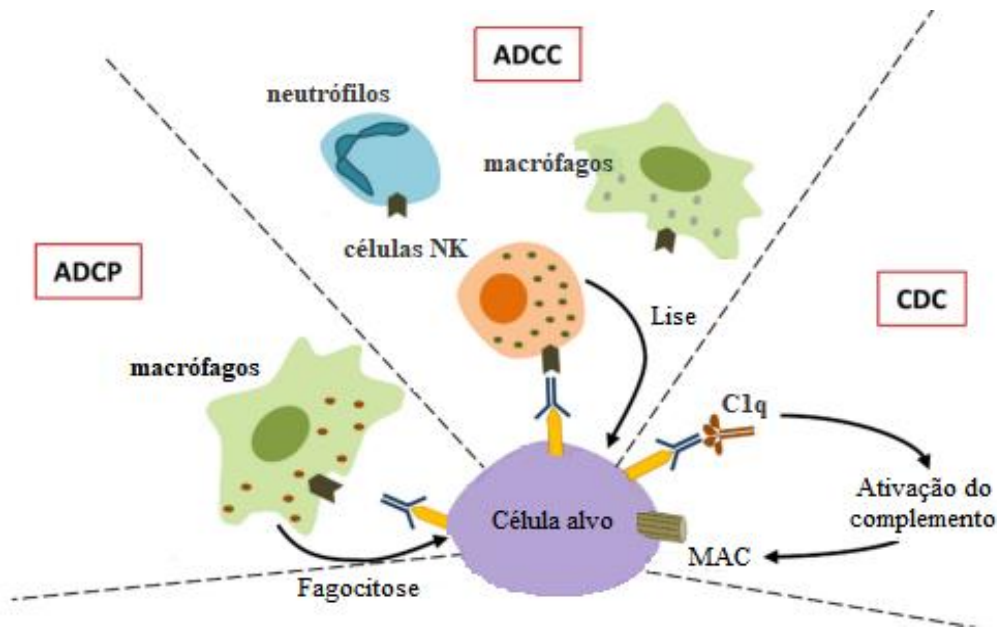


Figura 16. Representação dos processos de indução de morte celular (ADCP, ADCC e CDC) comumente usados pelos anticorpos. Adaptado de (Saltarella *et al.*, 2020).

Para além do mecanismo de direcionamento citotóxico pela ligação ao antígeno e, posterior, ativação do sistema imunitário pela região Fc, os anticorpos podem funcionar como estratégia de direcionamento ativo, quer através de ADC ou como ligando de superfície do nanossistema, tal como já foi referido anteriormente.

Quando há a formação de um ADC, ou quando o anticorpo é conjugado a um radionuclídeo, o anticorpo conserva as suas propriedades (Panowski *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2019b). Desta forma, os anticorpos podem ser utilizados como uma estratégia para direcionar e libertar uma carga de fármaco que seja tóxica para células com patologia e proporcionar benefícios terapêuticos adicionais, como o aumento da eficácia terapêutica (Xu *et al.*, 2019b). Os alvos dos ADC são, maioritariamente, proteínas não mutadas; no entanto, conforme as mutações nas proteínas de superfície das células com patologia são descobertas, é plausível o desenvolvimento de ADC com maior seletividade (Thomas *et al.*, 2016).

Uma vez que o ADC é internalizado na célula, o anticorpo mantém-se nos recetores alvo na superfície celular e pode, por sua vez, ativar células específicas (efetoras), por vias de sinalização, e resultar na morte da célula alvo (Xu *et al.*, 2019b)

Dois exemplos de ADC são: (i) o brentuximab vedotin (ADCETRIS[®]), um mAb quimérico anti-CD30 conjugado com o agente antimicrotúbulo monometil auristatina E, aprovado pelo FDA em 2011, para o uso clínico de linfoma de Hodgkin; e (ii) o gentuzumab ozogamicina (Mylotarg[®]), um mAb humanizado anti-CD22 acoplado com caliqueamicina, que foi o primeiro ADC aprovado pelo FDA (em 2000) e tem sido usado para o tratamento da leucemia mieloide aguda (Pérez-Herrero *et al.*, 2015).

2.3.2 Tipos de anticorpos monoclonais

Desde a introdução do primeiro mAb, os avanços nas técnicas de engenharia genética resultaram no desenvolvimento de diferentes mAbs que, posteriormente, foram aprovados para serem utilizados na prática clínica. Para diferenciá-los, foi necessário criar uma nomenclatura padronizada, dividindo os mAbs em quatro tipos principais: murino, quimérico, humanizado e humano, que foram introduzidos na medicina em 1986, 1994, 1999 e 2002, respetivamente (Dostalek *et al.*, 2013; Moradi-Kalbolandi *et al.*, 2018). A nomenclatura dos diferentes tipos de mAbs está descrita na Figura 17.

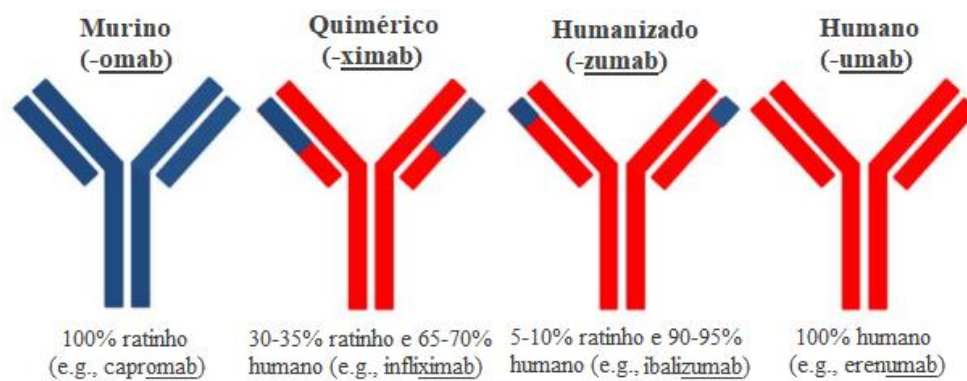


Figura 17. Diferentes tipos de mAbs, segundo a sua nomenclatura. Adaptado de (Marabelle *et al.*, 2015).

i. mAbs murinos

Os mAbs murinos foram os primeiros anticorpos monoclonais a serem produzidos e aprovados para utilização terapêutica. Estes mAbs são frequentemente derivados de

ratinhos, ou seja, representavam 100% de sequência de proteína murina através da técnica de hibridoma (Dostalek *et al.*, 2013; Steichen *et al.*, 2013).

A técnica de hibridoma é a técnica mais convencional para a produção de mAbs terapêuticos de fonte não humana. Nesta técnica ocorre o isolamento de anticorpos do ratinho, no qual o antígeno do anticorpo desejado foi previamente inoculado, e a eventual produção *in vitro* pode produzir uma quantidade elevada de anticorpos (Kizhedath *et al.*, 2017).

Tal como referido anteriormente, o muromonab CD3 (Orthoclone-OKT[®]3), dirigido contra o recetor CD3 expresso na superfície das células T, foi o primeiro anticorpo terapêutico aprovado em 1986 para a prevenção e tratamento da rejeição aguda de órgãos submetidos a um transplante (Marrocco *et al.*, 2019). Apesar disso, este anticorpo foi descontinuado no ano de 2010, uma vez que os anticorpos murinos são reconhecidos pelo organismo humano como elementos estranhos e, conseqüentemente, o sistema imunológico humano induz uma resposta com a produção de anticorpos humanos anti-murinos (HAMA, do inglês *human anti-mouse antibodies*). Como resultado, ocorre uma diminuição da duração e da eficácia do tratamento, devido à rápida eliminação dos anticorpos com limitada capacidade de atingir e permear no local alvo. Adicionalmente, impossibilita uma administração posterior do anticorpo devido aos possíveis efeitos colaterais e toxicidade gerada pela formação de imunocomplexos (Steichen *et al.*, 2013; Marrocco *et al.*, 2019; Ponziani *et al.*, 2020).

Em geral, a utilização de mAbs murinos foi restringida devido às diferenças entre o sistema imunológico humano e do roedor e, conseqüentemente, com a presença da resposta alérgica mediada por HAMA. Portanto, apesar da tecnologia de hibridoma ter apresentado um enorme avanço na medicina, os mAbs iniciais de origem murina eram imunogénicos quando injetados em humanos, e o seu uso clínico foi limitado (Marrocco *et al.*, 2019).

Este tipo de mAbs também apresentava uma menor capacidade de induzir mecanismos efetores imunes e menor seletividade para diferenciar um tecido doente e um tecido saudável, estando associado a uma pouca especificidade e direcionamento apropriado dos anticorpos para os respetivos sítios de ligação dos antígenos (Steichen *et al.*, 2013; Thomas *et al.*, 2016; Houshmand *et al.*, 2020). Com o objetivo de ultrapassar

estas limitações, várias técnicas surgiram para aumentar a produção, segurança e eficácia dos mAbs (Tada *et al.*, 2018). Foram desenvolvidos, como uma nova geração, mAbs quiméricos, humanizados e inteiramente humanos que reduziram/eliminaram a sequência de proteínas de ratinho nos mAbs (Turner *et al.*, 2015).

ii. mAbs quiméricos e mAbs humanizados

Na década de 80, foram iniciados estudos e técnicas visando tornar os mAbs com características mais semelhantes aos anticorpos humanos e, desta forma, menos imunogênicos, dando origem aos mAbs quiméricos e humanizados (Kizhedath *et al.*, 2017).

Com a evolução das técnicas de biologia molecular (tecnologia do ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*) recombinante), foi possível combinar o material genético de ratinho e humano e produzir um mAb parcialmente humano, com o objetivo de reduzir a resposta mediada por HAMA causada pelos mAbs murinos (Dostalek *et al.*, 2013; Tada *et al.*, 2018). A fusão dos segmentos do DNA codificante das cadeias variáveis VH e VL (duas subunidades VH e duas VL) de um anticorpo murino específicos para um determinado antígeno com os segmentos do DNA codificante das cadeias constantes humanas (i.e., região Fc humana com região Fab murina), permitiu produzir os mAbs quiméricos, contendo cerca de 65-70% de sequência humana (Dostalek *et al.*, 2013).

Embora este processo reduzisse a imunogenicidade e prolongasse o tempo de semi-vida, a porção murina destes mAbs ainda se encontra em concentrações elevadas capazes de desencadear uma resposta imunológica com a produção de anticorpos humanos anti-quiméricos (HACA, do inglês *human anti-chimeric antibody*) (Dostalek *et al.*, 2013; Lewiecki, 2013; Panowski *et al.*, 2014).

Para solucionar esta desvantagem, um outro método foi desenvolvido, através da inserção de CDRs murinas que determinam o sítio de ligação do anticorpo nas cadeias variáveis da cadeia pesada do anticorpo humano (Ali *et al.*, 2020). Desta forma, estes mAbs mantêm as cadeias constantes da Ig humana e preservam a afinidade e a especificidade de ligação do mAb, contendo uma menor porção murina na sua composição, com consequente, diminuição dos efeitos colaterais imunológicos (Ali *et al.*, 2020; Arslan *et al.*, 2021). Este processo de humanização denominou-se de mAb

humanizado, apresentando cerca de 90-95% de sequência humana de toda a molécula, sendo a diferença de imunogenicidade entre mAbs totalmente humanos e humanizados pouco significativa (Marrocco *et al.*, 2019).

Apesar disso, com base em dados da literatura, os mAbs humanizados podem apresentar uma pequena probabilidade de induzir a produção de anticorpos humanos anti-humanos (HAHA, do inglês *human anti-human antibodies*) e, conseqüentemente, provocar uma ligeira imunogenicidade (Marabelle *et al.*, 2015; Tada *et al.*, 2018). Para além disso, estes mAbs apresentam uma baixa ligação aos recetores do antigénio alvo (Lewiecki, 2013).

Adicionalmente ao grau de humanização, outros fatores podem influenciar na imunogenicidade ou na eficácia dos mAbs, nomeadamente (Dostalek *et al.*, 2013; de Vries *et al.*, 2020): a via de administração (intramuscular, subcutânea ou intravenosa), dose administrada, duração da terapia e diversidade fisiológica de cada doente.

Para a produção dos mAbs quiméricos e dos mAbs humanizados, são utilizados normalmente as linhas de células de mieloma murino NS0 e SP2/0, e células de ovário de hamster chinês (CHO, do inglês *chinese hamster ovary cell*) (Kizhedath *et al.*, 2017).

Como exemplo de mAb quimérico, pode citar-se o Rituxan[®] (Rit), que foi o segundo mAb a ser aprovado pela FDA, em 1997, indicado para o tratamento de linfoma não-Hodgkin (Arslan *et al.*, 2021). No mesmo ano, foi aprovado o primeiro mAb humanizado, designado de Zenapax[®] (daclizumab) para a prevenção da rejeição de transplante (Marrocco *et al.*, 2019). No ano seguinte, foi aprovado o mAb humanizado Herceptin[®] (trastuzumab), representando um dos mAbs de maior sucesso no mercado para o tratamento de tumores sólidos (Arslan *et al.*, 2021).

iii. mAbs humanos

Para eliminar totalmente o potencial imunogénico de epítomos murinos e manter a integridade ideal do funcionamento da região Fc, foram desenvolvidos os mAbs humanos (Kizhedath *et al.*, 2017).

Os mAbs humanos são anticorpos totalmente humanos que podem ser produzidos *in vitro* por diferentes métodos: (i) a partir de ratinhos geneticamente humanizados (ratinhos transgénicos), por meio da tecnologia de DNA recombinante, incluindo a

introdução de genes de Ig humanas no genoma de ratinho; ou (ii) tecnologia de exposição de fagos, incluindo a expressão recombinante de domínio Fab humanos num bacteriófago e posterior seleção dos mAbs com base nas propriedades de ligação ao antígeno pretendido (Bossaller *et al.*, 2013; Tada *et al.*, 2018; Ali *et al.*, 2020). Esta humanização completa dos anticorpos de ratinhos pode resultar em anticorpos não imunogênicos altamente específicos (Thomas *et al.*, 2016).

Como resultado destes esforços, foi produzido o primeiro mAb totalmente humano, designado de Humira[®] (adalimumab), através da técnica de exposição de fagos, com indicação para o tratamento da artrite reumatoide, 5 anos após a aprovação de Herceptin[®] (Arslan *et al.*, 2021).

Um estudo publicado este ano (2022) no *The New England Journal of Medicine*, analisa a utilização de um mAb humanizado, designado dostarlimab, que tratou o cancro colorretal (Cercek *et al.*, 2022). Os autores desenvolveram um estudo prospetivo de fase 2, no qual foi administrado o dostarlimab a cada 3 semanas durante 6 meses, a doentes com adenocarcinoma retal de estágio II ou III. Estes doentes tinham indicação para serem submetidos a tratamento com quimiorradioterapia e cirurgia. Um total de 12 doentes completaram o estudo e apresentaram uma resposta clínica completa, sem evidência da presença do tumor, avaliado por RM, biópsia, tomografia, entre outros exames. Em virtude destes resultados, os doentes não precisaram de ser submetidos a quimiorradioterapia e cirurgia, como também não presenciaram alguma progressão da doença durante o ensaio (Cercek *et al.*, 2022).

Este estudo, assim como vários outros semelhantes, é um exemplo de como os mAbs são uma ferramenta promissora para o tratamento e/ou prevenção de várias patologias que, até hoje, são difíceis de tratar, como é o caso dos tumores.

Os estudos e aprovações de mAbs e seus biossimilares estão em constante crescimento. De acordo com os dados deste ano, cerca de 114 mAbs aprovados foram aprovados pela FDA e cerca de 105 mAbs pela EMA (Society, 2022), e outras centenas de mAbs estão a ser avaliadas em ensaios clínicos (Kaplon *et al.*, 2022). Na Tabela 1, encontram-se alguns exemplos de mAbs aprovados pelas duas agências.

Tabela 1. Exemplos de mAbs que foram aprovados pela FDA e/ou EMA para uso terapêutico, preventivo e/ou de diagnóstico. Adaptado de (Elvin et al., 2013; Arslan et al., 2021; Tsao et al., 2021).

Anticorpo Monoclonal	Nome Comercial	Tipo	Antígeno-alvo	Ano de registo	Indicação Clínica
Golimumab	Simponi®	Humano	TNF- α	2009	Artrite reumatoide, artrite psoriática, espondilite anquilosante
Daclizumab	Zenapax®	Humanizado	IL-2	1997	Profilaxia da rejeição de transplante renal
Infliximab	Remicade®	Quimérico	TNF- α	1998	Doenças autoimunes (e.g., doença de Crohn, psoríase)
Dostarlimab	Jemperli®	Humanizado	PD-1	2021	Tumores sólidos avançados, como o cancro do endométrio
Erenumab	Aimovig®	Humano	CGRP	2018	Tratamento preventivo da enxaqueca
Tralokinumab	Adbry®	Humanizado	IL-13	2021	Dermatite atópica
Rituximab	Rituxan®	Quimérico	CD20	1997	Linfoma não-Hodgkin
Trastuzumab	Herceptin®	Humanizado	HER2	1998	Tumores sólidos, como o cancro de mama metastático
Teprotumumab	Tepezza®	Humano	IGF-1R	2020	Oftalmopatia de Graves
Cetuximab	Erbitux®	Quimérico	EGFR/HER1	2004	Cancro colorretal
Capromab	ProstaScint®	Murino	PSMA	1996	Diagnóstico: deteção por imagem do cancro da próstata
Denosumab	Prolia®	Humano	RANKL	2010	Metástase óssea de tumores sólidos
Mepolizumab	Nucala®	Humanizado	IL-5	2015	Asma eosinofílica grave

Funcionalização de nanossistemas com anticorpos monoclonais para o direcionamento ativo: estado da arte

Romozosumab	Evenity®	Humanizado	Esclerostina	2019	Osteoporose grave em mulheres na pós-menopausa
Alirocumab	Praluent®	Humano	PCSK9	2015	Hipercolesterolemia primária e dislipidemia mista
Abciximab	ReoPro®	Quimérico	GP IIb/IIIa	1994	Hemostasia
Raxibacumab	ABthrax®	Humano	Antigénio protetor	2012	Antraz por inalação
Belimumab	Benlysta®	Humanizado	BLyS	2011	Lúpus eritematoso sistémico
Necitumumab	Portrazza®	Humano	EGFR/HER1	2015	Cancro de pulmão de não-pequenas células
Guselkumab	Tremfya®	Humano	IL-23	2017	Psoríase em placas
Naxitamab	Danyelza®	Humanizado	GD2	2020	Neuroblastoma, Osteossarcoma
Satumomab	OncoScint®	Murino	TAG-72	1992	Diagnóstico: deteção por imagem do cancro colorretal e ovário
Ibalizumab	Trogarzo®	Humanizado	CD4	2019	Infeção por VIH-1 multirresistente a fármacos, em combinação com outros antirretrovirais

Abreviaturas: BLyS - estimulador de linfócitos B (do inglês, B lymphocyte stimulator); CD 4, CD 20 - cluster de diferenciação 4, 20, respetivamente; CGRP - péptido relacionado ao gene da calcitonina (do inglês, *calcitonin gene related peptide*); EGFR - recetor do fator de crescimento epidérmico (do inglês *epidermal growth factor receptor*); EMA - Agência Europeia do Medicamento (do inglês, *European Medicines Agency*); FDA - *Food and Drug Administration*; IL-2, IL-5, IL-13, IL-23 - interleucina 2, 5, 13, 23, respetivamente; GP IIb/IIIa - glicoproteína IIb/IIIa; HER1, HER2 - recetor tipo 1/2 do fator de crescimento epidérmico humano (do inglês *human epidermal growth factor receptor 1/2*); IGF-1R - recetor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (do inglês, *insulin-like growth factor type 1 receptor*); PCSK9 - pró-proteína convertase subtilisina/quexina tipo 9 (do inglês, *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*); PD-1 - morte celular programada 1 (do inglês, *programmed cell death*); PSMA - antigénio de membrana específico da próstata (do inglês, *prostate-specific membrane antigen*); RANKL - ligando do recetor ativador do fator nuclear kappa-B (do inglês, *receptor activator of nuclear factor kappa-*

B ligand); TAG-72 - glicoproteína 72 associada ao tumor (do inglês, *tumor associated glycoprotein-72*); TNF- α - fator de necrose tumoral alfa (do inglês *tumor necrosis factor alpha*).

2.4 Nanossistemas conjugados com anticorpos monoclonais ou com fragmentos de anticorpos

Os primeiros relatos da conjugação de nanossistemas com mAbs datam da década de 1980, com a alteração da superfície de lipossomas com mAbs para o reconhecimento de antígenos nas células alvo (Leserman *et al.*, 1980).

Os mAbs têm sido tradicionalmente utilizados para direcionar ativamente os nanossistemas para determinadas células, aumentando a especificidade e a internalização da molécula veiculada na célula alvo (Tsao *et al.*, 2021). Por exemplo, no caso de tratamento tumoral, os anticorpos acoplados à superfície do nanossistema podem ser utilizados para o reconhecimento específico de determinados recetores de superfície celular sobreexpressos nas células tumorais ou de proteínas que, posteriormente, permite a internalização pela célula por um mecanismo de endocitose, sem prejudicar as células sãs (Yan *et al.*, 2020).

O direcionamento eficaz dos nanossistemas funcionalizados com mAbs depende da seleção do próprio mecanismo de funcionalização (Conniot *et al.*, 2014). Os nanossistemas utilizados para a conjugação com os mAbs necessitam de cumprir alguns requisitos, nomeadamente (Kamaly *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2017a): elevada estabilidade no ambiente biológico, utilização de materiais biocompatíveis e biodegradáveis, serem facilmente conjugados com frações de direcionamento, e conter um número suficiente de grupos funcionais à sua superfície.

Os nanossistemas podem ser funcionalizados com mAbs por ligação covalente, por adsorção ou pela presença de moléculas adaptadoras, como a biotina e a estreptavidina (Cardoso *et al.*, 2012).

O método da ligação covalente é o mais usual e consiste na modificação da superfície do nanossistema com diferentes grupos funcionais, como, por exemplo, ácidos carboxílicos, álcoois, aminas, tióis, alcinos, azidas, aldeídos e maleimidias (Cardoso *et al.*, 2012; Richards *et al.*, 2017). A funcionalização ocorre pela reatividade química intrínseca

dos aminoácidos naturais que se encontram na estrutura de cada proteína, sendo os principais aminoácidos utilizados para esta estratégia a lisina, o ácido glutâmico, a cisteína e o ácido aspártico (Richards *et al.*, 2017). A lisina, por possuir uma estrutura química bem estabelecida, é um alvo interessante para a modificação dos nanossistemas; no entanto, este aminoácido apresenta uma grande abundância na superfície de muitas proteínas, dificultando o controlo da sua conjugação e resultando numa funcionalização desordenada e numa mistura heterogénea de produtos de fragmentos de anticorpos pós-conjugação (Chudasama *et al.*, 2016). Por este motivo, recentemente, foram desenvolvidos novos métodos de ligação mais seletivos, como a utilização dos grupos tióis por meio de conjugação com a amina (tiolação) pelo reagente de Traut, ou pela inserção de aminoácidos no local da mutagénese dirigida (e.g., cisteína), como está representado na Figura 18. Estes últimos métodos desenvolvidos foram utilizados com sucesso, originando conjugados homogéneos (Krall *et al.*, 2016; Richards *et al.*, 2017).

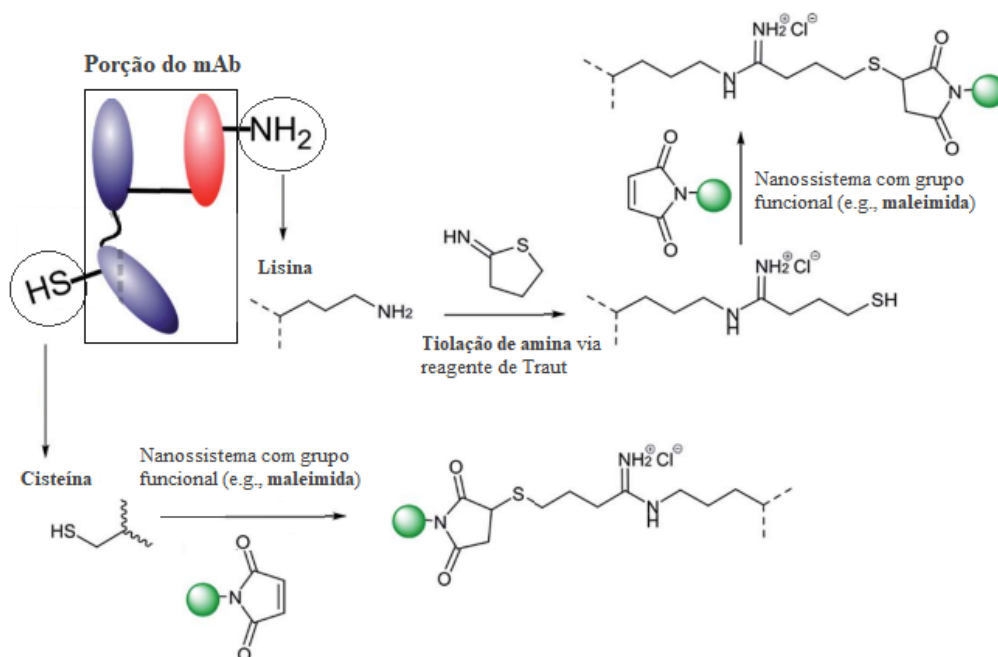


Figura 18. Representação esquemática dos mecanismos mais comuns de funcionalização de nanossistemas com mAbs. Adaptado de (Richards *et al.*, 2017).

Como já foi referido anteriormente, a funcionalização com os fragmentos de anticorpo é uma das alternativas de substituição dos mAbs, e que podem ser conjugados com os nanossistemas (Bazak *et al.*, 2015). Para tal, é necessário ter alguns cuidados durante a sua conjugação, como não causar perturbação na forma, tamanho e funcionalidade do nanossistema e do fragmento de anticorpo, bem como a ligação

necessita de ser estável, facilmente estabelecida, biocompatível e isenta de toxicidade (Richards *et al.*, 2017).

2.4.1 Vantagens e limitações

A utilização de mAbs como ligandos para funcionalizar os nanossistemas apresenta uma elevada seletividade e afinidade de ligação ao epítipo, pela presença de dois locais de ligação numa única molécula. Desta forma, o mAb apresenta a capacidade de se ligar simultaneamente a dois antigénios, conferindo um aumento do tempo de retenção em vários recetores de superfície celular. Por outro lado, o mAb permite a entrega direcionada do fármaco ao local alvo e facilita a internalização do nanossistema através do mecanismo de endocitose (Bossaller *et al.*, 2013; Bazak *et al.*, 2015).

Para além disso, a conjugação dos mAbs com os nanossistemas permite, ao contrário dos ADC, a veiculação de uma quantidade superior de fármacos para o direcionamento ativo (podendo transportar um grande número de moléculas com algumas moléculas de ligando por nanossistema), não havendo a necessidade de modificar a estrutura química do fármaco (Kamaly *et al.*, 2012). Adicionalmente, estes sistemas conseguem proteger a molécula de fármaco dos obstáculos que possam decorrer durante o percurso até o local de ação, minimizando os efeitos indesejáveis. Enquanto nos ADC, em que a quantidade de fármaco que pode ser acoplado é muito inferior, só podem ser acoplados alguns equivalentes molares de fármaco de modo a evitar perturbações com a ligação ao antigénio, não permitindo a veiculação de uma quantidade maior de fármaco numa só molécula ao local alvo (Kamaly *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2018). Quando comparado com outros ligandos, as densidades elevadas dos ligandos mAbs nos nanossistemas provaram ser vantajosas para uma maior ligação às células-alvo (Deshpande *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018).

Esta estratégia de funcionalização apresenta, no entanto, algumas limitações que impedem que seja a ideal para a veiculação dos fármacos, nomeadamente: o diâmetro e as densidades elevadas do mAb conjugado à superfície do nanossistema; exposição significativa do fragmento Fc, que pode induzir uma depuração acelerada da circulação por parte do SRE, diminuindo a concentração e ligação deles ao local alvo (como o alvo tumoral) (Deshpande *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2020). Desta forma, para ultrapassar este

problema, é necessária uma otimização adicional com a utilização de cadeias de PEG para impedir a captação por parte das células que compõem o SRE, sendo necessário um equilíbrio de ligandos de anticorpos e as cadeias de PEG à superfície do nanossistema, como foi referenciado anteriormente (Deshpande *et al.*, 2013). Além disso, pelo facto dos mAbs possuírem um diâmetro relativamente grande e serem de natureza hidrófila, têm uma capacidade limitada em penetrar e serem internalizados no tecido alvo, incluindo tecidos tumorais e matriz extracelular, proporcionando um baixo nível de distribuição no tecido alvo (Turner *et al.*, 2015).

Os fragmentos de anticorpos, por possuírem diâmetros pequenos, conseguem superar algumas das limitações que os mAbs apresentam na conjugação com os nanossistemas, além de apresentar outras vantagens, nomeadamente (Turner *et al.*, 2015; Richards *et al.*, 2017; Riaz *et al.*, 2018): elevada penetração nos tecidos (e.g., tecidos tumorais, tecido nervoso), maior capacidade de carga e de orientação de ligandos de direcionamento, menor probabilidade de iniciar uma resposta imune (menos imunogénicos), menos efeitos colaterais, fabricação mais rentável e rápida, perfil farmacocinético melhorado. No entanto, possuem como desvantagem um tempo de semi-vida relativamente curto, uma vez que se encontram abaixo do limiar de depuração renal (Turner *et al.*, 2015). Além disso, por não possuírem o domínio Fc, o tratamento de tumores fica mais limitado, evitando a citotoxicidade desencadeada pelas funções efetoras, sendo possível apenas conjugar com quimioterápicos (Nagy *et al.*, 2017).

2.4.2 Aplicações biomédicas

Os nanossistemas conjugados com mAbs podem ser utilizadas essencialmente em três aplicações biomédicas: terapêutica, diagnóstico e teranóstico. Na aplicação terapêutica, este sistema pode ser utilizado para a veiculação de fármacos e de genes, terapia combinada e PTT. Na área de diagnóstico, pode ser dividido em aplicações *in vivo* e *in vivo/in vitro*. Enquanto no teranóstico há uma combinação de aplicações terapêutica e de diagnóstico (Farahavar *et al.*, 2019).

i. Terapêutica

Nos últimos anos, houve grandes pesquisas e estudos na área oncológica para solucionar as limitações da quimioterapia convencional, e desenvolver novas terapêuticas

mais promissoras para o cancro (Gravbrot *et al.*, 2019). A utilização de nanossistemas conjugados com mAbs na aplicação tumoral tem trazido diversos benefícios para a sua terapia, uma vez que os tumores são altamente resistentes à quimioterapia convencional nos estágios mais avançados (Falvo *et al.*, 2013).

Os nanossistemas contendo de fármacos/genes conjugados com mAbs podem direcionar seletivamente uma grande quantidade de agentes quimioterápicos para as células tumorais, logo, minimizando os efeitos colaterais indesejados (Falvo *et al.*, 2013). De seguida serão apresentados alguns exemplos de estudos que demonstram a potencialidade da utilização destes conjugados.

Voltan e colaboradores sintetizaram NPs poliméricas de PLGA conjugadas com Rit (Rituxan[®], mAb quimérico), contendo Nutlin-3 (N3) (inibidor não genotóxico das interações p53/MDM2), com o objetivo de obter um direcionamento seletivo para as células cancerígenas B-leucémicas (JVM-2 positivas para CD20), e ativar a via de sinalização de p53 (Voltan *et al.*, 2013). Nos estudos de viabilidade celular e apoptose celular, o N3 demonstrou um potencial terapêutico para as células cancerígenas do tipo p53, inibindo a ligação entre p53 e MDM2 (i.e., regulador negativo do supressor de tumor p53), apresentando melhores resultados na morte celular das células cancerígenas B-leucémicas, em comparação às NPs que não apresentavam o N3 na sua estrutura e o controlo (NPs poliméricas de PLGA) (Figura 19). Adicionalmente, em outros estudos, as NPs contendo PLGA-N3-Rit em ratinhos enxertados com células JVM-2 mostraram maior eficácia terapêutica e um aumento médio de sobrevivência.

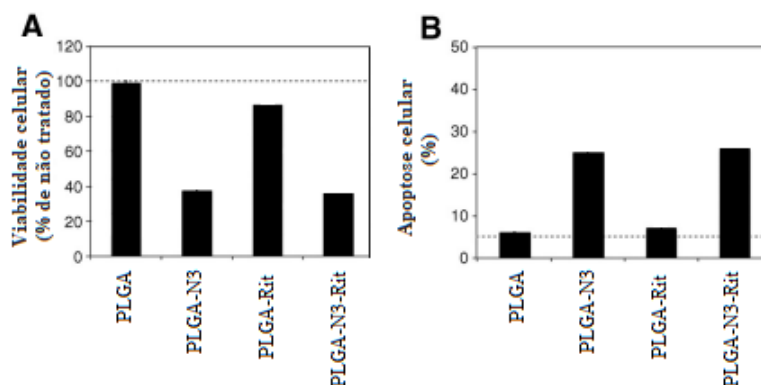


Figura 19. Comparação de resultados na avaliação da (A) viabilidade celular e (B) apoptose celular das diferentes conjugações das NPs e o controlo. Adaptado de (Voltan *et al.*, 2013).

Noutro estudo, Falvo e colegas produziram NPs magnéticas revestidas com cadeia pesada de ferritina (HFt, do inglês *ferritin heavy chain*) contendo a cisplatina (Pt) conjugados com mAbs murinos Ep1 (HFt-Pt-Ep1) para o antígeno específico do melanoma humano CSPG4 (Falvo *et al.*, 2013). A Pt é um agente quimioterápico eficaz contra muitos tumores, no entanto, a sua aplicação clínica é restrita, essencialmente nos casos de melanomas, devido à sua instabilidade química e baixa solubilidade em água. Para obter o mesmo efeito que outro agente quimioterápico convencional, a Pt necessita de ser administrada em doses superiores, originando possíveis efeitos indesejáveis. O objetivo dos autores neste estudo foi avaliar os resultados quando o HFt-Pt está ou não conjugado com mAb Ep1, com o Pt isolado, e o tampão fosfato (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) como controlo. Adicionalmente, os autores pretenderam verificar se o tratamento era direcionado ao local alvo, que é o melanoma. Para isso, foram utilizados ratinhos que apresentavam melanoma e cancro da mama. Os autores reportaram que o HFt-Pt isolado não atingiu o local alvo com tanta precisão comparativamente ao conjugado com o mAb Ep1 devido a falta de especificidade por parte do Hft. Com a presença do mAb Ep1, foi demonstrado uma concentração de 25 vezes maior por melanoma.

A PTT é uma técnica minimamente invasiva que utiliza agentes de transdução fototérmica (PTAs, do inglês *photothermal transduction agents*). Estes agentes transformam a energia da luz em calor, através do efeito fototérmico, com o objetivo de aumentar a temperatura do ambiente circundante e desencadear a morte das células tumorais. Esta técnica tem atraído a atenção dos investigadores pelas vantagens que apresenta, como ser minimamente invasiva, altamente eficaz, permitir uma recuperação rápida, capaz de eliminar vários tipos de tumores, apresentar uma forte absorção em regiões de NIR, ser biocompatível e biodegradável e prevenir o dano do tecido saudável (Liu *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019). Manivasagan e colaboradores sintetizaram um agente de fotoablação fototérmica composto por nanobastões de ouro (AuNRs, do inglês, *gold nanorods*) revestidos por Fucoidan (Fu) conjugados com mAbs anti-EGFR para o tratamento precoce de cancro da mama (Manivasagan *et al.*, 2017). Nos estudos *in vitro*, o nanossistema desenvolvido demonstrou uma elevada eficácia na ablação de células epiteliais do cancro da mama (MDA-MB-231), e nos estudos *in vivo*, verificou-se uma recuperação total sem recorrência do tecido tumoral que, por fim, foi reconstruída em tecido normal pela irrigação com laser NIR.

ii. Diagnóstico

No diagnóstico, os nanossistemas conjugados com mAbs são utilizados em diversos campos, como na aplicação de imagens não invasivas, incluindo a RM, a tomografia computadorizada (TC) e a ultrassonografia (US), através do uso de NPs como agentes de contraste, e na produção de instrumentos cirúrgicos e sensores (Duncan *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2017). A utilização de nanossistemas como agentes de imagem consegue superar algumas limitações de modalidade de imagem única, melhorando a sensibilidade da sonda, a resolução e o fornecimento de informações, e apresentam a capacidade para penetrar com mais profundidade no tecido (Ma *et al.*, 2017).

Han e colaboradores desenvolveram conjugados de QDs com mAbs para a projeção de imagem citométrica intravital em ratinhos (Han *et al.*, 2015). Os QDs são compostos fluoróforos com diâmetro adequado para a circulação e difusão prolongada e que se ligam com elevada especificidade às células. Os QDs foram revestidos com ligandos de poliiimidazol com exibição de norborneno utilizando cicloadição de tetrazina-norborneno. O conjugado preparado foi utilizado para a detecção *in vivo* de células únicas pertencentes a uma população rara de células-tronco progenitoras e hematopoiéticas na medula óssea de ratinhos, como as células Sca1+c-Kit⁺ (i.e., células-tronco hematopoiéticas de curto e longo prazo). Os estudos foram realizados numa janela óssea da calvária e os resultados obtidos da imagem intravital demonstraram que os conjugados QD-mAb difundem-se em toda a medula óssea e direcionaram com eficácia às células investigadas.

A molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1, do inglês *vascular cell adhesion molecule-1*) é uma proteína transmembranar expressa por leucócitos e endoteliócitos pertencente à família das Igs. A molécula VCAM-1 desempenha um papel essencial na fase inicial dos processos patológicos, como aterosclerose, artrite reumatoide, cancro, insuficiência renal, entre outras patologias. As nanoconchas de ouro (AuNSs, do inglês *gold nanoshells*) são um nanossistema promissor para o diagnóstico, uma vez que apresentam propriedades de absorção e ressonância de plasmão

de superfície, tornando-as boas candidatas para a tomografia fotoacústica (Ailuno *et al.*, 2021). Rouleau e colegas desenvolveram uma sonda molecular fotoacústica a partir de AuNSs apresentando NIR conjugadas com moléculas de PEG e anticorpos anti-VCAM-

1 (i.e., imunonanoconchas (Ab-PEG-AuNSs)) para melhorar a estabilidade e biocompatibilidade, que foi posteriormente avaliado através de um ensaio ELISA (Rouleau *et al.*, 2013). A validação da sonda molecular realizou-se em estudos *in vivo* e *ex vivo* utilizando ratinhos e não apresentou sinais de toxicidade perceptíveis. Foram realizados testes de imunocitofluorescência *in vitro* em células endoteliais murinas ativadas por TNF- α (células tumorais) pelo anticorpo VCAM-1, no qual foi comparado a visualização das sondas no local alvo com a presença de AuNSs PEGuiladas (AuNSs-PEG), imunonanoconchas e o controlo (i.e., anticorpos VCAM-1 não conjugados com o mesmo anticorpo anti-VCAM-1 e um anticorpo VCAM-1 comercial associado com Alexa 647 (i.e., corante fluorescente)). Como resultado, as AuNSs PEGuiladas não se ligaram às células endoteliais ativadas por TNF- α , demonstrando uma visualização ténue, enquanto as imunonanoconchas detetaram e ligaram-se às células em análise, permitindo uma fluorescência mais intensa e uma deteção semelhante da presença das células endoteliais quando comparado com o controlo. Além disso, verificou-se, pela tomografia de projeção ótica de aortas e corações de ratinhos ateroscleróticos *ex vivo*, uma acumulação seletiva das imunonanoconchas no arco aórtico destes animais em comparação com o controlo (ratinhos saudáveis) (Figura 20). Estas imunonanoconchas demonstraram serem úteis para atingir as placas ateroscleróticas em pequenos animais, trazendo novas ferramentas no diagnóstico da progressão ou regressão da doença.

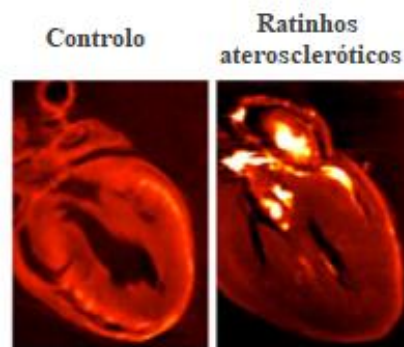


Figura 20. Exemplo representativo do resultado da tomografia de projeção ótica de um ratinho saudável (controlo) e aterosclerótico, localizando a molécula VCAM-1 no arco aórtico.

Adaptado de (Rouleau *et al.*, 2013).

iii. Teranóstico

Os nanossistemas utilizados em teranóstico têm tido uma abordagem promissora para o tratamento eficaz e para um diagnóstico precoce no cancro, visto que é uma doença

que necessita de um tratamento e diagnóstico específico e rápido (Soares *et al.*, 2018a; Lecocq *et al.*, 2019). Desta forma, juntar num mesmo nanossistema as propriedades terapêuticas e diagnósticas tornam-se num grande aliado. Estes sistemas são adaptados para aumentar a especificidade do local, para que haja um diagnóstico eficiente e intervenção terapêutica (Opoku-Damoah *et al.*, 2016).

Liang e colegas prepararam nanoestrelas de ouro (GNS, do inglês *gold nanostars*) PEGuiladas conjugadas com mAbs CD44v6 (GNS-PEG-CD44v6), com o objetivo de funcionar simultaneamente como nanossondas multifuncionais para imagens fotoacústicas direcionadas e para terapia direcionada por ablação térmica de células-tronco cancerígenas gástricas (GCSCs, do inglês *gastric cancer stem cells*) (Liang *et al.*, 2015). No estudo por microscopia *in vitro*, as nanossondas apresentaram uma elevada afinidade para as células GCSCs em comparação com o GNS-PEG, e foram capazes de destruir completamente estas células através do efeito fototérmico com laser NIR (Figura 21). No estudo *in vivo*, as nanossondas foram injetadas no tumor enxertado em ratinhos por via intravenosa, comprovando-se, por imagens fotoacústicas, que as nanossondas GNS-PEG-CD44v6 conseguiram direcionar ativamente o sistema vascular do cancro gástrico e também inibir o crescimento do tumor, após a irradiação com o laser NIR. Os autores reportaram uma taxa de sobrevivência de 100% após 7 semanas e uma taxa de 90% após 8 semanas, enquanto que no grupo de animais administrados com GNS não conjugados apresentaram uma taxa de sobrevivência de 80%, 60%, 50%, 30% e 0% depois de 3, 4, 5 e 6 semanas, respetivamente.

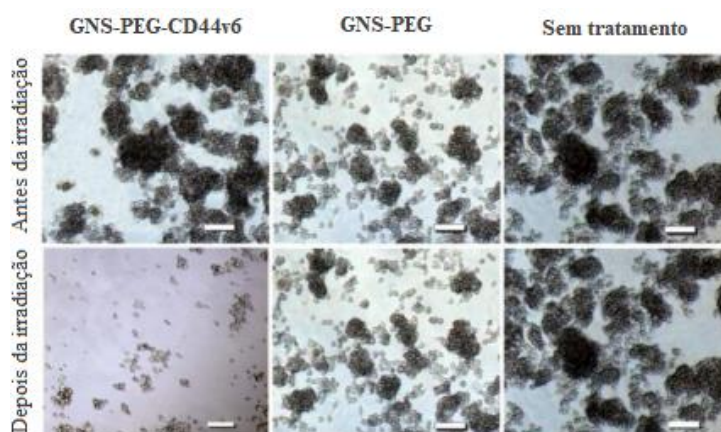


Figura 21. Imagens microscópicas, *in vitro*, das colônias GCSCs quando estas estão submetidas sob o tratamento com GNS-PEG-CD44v6 e GNS-PEG, após a irradiação com o laser NIR.

Adaptado de (Liang *et al.*, 2015).

Novas abordagens de aplicações biomédicas vêm surgindo, como a utilização de nanossistemas à base de lipoproteína de alta densidade (HDL, do inglês *high density lipoprotein*) que possui várias vantagens, nomeadamente (Yang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2017): não ser imunogénica, ser biodegradável, tamanho apropriado para não ser captada pelas células do SRE, contribuir para um bom funcionamento do colesterol por imitar as propriedades do HDL derivado do plasma, e suscetibilidade de funcionar como vetor não viral para o transporte de moléculas de ácido nucleico transformadas. Para permitir que uma mesma molécula tenha uma combinação de diagnóstico e terapia para o tratamento de muitos tumores Tfr+, os quais são altamente expressos em tumores malignos, foram preparados NPs de péptido-fosfolípido do tipo HDL (HPPS, do inglês *HDL-mimicking peptide phospholipid scaffold*) funcionalizadas com mAb (HPPS-mAb) hTFR (TFR humano) e siRNA (do inglês, *small interfering RNA*) direcionado à survivina (i.e., proteína inibidora da apoptose abundantemente expressa em tecidos tumorais) no invólucro, contendo no seu núcleo um fluoróforo de NIR denominado de DiR-BOA (He *et al.*, 2020). A investigação da especificidade de direcionamento foi avaliada por imunocoagulação *in vitro* e em ratinhos enxertados com tumor duplo *in vivo*. Após estes ensaios, os autores concluíram que o HPPS-mAb possui a capacidade de direcionar especificamente para as células tumorais e adquire reconhecimento preferencial por Tfr. Para além disso, estas NPs são capazes de entregar cargas úteis de siRNA com alvo terapêutico na survivina em células de Tfr+ HepG2, de modo a mediar a apoptose celular.

III. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

A aplicação dos nanossistemas vem demonstrando uma grande mudança na parte clínica, por apresentar diversas vantagens quando comparado com as formas farmacêuticas ditas convencionais. Os nanossistemas protegem o fármaco de diversas condições adversas que possam ocorrer durante o percurso até o local alvo, além de permitir uma libertação controlada do fármaco.

Com base nos resultados descritos, observa-se que a funcionalização da superfície dos nanossistemas com mAbs é de facto bastante benéfica, tendo-se verificado melhorias no direcionamento seletivo dos nanossistemas e na posterior libertação dos fármacos no local alvo, sem que estes interfiram com os tecidos saudáveis.

Apesar dos mAbs apresentarem evoluções positivas no decorrer dos anos, as suas características estruturais (e.g., o seu diâmetro elevado) influenciam na eficácia de direcionamento, uma vez que são facilmente detetados pelas células do SRE. Uma nova alternativa que tem sido estudada é a utilização de fragmentos de anticorpos, sendo que num futuro próximo é esperado uma crescente aplicação destas novas abordagens.

Adicionalmente, constatou-se que esta temática vem despertando, nos últimos anos, um grande interesse em doenças que necessitam de um tratamento mais direcionado, como é o caso do cancro, uma vez que os agentes quimioterápicos convencionais enfrentam grandes dificuldades para direcionar os fármacos seletivamente e, conseqüentemente, apresentam efeitos indesejáveis para o organismo humano. Uma outra aplicação que tem sido investigada, é a utilização destes conjugados para diagnóstico e terapêutico, já que alguns dos nanossistemas (e.g., NPs de ouro, QDs,) apresentam propriedades fototérmicas, e podem ser utilizados tanto como agentes de imagem como agentes terapêuticos.

A escrita desta dissertação enriqueceu os meus conhecimentos acerca das estratégias terapêuticas atuais, e daquelas que ainda estão em desenvolvimento, para as doenças oncológicas, doenças autoimunes, entre outras. Uma vez que se tratam de doenças de elevada prevalência, é importante para mim obter uma compreensão profunda dessas patologias, bem como dos respetivos tratamentos, de modo a procurar estar sempre na vanguarda do conhecimento relativo à minha área. Assim, penso que a realização desta dissertação contribuiu para me tornar uma melhor profissional da saúde. Adicionalmente,

a curiosidade intelectual que este tema despertou em mim inicialmente, associada ao profundo interesse que fui adquirindo à medida que a escrita da dissertação progredia, acredito poder vir a continuar a investigação deste num hipotético doutoramento. Dado que, considero ser uma temática relevante e a ter observado um elevado potencial nestes novos sistemas, se devidamente explorados.

IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu-Thabit, N. e Ratemi, E. (2020). Hybrid Porous Silicon Biosensors Using Plasmonic and Fluorescent Nanomaterials: A Mini Review. *Front Chem*, 8, pp. 454.
- Ahmad, A. *et al.* (2019). Precision Cancer Nanotherapy: Evolving Role of Multifunctional Nanoparticles for Cancer Active Targeting. *J Med Chem*, 62(23), pp. 10475-10496.
- Ahmad, J. *et al.* (2015). Nanotechnology-based inhalation treatments for lung cancer: state of the art. *Nanotechnol Sci Appl*, 8, pp. 55-66.
- Ailuno, G. *et al.* (2021). Anti-Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Nanosystems: A Promising Strategy Against Inflammatory Based Diseases. *J Nanosci Nanotechnol*, 21(5), pp. 2793-2807.
- Ali, M. G. *et al.* (2020). Recent advances in therapeutic applications of neutralizing antibodies for virus infections: an overview. *Immunol Res*, 68(6), pp. 325-339.
- Alkilany, A. M. *et al.* (2019). Ligand density on nanoparticles: A parameter with critical impact on nanomedicine. *Adv Drug Deliv Rev*, 143, pp. 22-36.
- Alok, A. *et al.* (2013). Nanotechnology: A boon in oral cancer diagnosis and therapeutics. *SRM Journal of Research in Dental Sciences*, 4(4), pp. 154-160.
- Anselmo, A. C. e Mitragotri, S. (2019). Nanoparticles in the clinic: An update. *Bioeng Transl Med*, 4(3), pp. e10143.
- Arslan, F. B., Ozturk Atar, K. e Calis, S. (2021). Antibody-mediated drug delivery. *Int J Pharm*, 596, pp. 120268.
- Attia, M. F. *et al.* (2019). An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites. *J Pharm Pharmacol*, 71(8), pp. 1185-1198.
- Baeza, A., Colilla, M. e Vallet-Regí, M. (2015). Advances in mesoporous silica nanoparticles for targeted stimuli-responsive drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 12(2), pp. 319-337.

- Bangham, A. D. e Horne, R. W. (1964). Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J Mol Biol*, 8, pp. 660-668.
- Bayda, S. *et al.* (2019). The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*, 25(1), pp. 112.
- Bazak, R. *et al.* (2015). Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. *J Cancer Res Clin Oncol*, 141(5), pp. 769-784.
- Bharti, C. *et al.* (2015). Mesoporous silica nanoparticles in target drug delivery system: A review. *Int J Pharm Investig*, 5(3), pp. 124-133.
- Bitounis, D. *et al.* (2012). Optimizing Druggability through Liposomal Formulations: New Approaches to an Old Concept. *ISRN Pharm*, 2012, pp. 738432.
- Borges, A. *et al.* (2020). Solid Lipid Nanoparticles as Carriers of Natural Phenolic Compounds. *Antioxidants (Basel)*, 9(10), pp. 998.
- Bossaller, L. e Rothe, A. (2013). Monoclonal antibody treatments for rheumatoid arthritis. *Expert Opin Biol Ther*, 13(9), pp. 1257-1272.
- Bozzuto, G. e Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine*, 10, pp. 975-999.
- Brunetti, J. *et al.* (2018). Near-infrared quantum dots labelled with a tumor selective tetrabranched peptide for in vivo imaging. *J Nanobiotechnology*, 16(1), pp. 21.
- Cardoso, M. M., Peça, I. N. e Roque, A. C. (2012). Antibody-conjugated nanoparticles for therapeutic applications. *Curr Med Chem*, 19(19), pp. 3103-3127.
- Catuogno, S., Esposito, C. L. e de Franciscis, V. (2016). Aptamer-Mediated Targeted Delivery of Therapeutics: An Update. *Pharmaceuticals (Basel)*, 9(4), pp. 69.
- Cercek, A. *et al.* (2022). PD-1 Blockade in Mismatch Repair-Deficient, Locally Advanced Rectal Cancer. *N Engl J Med*, 386(25), pp. 2363-2376.

- Chiang, C. C. e Schwedt, T. J. (2020). Calcitonin gene-related peptide (CGRP)-targeted therapies as preventive and acute treatments for migraine-The monoclonal antibodies and gepants. *Prog Brain Res*, 255, pp. 143-170.
- Chudasama, V., Maruani, A. e Caddick, S. (2016). Recent advances in the construction of antibody-drug conjugates. *Nat Chem*, 8(2), pp. 114-119.
- Conniot, J. *et al.* (2014). Cancer immunotherapy: nanodelivery approaches for immune cell targeting and tracking. *Front Chem*, 2, pp. 105.
- Couvreur, P. (2019). Nanomedicine: From where are we coming and where are we going? *J Control Release*, 311-312, pp. 319-321.
- da Silva Santos, V., Badan Ribeiro, A. P. e Andrade Santana, M. H. (2019). Solid lipid nanoparticles as carriers for lipophilic compounds for applications in foods. *Food Res Int*, 122, pp. 610-626.
- de Vries, T., Villalon, C. M. e MaassenVanDenBrink, A. (2020). Pharmacological treatment of migraine: CGRP and 5-HT beyond the triptans. *Pharmacol Ther*, 211, pp. 107528.
- Deshpande, P. P., Biswas, S. e Torchilin, V. P. (2013). Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. *Nanomedicine (Lond)*, 8(9), pp. 1509-1528.
- Dianat-Moghadam, H. *et al.* (2018). Cancer stem cells-emanated therapy resistance: Implications for liposomal drug delivery systems. *J Control Release*, 288, pp. 62-83.
- Diaz-Gonzalez, M. *et al.* (2020). Quantum Dot Bioconjugates for Diagnostic Applications. *Top Curr Chem (Cham)*, 378(2), pp. 35.
- Dostalek, M. *et al.* (2013). Pharmacokinetics, pharmacodynamics and physiologically-based pharmacokinetic modelling of monoclonal antibodies. *Clin Pharmacokinet*, 52(2), pp. 83-124.
- Drexler, K. E., Peterson, C. e Pergamit, G. (1991). *Unbounding the future : the nanotechnology revolution*. New York, Morrow.

- Duncan, R. e Gaspar, R. (2011). Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol Pharm*, 8(6), pp. 2101-2141.
- Elvin, J. G., Couston, R. G. e van der Walle, C. F. (2013). Therapeutic antibodies: market considerations, disease targets and bioprocessing. *Int J Pharm*, 440(1), pp. 83-98.
- Eskandari, Z. *et al.* (2020). Targeted Nanomedicines for Cancer Therapy, From Basics to Clinical Trials. *J Pharm Pharm Sci*, 23(1), pp. 132-157.
- Falvo, E. *et al.* (2013). Antibody-drug conjugates: targeting melanoma with cisplatin encapsulated in protein-cage nanoparticles based on human ferritin. *Nanoscale*, 5(24), pp. 12278-12285.
- Farahavar, G. *et al.* (2019). Antibody-guided nanomedicines as novel breakthrough therapeutic, diagnostic and theranostic tools. *Biomater Sci*, 7(10), pp. 4000-4016.
- Fatima, I. *et al.* (2021). Quantum Dots: Synthesis, Antibody Conjugation, and HER2-Receptor Targeting for Breast Cancer Therapy. *J Funct Biomater*, 12(4), pp. 75.
- Ferreira, M. *et al.* (2021). Lipid-based nanosystems for targeting bone implant-associated infections: current approaches and future endeavors. *Drug Deliv Transl Res*, 11(1), pp. 72-85.
- Feynman, R. P. (1960). There's plenty of room at the bottom. *Engineering and Science*, 23, pp. 22 - 36.
- Fornaguera, C. e Garcia-Celma, M. J. (2017). Personalized Nanomedicine: A Revolution at the Nanoscale. *J Pers Med*, 7(4), pp. 12.
- Friberg, S. e Nyström, A. M. (2015). Nanotechnology in the war against cancer: new arms against an old enemy - a clinical view. *Future Oncol*, 11(13), pp. 1961-1975.
- Gbian, D. L. e Omri, A. (2022). Lipid-Based Drug Delivery Systems for Diseases Managements. *Biomedicines*, 10(9), pp. 2137.
- Gravbrot, N. *et al.* (2019). Therapeutic Monoclonal Antibodies Targeting Immune Checkpoints for the Treatment of Solid Tumors. *Antibodies (Basel)*, 8(4), pp. 51.

- Greish, K. *et al.* (2018). Nanomedicine: is it lost in translation? *Ther Deliv*, 9(4), pp. 269-285.
- Gutknecht, M. F. e Bouton, A. H. (2014). Functional significance of mononuclear phagocyte populations generated through adult hematopoiesis. *J Leukoc Biol*, 96(6), pp. 969-980.
- Han, H. S. *et al.* (2015). Quantum dot/antibody conjugates for in vivo cytometric imaging in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(5), pp. 1350-1355.
- He, Q. *et al.* (2020). Establishment of a hTfR mAb-functionalized HPPS theranostic nanoplatform. *Nanotheranostics*, 4(3), pp. 119-128.
- Hirsjärvi, S., Passirani, C. e Benoit, J. P. (2011). Passive and active tumour targeting with nanocarriers. *Curr Drug Discov Technol*, 8(3), pp. 188-196.
- Hnasko, R. M. (2015). The Biochemical Properties of Antibodies and Their Fragments. *Methods Mol Biol*, 1318, pp. 1-14.
- Houshmand, M. *et al.* (2020). Nanocarriers as Magic Bullets in the Treatment of Leukemia. *Nanomaterials (Basel)*, 10(2), pp. 276.
- Hu, B. *et al.* (2020). Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduct Target Ther*, 5(1), pp. 101.
- Huang, R. S. *et al.* (2016a). Performance of the Verigene(R) enteric pathogens test, Biofire FilmArray gastrointestinal panel and Luminex xTAG(R) gastrointestinal pathogen panel for detection of common enteric pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 86(4), pp. 336-339.
- Huang, Y. *et al.* (2016b). Applications of nanoparticle drug delivery systems for the reversal of multidrug resistance in cancer. *Oncol Lett*, 12(1), pp. 11-15.
- Igawa, T., Haraya, K. e Hattori, K. (2016). Sweeping antibody as a novel therapeutic antibody modality capable of eliminating soluble antigens from circulation. *Immunol Rev*, 270(1), pp. 132-151.

- Ipar, V. S., Dsouza, A. e Devarajan, P. V. (2019). Enhancing Curcumin Oral Bioavailability Through Nanoformulations. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 44(4), pp. 459-480.
- ISO (2008). *Nanotechnologies — Terminology and definitions for nano-objects — Nanoparticle, nanofibre and nanoplate*.
- Jatzkewitz, H. (1955). An ein kolloidales blutplasmaersatzmittel (polyvinylpyrrolidon) gebundenes peptamin (glycyl l-leucyl-mezcalin) als neuartige depotform fur biologisch aktive primare amine (mezcalin). *Z Naturforsch B*, 10, pp. 27-31.
- Jha, S. *et al.* (2018). Pharmaceutical potential of quantum dots. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 46(sup1), pp. 57-65.
- Julien, D. C. *et al.* (2011). Utilization of monoclonal antibody-targeted nanomaterials in the treatment of cancer. *MAbs*, 3(5), pp. 467-478.
- Jung, Y. e Kim, D. (2021). Recent advances in hybrid system of porous silicon nanoparticles and biocompatible polymers for biomedical applications. *Biomed Eng Lett*, 11(3), pp. 171-181.
- Kamaly, N. *et al.* (2012). Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chem Soc Rev*, 41(7), pp. 2971-3010.
- Kaplon, H. *et al.* (2022). Antibodies to watch in 2022. *MAbs*, 14(1), pp. 2014296.
- Kargozar, S. e Mozafari, M. (2018). Nanotechnology and Nanomedicine: Start small, think big. *Materials Today: Proceedings*, 5(7), pp. 15492-15500.
- Kizhedath, A., Wilkinson, S. e Glassey, J. (2017). Applicability of predictive toxicology methods for monoclonal antibody therapeutics: status Quo and scope. *Arch Toxicol*, 91(4), pp. 1595-1612.
- Köhler, G. e Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), pp. 495-497.

- Kong, F. Y. *et al.* (2017). Unique Roles of Gold Nanoparticles in Drug Delivery, Targeting and Imaging Applications. *Molecules*, 22(9), pp. 1445.
- Kopeckova, K. *et al.* (2019). Nanodrugs used in cancer therapy. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 163(2), pp. 122-131.
- Kraft, J. C. *et al.* (2014). Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems. *J Pharm Sci*, 103(1), pp. 29-52.
- Krall, N. *et al.* (2016). Site-selective protein-modification chemistry for basic biology and drug development. *Nat Chem*, 8(2), pp. 103-113.
- Kumar, A. *et al.* (2013). *Nanomedicine in Drug Delivery*. CRC Press.
- Kumari, P., Ghosh, B. e Biswas, S. (2016). Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. *J Drug Target*, 24(3), pp. 179-191.
- Kumeria, T. *et al.* (2017). Porous silicon for drug delivery applications and theranostics: recent advances, critical review and perspectives. *Expert Opin Drug Deliv*, 14(12), pp. 1407-1422.
- Kuo, Y.-C. e Shih-Huang, C.-Y. (2014). Solid lipid nanoparticles with surface antibody for targeting the brain and inhibiting lymphatic phagocytosis. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45(4), pp. 1154-1163.
- Lecocq, Q. *et al.* (2019). Theranostics in immuno-oncology using nanobody derivatives. *Theranostics*, 9(25), pp. 7772-7791.
- Lee, S. H., Kang, J. S. e Kim, D. (2018). A Mini Review: Recent Advances in Surface Modification of Porous Silicon. *Materials (Basel)*, 11(12), pp. 2557.
- Leserman, L. D. *et al.* (1980). Targeting to cells of fluorescent liposomes covalently coupled with monoclonal antibody or protein A. *Nature*, 288(5791), pp. 602-604.
- Lewiecki, E. M. (2013). Monoclonal antibodies for the treatment of osteoporosis. *Expert Opin Biol Ther*, 13(2), pp. 183-196.
- Li, J., Qiao, Y. e Wu, Z. (2017a). Nanosystem trends in drug delivery using quality-by-design concept. *J Control Release*, 256, pp. 9-18.

- Li, K., Nejadnik, H. e Daldrup-Link, H. E. (2017b). Next-generation superparamagnetic iron oxide nanoparticles for cancer theranostics. *Drug Discov Today*, 22(9), pp. 1421-1429.
- Li, W. e Chen, X. (2015). Gold nanoparticles for photoacoustic imaging. *Nanomedicine (Lond)*, 10(2), pp. 299-320.
- Li, Z. *et al.* (2017c). Cancer drug delivery in the nano era: An overview and perspectives (Review). *Oncol Rep*, 38(2), pp. 611-624.
- Liang, S. *et al.* (2015). CD44v6 Monoclonal Antibody-Conjugated Gold Nanostars for Targeted Photoacoustic Imaging and Plasmonic Photothermal Therapy of Gastric Cancer Stem-like Cells. *Theranostics*, 5(9), pp. 970-984.
- Liu, Y. *et al.* (2019). Photothermal therapy and photoacoustic imaging via nanotheranostics in fighting cancer. *Chem Soc Rev*, 48(7), pp. 2053-2108.
- Liu, Y., Crawford, B. M. e Vo-Dinh, T. (2018). Gold nanoparticles-mediated photothermal therapy and immunotherapy. *Immunotherapy*, 10(13), pp. 1175-1188.
- Lombardo, D., Kiselev, M. A. e Caccamo, M. T. (2019). Smart Nanoparticles for Drug Delivery Application: Development of Versatile Nanocarrier Platforms in Biotechnology and Nanomedicine. *Journal of Nanomaterials*, 2019, pp. 1-26.
- Lu, R. M. *et al.* (2020). Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci*, 27(1), pp. 1.
- Lu, Y. e Park, K. (2013). Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs. *Int J Pharm*, 453(1), pp. 198-214.
- Lúcio, M. *et al.* (2021). *Chapter 4. Organic nanocarriers for brain drug delivery*. Jenny Stanford Publishing Pte.
- Ma, Y. Y. *et al.* (2017). Molecular Imaging of Cancer with Nanoparticle-Based Theranostic Probes. *Contrast Media Mol Imaging*, 2017, pp. 1026270.

- Malkoch, M., Malmström, E. e Nyström, A. M. (2012). Dendrimers. *Polymer Science: A Comprehensive Reference*. pp. 113-176.
- Manivasagan, P. *et al.* (2017). Anti-EGFR Antibody Conjugation of Fucoidan-Coated Gold Nanorods as Novel Photothermal Ablation Agents for Cancer Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*, 9(17), pp. 14633-14646.
- Marabelle, A. e Gray, J. (2015). Tumor-targeted and immune-targeted monoclonal antibodies: Going from passive to active immunotherapy. *Pediatr Blood Cancer*, 62(8), pp. 1317-1325.
- Marques-Gallego, P. e de Kroon, A. I. (2014). Ligation strategies for targeting liposomal nanocarriers. *Biomed Res Int*, 2014, pp. 129458.
- Marrocco, I., Romaniello, D. e Yarden, Y. (2019). Cancer Immunotherapy: The Dawn of Antibody Cocktails. *Methods Mol Biol*, 1904, pp. 11-51.
- Martin, A., Tisch, R. M. e Getts, D. R. (2013). Manipulating T cell-mediated pathology: targets and functions of monoclonal antibody immunotherapy. *Clin Immunol*, 148(1), pp. 136-147.
- McMillan, J., Batrakova, E. e Gendelman, H. E. (2011). Cell delivery of therapeutic nanoparticles. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 104, pp. 563-601.
- Merisko-Liversidge, E. *et al.* (1996). Formulation and antitumor activity evaluation of nanocrystalline suspensions of poorly soluble anticancer drugs. *Pharm Res*, 13(2), pp. 272-278.
- Miao, Y. e Quinn, T. P. (2021). Advances in Receptor-Targeted Radiolabeled Peptides for Melanoma Imaging and Therapy. *J Nucl Med*, 62(3), pp. 313-318.
- Montane, X. *et al.* (2020). Encapsulation for Cancer Therapy. *Molecules*, 25(7), pp. 1605.
- Moradi-Kalbolandi, S. *et al.* (2018). Monoclonal antibody-based therapeutics, targeting the epidermal growth factor receptor family: from herceptin to Pan HER. *J Pharm Pharmacol*, 70(7), pp. 841-854.

- Morales-Cruz, M. *et al.* (2019). Smart Targeting To Improve Cancer Therapeutics. *Drug Des Devel Ther*, 13, pp. 3753-3772.
- Morales, J. O. *et al.* (2015). Lipid nanoparticles for the topical delivery of retinoids and derivatives. *Nanomedicine (Lond)*, 10(2), pp. 253-269.
- Morita, Y. *et al.* (2018). Aptamer Therapeutics in Cancer: Current and Future. *Cancers (Basel)*, 10(3), pp. 80.
- Nagy, E. *et al.* (2017). Anti-bacterial Monoclonal Antibodies. *Adv Exp Med Biol*, 1053, pp. 119-153.
- Nehoff, H. *et al.* (2014). Nanomedicine for drug targeting: strategies beyond the enhanced permeability and retention effect. *Int J Nanomedicine*, 9, pp. 2539-2555.
- Ning, L. *et al.* (2021). Development and application of therapeutic antibodies against COVID-19. *Int J Biol Sci*, 17(6), pp. 1486-1496.
- Noble, G. T. *et al.* (2014). Ligand-targeted liposome design: challenges and fundamental considerations. *Trends Biotechnol*, 32(1), pp. 32-45.
- Opoku-Damoah, Y. *et al.* (2016). Versatile Nanosystem-Based Cancer Theranostics: Design Inspiration and Predetermined Routing. *Theranostics*, 6(7), pp. 986-1003.
- Panowski, S. *et al.* (2014). Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy. *MAbs*, 6(1), pp. 34-45.
- Papakostas, D. *et al.* (2011). Nanoparticles in dermatology. *Arch Dermatol Res*, 303(8), pp. 533-550.
- Paradise, J. (2019). Regulating Nanomedicine at the Food and Drug Administration. *AMA J Ethics*, 21(4), pp. E347-355.
- Park, Y. *et al.* (2019). Photoluminescent and biodegradable porous silicon nanoparticles for biomedical imaging. *J Mater Chem B*, 7(41), pp. 6271-6292.
- Parra, M. *et al.* (2021). Mesoporous Silica Nanoparticles in Chemical Detection: From Small Species to Large Bio-Molecules. *Sensors (Basel)*, 22(1), pp. 261.

- Patra, J. K. *et al.* (2018). Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnology*, 16(1), pp. 71.
- Pavanello, F., Zucca, E. e Ghielmini, M. (2017). Rituximab: 13 open questions after 20years of clinical use. *Cancer Treat Rev*, 53, pp. 38-46.
- Pearce, A. K. e O'Reilly, R. K. (2019). Insights into Active Targeting of Nanoparticles in Drug Delivery: Advances in Clinical Studies and Design Considerations for Cancer Nanomedicine. *Bioconjug Chem*, 30(9), pp. 2300-2311.
- Pérez-Herrero, E. e Fernández-Medarde, A. (2015). Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm*, 93, pp. 52-79.
- Pirzada, M. e Altintas, Z. (2019). Nanomaterials for Healthcare Biosensing Applications. *Sensors (Basel)*, 19(23), pp. 5311.
- Ponziani, S. *et al.* (2020). Antibody-Drug Conjugates: The New Frontier of Chemotherapy. *Int J Mol Sci*, 21(15), pp. 5510.
- Ranade, A. A. *et al.* (2013). Clinical and economic implications of the use of nanoparticle paclitaxel (Nanoxel) in India. *Ann Oncol*, 24 Suppl 5, pp. v6-12.
- Riaz, M. K. *et al.* (2018). Surface Functionalization and Targeting Strategies of Liposomes in Solid Tumor Therapy: A Review. *Int J Mol Sci*, 19(1), pp. 195.
- Richards, D. A., Maruani, A. e Chudasama, V. (2017). Antibody fragments as nanoparticle targeting ligands: a step in the right direction. *Chem Sci*, 8(1), pp. 63-77.
- Robson, A. A. (2010). Nanotechnologies and food: 1st Report of Session 2009-10. *House of Lords - Science and Technology Committee*, 2, pp. 336 - 361.
- Rouleau, L. *et al.* (2013). VCAM-1-targeting gold nanoshell probe for photoacoustic imaging of atherosclerotic plaque in mice. *Contrast Media Mol Imaging*, 8(1), pp. 27-39.

- Sailor, M. J. (2012). *Porous Silicon in Practice: Preparation, Characterization and Applications*. Wiley.
- Sakai-Kato, K. *et al.* (2015). General considerations regarding the in vitro and in vivo properties of block copolymer micelle products and their evaluation. *J Control Release*, 210, pp. 76-83.
- Saltarella, I. *et al.* (2020). Mechanisms of Resistance to Anti-CD38 Daratumumab in Multiple Myeloma. *Cells*, 9(1), pp. 167.
- Samaridou, E., Heyes, J. e Lutwyche, P. (2020). Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: Current perspectives. *Adv Drug Deliv Rev*, 154-155, pp. 37-63.
- Santamaria, S. e de Groot, R. (2019). Monoclonal antibodies against metzincin targets. *Br J Pharmacol*, 176(1), pp. 52-66.
- Santos, H. A. *et al.* (2014). Porous silicon nanoparticles for nanomedicine: preparation and biomedical applications. *Nanomedicine (Lond)*, 9(4), pp. 535-554.
- Scheffel, U. *et al.* (1972). Albumin microspheres for study of the reticuloendothelial system. *J Nucl Med*, 13(7), pp. 498-503.
- Seaberg, J. *et al.* (2021). Hybrid Nanosystems for Biomedical Applications. *ACS Nano*, 15(2), pp. 2099-2142.
- Sensenig, R. *et al.* (2012). Magnetic nanoparticle-based approaches to locally target therapy and enhance tissue regeneration in vivo. *Nanomedicine (Lond)*, 7(9), pp. 1425-1442.
- Sguizzato, M., Esposito, E. e Cortesi, R. (2021). Lipid-Based Nanosystems as a Tool to Overcome Skin Barrier. *Int J Mol Sci*, 22(15), pp. 8319.
- Shahbazi, M. A., Herranz, B. e Santos, H. A. (2012). Nanostructured porous Si-based nanoparticles for targeted drug delivery. *Biomatter*, 2(4), pp. 296-312.
- Shepard, H. M. *et al.* (2017). Developments in therapy with monoclonal antibodies and related proteins. *Clin Med (Lond)*, 17(3), pp. 220-232.

- Shetab Boushehri, M. A., Dietrich, D. e Lamprecht, A. (2020). Nanotechnology as a Platform for the Development of Injectable Parenteral Formulations: A Comprehensive Review of the Know-Hows and State of the Art. *Pharmaceutics*, 12(6), pp. 510.
- Silva, A. C. *et al.* (2015). Delivery systems for biopharmaceuticals. Part II: Liposomes, Micelles, Microemulsions and Dendrimers. *Curr Pharm Biotechnol*, 16(11), pp. 955-965.
- Silva, J., Fernandes, A. R. e Baptista, P. V. (2014). Application of Nanotechnology in Drug Delivery. *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*. pp. 127-154.
- Smerkova, K. *et al.* (2020). Nanomaterials with active targeting as advanced antimicrobials. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 12(5), pp. e1636.
- Soares, S. *et al.* (2018a). Nanomedicine: Principles, Properties, and Regulatory Issues. *Front Chem*, 6, pp. 360.
- Soares, T. B. *et al.* (2018b). Lipid nanocarriers loaded with natural compounds: Potential new therapies for age related neurodegenerative diseases? *Prog Neurobiol*, 168, pp. 21-41.
- Society, A. (2022). Therapeutic monoclonal antibodies approved or in review in the EU or US [Em linha]. Disponível em <http://www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies> [Consultado em 25 agosto 2022].
- Steichen, S. D., Caldorera-Moore, M. e Peppas, N. A. (2013). A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *Eur J Pharm Sci*, 48(3), pp. 416-427.
- Subhan, M. A. *et al.* (2021). Recent Advances in Tumor Targeting via EPR Effect for Cancer Treatment. *J Pers Med*, 11(6), pp. 571.
- Sultana, S. *et al.* (2013). Nanoparticles-mediated drug delivery approaches for cancer targeting: a review. *J Drug Target*, 21(2), pp. 107-125.

- Tada, M., Suzuki, T. e Ishii-Watabe, A. (2018). Development and characterization of an anti-rituximab monoclonal antibody panel. *MAbs*, 10(3), pp. 370-379.
- Thomas, A., Teicher, B. A. e Hassan, R. (2016). Antibody–drug conjugates for cancer therapy. *The Lancet Oncology*, 17(6), pp. 254-262.
- Tiller, K. E. e Tessier, P. M. (2015). Advances in Antibody Design. *Annu Rev Biomed Eng*, 17, pp. 191-216.
- Tosat-Bitrian, C. e Palomo, V. (2020). CdSe quantum dots evaluation in primary cellular models or tissues derived from patients. *Nanomedicine*, 30, pp. 102299.
- Tsao, L. C., Force, J. e Hartman, Z. C. (2021). Mechanisms of Therapeutic Antitumor Monoclonal Antibodies. *Cancer Res*, 81(18), pp. 4641-4651.
- Turner, C. T. *et al.* (2015). Therapeutic Potential of Inorganic Nanoparticles for the Delivery of Monoclonal Antibodies. *Journal of Nanomaterials*, 2015, pp. 1-11.
- Varma, D. M. *et al.* (2021). Nano- and Microformulations to Advance Therapies for Visceral Leishmaniasis. *ACS Biomater Sci Eng*, 7(5), pp. 1725-1741.
- Vitorino, C., Lopes, C. M. e Lúcio, M. (2021). Chapter Nanomedicine and Drug Delivery Approaches. In: MILANE, L. S. & AMIJI, M. M. (eds.) *Organelle and Molecular Targeting*. CRC Press, Boca Raton.
- Voltan, R. *et al.* (2013). Nanoparticles engineered with rituximab and loaded with Nutlin-3 show promising therapeutic activity in B-leukemic xenografts. *Clin Cancer Res*, 19(14), pp. 3871-3880.
- Wang, D. *et al.* (2018). Clinical translation of immunoliposomes for cancer therapy: recent perspectives. *Expert Opin Drug Deliv*, 15(9), pp. 893-903.
- Wang, W., Wang, J. e Ding, Y. (2020). Gold nanoparticle-conjugated nanomedicine: design, construction, and structure-efficacy relationship studies. *J Mater Chem B*, 8(22), pp. 4813-4830.
- Weissig, V., Pettinger, T. K. e Murdock, N. (2014). Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. *Int J Nanomedicine*, 9, pp. 4357-4373.

- Xu, C. *et al.* (2019a). A sequentially responsive and structure-transformable nanoparticle with a comprehensively improved 'CAPIR cascade' for enhanced antitumor effect. *Nanoscale*, 11(3), pp. 1177-1194.
- Xu, Z. *et al.* (2019b). Novel HER2-Targeting Antibody-Drug Conjugates of Trastuzumab Beyond T-DM1 in Breast Cancer: Trastuzumab Deruxtecan(DS-8201a) and (Vic-)Trastuzumab Duocarmazine (SYD985). *Eur J Med Chem*, 183, pp. 111682.
- Yan, W., Leung, S. S. e To, K. K. (2020). Updates on the use of liposomes for active tumor targeting in cancer therapy. *Nanomedicine (Lond)*, 15(3), pp. 303-318.
- Yan, Y. *et al.* (2019). Recent Advances on Graphene Quantum Dots: From Chemistry and Physics to Applications. *Adv Mater*, 31(21), pp. e1808283.
- Yang, M. *et al.* (2011). Attenuation of nontargeted cell-kill using a high-density lipoprotein-mimicking peptide--phospholipid nanoscaffold. *Nanomedicine (Lond)*, 6(4), pp. 631-641.
- Zhang, X. e Huang, G. (2017). Synthetic lipoprotein as nano-material vehicle in the targeted drug delivery. *Drug Deliv*, 24(sup1), pp. 16-21.
- Zhang, Y., Cao, J. e Yuan, Z. (2020). Strategies and challenges to improve the performance of tumor-associated active targeting. *J Mater Chem B*, 8(18), pp. 3959-3971.
- Zhao, W., Zhuang, S. e Qi, X. R. (2011). Comparative study of the in vitro and in vivo characteristics of cationic and neutral liposomes. *Int J Nanomedicine*, 6, pp. 3087-3098.
- Zhou, F. *et al.* (2018a). Recent Progress of Nano-drug Delivery System for Liver Cancer Treatment. *Anticancer Agents Med Chem*, 17(14), pp. 1884-1897.
- Zhou, Y. *et al.* (2018b). Mesoporous silica nanoparticles for drug and gene delivery. *Acta Pharm Sin B*, 8(2), pp. 165-177.
- Zhu, Y., Liu, C. e Pang, Z. (2019). Dendrimer-Based Drug Delivery Systems for Brain Targeting. *Biomolecules*, 9(12), pp. 790.

Zielinska, A. *et al.* (2020). Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules*, 25(16), pp. 3731.