

Miguel Branco Dias Pereira

# Aplicações da nanotecnologia no tratamento de tumores cerebrais

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,  
orientada pela Professora Doutora Maria Eugénia Tavares Pina e apresentada à  
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



Eu, Miguel Branco Dias Pereira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009009954, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 9 de Julho de 2014

---

O aluno:

Miguel Branco Dias Pereira

(Miguel Branco Dias Pereira)

A tutora:

Maria Eugénia Tavares Pina

(Maria Eugénia Tavares Pina)

## Índice

Abreviaturas.....	4
Resumo.....	5
Abstract.....	6
I - Introdução.....	7
II - Tumores cerebrais.....	8
III - Limitações da terapêutica atual.....	9
IV - Principais características das nanopartículas.....	10
V - Nanopartículas utilizadas na terapêutica para tumores cerebrais.....	13
V.1 - Lipossomas.....	13
V.2 - Micelas.....	14
V.3 - Nanopartículas poliméricas.....	14
V.4 - Dendrímeros.....	15
V.5 - Nanopartículas inorgânicas.....	16
VI - Nanopartículas teranósticas.....	17
VII - Possíveis riscos para o Homem.....	18
VIII - Perspetivas futuras e desafios.....	18
IX - Conclusão.....	20
Bibliografia.....	21

## Abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

BHE – Barreira Hematoencefálica

EPR – Efeito de Permeabilidade e Retenção

IRM – Imagem por Ressonância Magnética

PAMAM – poliamidoamina

PEG – Polietilenoglicol

PLA – Ácido poliláctico

PMLA – ácido poli( $\beta$ ,L-málico)

PMMA – Poli(metil-metacrilato)

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

siRNA – small interfering RNA

WHO – World Health Organization

## Resumo

Os tumores cerebrais são um grupo bastante heterogéneo, muitas vezes com prognóstico desfavorável para os doentes. Apesar de existir um grande esforço em melhorar a terapêutica existente que passa por cirurgia, radioterapia e quimioterapia, ainda não se conseguiu desenvolver uma cura. Com vista a mudar esta situação, tem sido feita uma forte aposta na nanotecnologia, abrindo novas portas para o diagnóstico e tratamento de tumores cerebrais. Neste trabalho serão abordadas as principais características e inovação das nanopartículas que lhes permitem apresentar uma vantagem face à terapêutica convencional. Existem vários tipos de nanopartículas com provas dadas, cada uma com as suas especificidades, que serão abordadas em exemplos concretos já estudados e onde se conseguiram resultados promissores. Por fim, é dada uma perspetiva futura em relação ao caminho que ainda é preciso percorrer de modo a chegarmos a um ponto em que as nanopartículas serão utilizadas de maneira generalizada no tratamento eficaz e seguro de tumores cerebrais.

## **Abstract**

Brain tumors are a very heterogeneous group, often with unfavorable prognosis for patients. Although a great effort is being made in order to improve existing therapeutics, consisting in surgery, radiation and chemotherapy, we have yet to find a cure. Hoping to change this situation, we turned to nanotechnology, searching for new ways to improve the diagnosis and treatment of brain tumors. In this work we will discuss the key features and innovation of these nanoparticles that allow them to have an advantage when compared to conventional therapy. There are several types of nanoparticles, each with its particular characteristics that will be addressed in several examples already studied, with promising results. Finally, we look into the future and analyse what is yet to be done in order to reach a point where nanoparticles usage is widespread, achieving an effective and safe treatment of brain tumors.

## I - Introdução

Apesar dos enormes avanços que têm ocorrido na área da saúde, o cancro continua a ser uma calamidade que mata, por ano, perto de dez milhões de pessoas mundialmente.<sup>1</sup>

Desde finais da década de 70, quando a remoção cirúrgica de tumores cerebrais permitia uma sobrevivência média de 3 meses, que muitos esforços foram feitos para aumentar a eficácia dos tratamentos dado que nem sempre se consegue remover o tumor na sua totalidade. De facto, a quantidade removida depende do tipo de tumor e da sua localização no cérebro.<sup>2</sup>

Muitas novas tecnologias têm sido desenvolvidas e houve um rápido incremento da nanotecnologia em aplicações biomédicas, sendo espectável que surjam novos métodos que ajudem no diagnóstico e tratamento do cancro do cérebro.<sup>3</sup>

De uma maneira geral, a nanotecnologia engloba o desenho, síntese e aplicação de materiais que tenham, pelo menos, uma dimensão com tamanho compreendido entre 1 e 100 nm.<sup>4</sup>

As nanopartículas têm características muito particulares que podem ser exploradas para tentar ultrapassar as dificuldades inerentes à terapêutica anti-tumoral tradicional. De modo geral, procura-se aumentar a especificidade da terapêutica para os tumores e reduzir os seus efeitos secundários, melhorar a eficácia do tratamento e aumentar a esperança de vida dos pacientes. Para o conseguirem, estas nanopartículas são desenhadas de modo a serem capazes de ultrapassar a barreira hematoencefálica, serem absorvidas pelas células tumorais e libertarem o seu conteúdo durante um longo período de tempo de modo a obter-se o efeito terapêutico desejado.<sup>5</sup>

Posto isto, é sem surpresa que se constata a existência de uma forte aposta neste campo, com resultados bastante promissores na deteção, diagnóstico e tratamento de tumores cerebrais.

Com este trabalho pretende-se analisar os vários casos de sucesso já relatados, procurando perceber em que aspetos e de que maneira superam as terapêuticas convencionais. Apenas compreendendo o seu funcionamento conseguiremos explorar as suas mais-valias, ao mesmo tempo que contornamos as suas limitações. Com este conhecimento poderemos vir a criar nanopartículas capazes de tratar eficazmente os tumores cerebrais, substituindo as terapêuticas atuais.



## II - Tumores cerebrais

Apenas no que diz respeito ao cérebro e sistema nervoso central, estão identificados mais de 120 tipos diferentes de tumores, cada um com características particulares e que requerem estratégias de tratamento diferentes. O nome de cada um depende do tipo de células ou parte do cérebro onde se desenvolvem. Por exemplo, o principal tipo de tumor primário surge nas células da glia e como tal, é chamado de glioma. Os tumores formam-se quando células normais do cérebro crescem descontroladamente e formam uma massa.

É importante reter que nem todos os tumores são cancerosos, denominando-se benignos. Estes são geralmente de crescimento mais lento e sem capacidade para criar metástases. Raramente invadem tecidos adjacentes e têm limites bem definidos. Porém, estes tumores podem pressionar áreas sensíveis do cérebro e causar sérios problemas de saúde, podendo por em risco a vida do paciente. Normalmente, podem ser removidos cirurgicamente dado que raramente voltam a desenvolver-se.<sup>6</sup>

Quando o tumor tem células cancerosas, denomina-se maligno. Estes caracterizam-se por um crescimento mais rápido, capacidade para invadir e destruir tecido adjacente, além de criar metástases.

Os tumores malignos subdividem-se em primários e secundários. Denominam-se tumores primários quando se começam a desenvolver no cérebro, em contraste com os tumores secundários que surgem noutra parte do corpo e só depois se formam metástases no cérebro. Os tumores secundários são aqueles que ocorrem com maior frequência, com os tumores cerebrais primários a contabilizar aproximadamente 2% de todos os casos de cancro.

A WHO agrupou os tumores em quatro graus distintos. Este grau é atribuído tendo em conta a aparência das células ao microscópio:

- Grau I: O tecido é benigno. As células são muito semelhantes a células cerebrais normais e crescem lentamente;
- Grau II: O tecido é maligno. As células parecem-se menos com as células normais do que as de um tumor de grau I;
- Grau III: O tecido maligno apresenta células com aspeto muito diferente ao das células normais. As células anormais crescem rapidamente;
- Grau IV: O tecido maligno apresenta células com aspeto muito fora do normal e com tendência para crescer rapidamente.

Com o tempo, um tumor de baixo grau pode tornar-se um tumor de grau elevado. Isto acontece com mais frequência nos adultos do que nas crianças. Como será de esperar, quanto maior for o grau do tumor pior será o prognóstico para o doente e mais urgente será começar a terapêutica.<sup>7</sup>

### **III - Limitações da terapêutica atual**

O cérebro, considerado o sistema mais complexo do corpo humano, controla uma grande variedade de funções tais como processamento de informação, controlo motor, memória, entre outras. Dada a complexidade destas funções, o tratamento dos tumores requer que se elimine, de maneira altamente seletiva, todos os tecidos cancerosos incluindo aqueles que invadem o tecido normal envolvente.

Face a esta exigência, é fácil compreender o porquê do tratamento de tumores cerebrais continuar a ser um grande desafio nos dias de hoje. Os principais obstáculos para um tratamento de sucesso incluem: a complexidade estrutural do cérebro; a heterogeneidade de muitos tumores cerebrais e a sua natureza invasiva; dificuldade em identificar os limites dos tumores; acumulação insuficiente do agente terapêutico no local do tumor; resistência à quimioterapia.<sup>8</sup>

Atualmente, o tratamento convencional de tumores malignos passa pela sua remoção cirúrgica, seguindo-se de sessões de radioterapia e quimioterapia. Já foi demonstrado que esta estratégia contribui para um aumento significativo da sobrevivência dos doentes.<sup>9</sup>

Até o melhor dos cirurgiões terá grande dificuldade em identificar com precisão todos os tecidos cancerosos e removê-los, sem danificar o tecido normal envolvente. Mesmo pós remoção cirúrgica, os tumores poderão reaparecer em local próximo de onde foram removidos.

A utilização de quimioterapia também tem resultados modestos. A utilização destes fármacos tem alguns problemas pois estes não atuam especificamente nas células tumorais, o que resulta em efeitos nefastos para as células saudáveis, razão pela qual a sua utilização deve ser muito bem monitorizada.

Outro problema importante e que deve ser tido em conta quando se utiliza este tipo de fármacos é a já referida resistência à quimioterapia. Em muitos casos, os mecanismos de resistência envolvem alterações a nível genético por parte das células neoplásicas, podendo resultar em resistência a um determinado fármaco ou a múltiplos fármacos. Os mecanismos de resistência incluem aumento da reparação do ácido desoxirribonucleico (ADN),

formação de substâncias que podem inativar o fármaco, alterações na estrutura da enzima-alvo, decréscimo na ativação de pró-fármacos ou decréscimo na acumulação do fármaco nas células-alvo.<sup>10</sup>

A eficácia destes fármacos também é afetada pela existência de diversas barreiras fisiológicas. Ao contrário do que acontece noutros órgãos, o cérebro é protegido pela barreira hematoencefálica (BHE). A BHE impede que cheguem ao cérebro moléculas prejudiciais, tanto endógenas como exógenas, que circulem na corrente sanguínea. Apesar desta sua função indispensável, ela também limita em muito a terapêutica que pode ser usada no tratamento de tumores cerebrais. Estruturalmente, a BHE é composta principalmente por quatro elementos celulares: células endoteliais, astrócitos, microglíocitos e pericitos. Estas células estão em comunicação direta ou indireta umas com as outras, o que faz com que o transporte através da BHE seja um processo controlado fisicamente pelas junções apertadas entre elas e, fisiologicamente, pelos transportadores existentes na membrana celular e pelas enzimas.

Apenas pequenas moléculas lipofílicas, eletricamente neutras e com massa molecular inferior a 400 Da que circulem no sangue poderão atravessar a BHE passivamente, chegando ao cérebro. Porém, muitos fármacos antineoplásicos são moléculas lipofílicas grandes pelo que não atravessam a BHE livremente, o que limita em muito os fármacos que se podem utilizar.<sup>11</sup>

Adicionalmente, é preciso ainda ter em conta a existência da barreira hematotumoral. Ao contrário do que acontece nos capilares cerebrais normais, as junções apertadas das células endoteliais no tumor estão seriamente comprometidas. A elevada pressão intersticial intratumoral, decorrente da maior permeabilidade dos vasos tumorais e da baixa drenagem linfática, limita a entrada de fármacos vindos da corrente sanguínea para o tumor. Além disso, variações estruturais nos capilares que irrigam o tumor também podem provocar alterações na entrada do fármaco no tumor. Isto pode levar a que haja uma distribuição heterogênea de fármacos, o que pode comprometer seriamente a terapêutica.<sup>12</sup>

#### **IV - Principais características das nanopartículas**

Apesar dos grandes desafios existentes, já há casos de sucesso no que toca à utilização de nanopartículas. Elas reúnem características que tornam possível a deteção de tumores num processo sensível e específico assim como permitem o transporte de agentes

de diagnóstico ou terapêuticos através da BHE, até aos tumores. Seguem-se as suas principais características.

#### Têm composição e propriedades físicas versáteis:

As nanopartículas podem ser fabricadas a partir de uma variedade de materiais tais como polímeros, lípidos, proteínas, metais ou semicondutores, assumindo as mais variadas formas estruturais. Aquelas que têm como alvo os tumores cerebrais podem ser divididas em três grandes categorias: as orgânicas (lipossomas, nanopartículas poliméricas, micelas, dendrímeros e nanopartículas lipídicas sólidas); as inorgânicas (nanopartículas de óxido de ferro ou de ouro, nanocristais semicondutores, nanopartículas de cerâmica e nanotubos de carbono) e ainda as nanopartículas híbridas, que são sintetizadas a partir de dois ou mais tipos de nanomateriais, tendo geralmente um centro metálico ou polimérico, coberto com uma ou várias camadas de lípidos, de modo a aumentar a biocompatibilidade do sistema.<sup>13</sup>

De maneira geral, as nanopartículas têm um rácio grande entre área de superfície e volume, o que se traduz numa elevada capacidade de carga. Como sistemas de libertação de fármacos, as nanopartículas demonstraram melhorar a solubilidade, prolongar o tempo de meia-vida e conseguir uma libertação controlada do fármaco.

Quer moléculas hidrofóbicas ou hidrofílicas podem ser incorporadas em nanopartículas para melhorar o seu tempo de meia-vida. Muitas nanopartículas são concebidas para libertarem os fármacos em resposta a vários estímulos tais como pH e temperatura, conseguindo assim uma libertação controlada. Além disso, as nanopartículas podem ser facilmente modificadas de modo a combinar vários agentes terapêuticos com sondas de imagem ou agentes de contraste.

As próprias nanopartículas podem ter propriedades óticas, térmicas, elétricas ou magnéticas intrínsecas, sendo utilizadas para fins de deteção, diagnóstico e terapêutica.<sup>14</sup>

#### Pode ser feito um direcionamento passivo para os tumores cerebrais:

O tamanho das nanopartículas é a característica mais importante no que toca a este aspeto. Na presença de processos inflamatórios ou durante o processo tumoral de crescimento e invasão de tecidos adjacentes, verifica-se um desequilíbrio na drenagem linfática local. Este fenómeno provoca alterações significativas no microambiente da região afetada o que, aliado à estrutura dos vasos recém-criados, permite às nanopartículas com

tamanho entre 10 e 100 nm aproveitem este facto para entrar passivamente no espaço intratumoral sem que sejam capazes de entrar no tecido cerebral saudável. Este fenómeno, em que as nanopartículas se acumulam seletivamente no local do tumor deve-se ao denominado efeito de permeabilidade e retenção (EPR). Apesar das suas potenciais aplicações, este mecanismo também tem limitações. Quando administrados por via endovenosa, as nanopartículas estão suscetíveis à opsonização e eliminação por células do retículo endoplasmático. Por este motivo, apenas uma pequena fração das nanopartículas administradas chegarão ao tumor. O fígado, baço, pulmões, rins e medula espinal são os locais onde mais frequentemente isto acontece.<sup>15</sup> Por isso é que é indispensável as nanopartículas terem menos que 100 nm e as suas superfícies serem biocompatíveis, isto é, serem hidrofílicas e sem carga elétrica para evitar a remoção pelas células do retículo endoplasmático.

Superfície passível de ser alterada para conseguir um direcionamento ativo para o tumor:

A superfície das nanopartículas regula a interação entre os nanomateriais e o meio envolvente pelo que é um fator importante na determinação do seu comportamento e aplicações biomédicas, quer “in vitro” ou “in vivo”. Alterando as suas propriedades físico-químicas (carga elétrica na superfície ou hidrofobicidade, por exemplo), pode-se influenciar o seu tempo de meia-vida e por onde se vão distribuir após serem colocadas em circulação. Um exemplo interessante é a criação de nanopartículas “camufladas” que usam polímeros hidrofílicos como o polietilenoglicol (PEG) para revestir a sua superfície, tornando-as mais resistentes à adsorção por proteínas ou absorção pelo retículo endoplasmático. Isto prolonga o tempo de meia-vida das nanopartículas em circulação, aumentando as hipóteses de chegar às mais distantes células do tumor cerebral.<sup>16</sup>

Uma estratégia para aumentar a entrada no tumor é fazer com que as nanopartículas tenham como alvo receptores que estão normalmente presentes nas células endoteliais dos capilares cerebrais ou nas células endoteliais dentro do tumor, locais que estão em contacto direto com as nanopartículas em circulação na corrente sanguínea.<sup>17</sup>

Assim que as nanopartículas tenham ultrapassado a BHE, elas devem ter especificidade para as células tumorais. Um dos métodos para este fenómeno acontecer é incorporar proteínas que se liguem a receptores que são expressos em maior número nestas células, comparativamente ao que acontece em células normais.<sup>18</sup>

À medida que mais receptores específicos destas células são identificados, as nanopartículas poderão integrar várias proteínas com alvos distintos, sendo eficazes mesmo em tumores heterogêneos.

## **V - Nanopartículas utilizadas na terapêutica para tumores cerebrais**

Como já foi exposto anteriormente, as nanopartículas apresentam características que as permitem ultrapassar muitas das barreiras que a terapêutica convencional enfrenta.

Um grande campo da sua utilização passa por utilizá-las como sistemas de transporte e libertação de fármacos. Neste sentido, as vantagens são diversas e incluem aumento do agente terapêutico em circulação, libertação do fármaco num alvo específico, libertação controlada do fármaco, grande capacidade de carga e co-libertação de mais que um agente terapêutico.

Seguem-se alguns dos exemplos existentes atualmente e com sucesso:

### **V.1 - Lipossomas**

São vesículas artificiais com uma ou mais camadas concêntricas de fosfolípidos e um centro aquoso. Esta combinação faz com que a estabilidade e direcionamento do fármaco não estejam dependentes do conteúdo do lipossoma. O centro pode ser cheio de fármacos, ADN, small interfering RNA (siRNA) e agentes de contraste.

Os lipossomas foram um dos primeiros transportadores de fármacos ensaiados, tendo em vista o melhoramento da farmacocinética de antineoplásicos. Muitos estudos foram feitos que apresentaram resultados promissores e formulações lipossômicas com antineoplásicos foram mesmo aprovadas para utilização no cancro.<sup>19</sup>

Apesar de nenhuma das terapêuticas já aprovadas ter como alvo tumores cerebrais, já há ensaios clínicos que exploram esta possibilidade. Foi desenvolvida uma formulação lipossômica com doxorrubicina encapsulada em lipossomas peguilados (cadeias de PEG são inseridas na membrana lipossômica) conjugados com glutatíão, que foi denominado 2B3-101. O objetivo desta formulação era garantir uma libertação segura de doxorrubicina em tumores cerebrais. Ensaios com ratos utilizando 2B3-101 e Caelyx® (doxorrubicina encapsulada em lipossomas peguilados) permitiram constatar que as doses de EB3-101 a chegar ao tumor foram quase cinco vezes maior do que as de Caelyx. Isto foi conseguido

sem afetar a integridade da BHE. Decorre atualmente um ensaio clínico de fase I/II iniciado em 2011 com o objetivo de determinar a segurança, tolerância e farmacocinética do EB3-101 em monoterapia e conjugado com trastuzumabe, um anticorpo monoclonal.<sup>20</sup>

Os investigadores depositam grandes esperanças em terapêuticas com ácidos nucleicos tais como genes anti-cancro, oligonucleotídeos antisense e siRNA. Uma razão para este otimismo é o facto de as nanopartículas poderem ser excelentes sistemas de libertação destas potentes mas biologicamente instáveis moléculas. Zangemeister-Wittke e col.<sup>21</sup>, desenvolveram um lipossoma que se liga especificamente às moléculas de adesão das células endoteliais. Quando estas se ligam, o lipossoma entra rapidamente na célula tumoral onde, dentro desta, liberta um oligonucleotídeo antisense que bloqueia a expressão dos genes bcl-2. Para além disso, tornam estas células mais sensíveis à doxorubicina.<sup>21</sup>

## **V.2 - Micelas**

São nanoesferas formadas por um agregado de moléculas anfipáticas, ou seja, compostos que possuem características polares e apolares, simultaneamente. Formadas principalmente devido a interações hidrofóbicas, o arranjo estrutural das moléculas anfipáticas origina um centro hidrofóbico separado do ambiente aquoso pela parte hidrofílica da molécula. São mais pequenas que os lipossomas e possuem elevada solubilidade, tendo a capacidade de libertar fármacos hidrofóbicos em tumores cerebrais malignos.<sup>22</sup>

Oligonucleotídeos de cadeia única podem reconhecer alvos moleculares fazendo uso de interações não-covalentes como interação hidrofóbica ou pontes hidrogénio. Este tipo de oligonucleotídeo, denominado de aptamer, apresenta características vantajosas tais como o seu tamanho reduzido, fraca imunogenicidade e fácil síntese e modificação. Uma abordagem interessante foi feita ao sintetizar-se uma nanoestrutura que conjuga aptamers e micelas para se conseguir uma ligação específica e forte de aptamers que tinham mostrado anteriormente baixa afinidade para o alvo. Esta estratégia mostrou grande potencial para reconhecer células cancerígenas e libertar fármacos in vivo.<sup>23</sup>

## **V.3 - Nanopartículas poliméricas**

O termo “nanopartícula” engloba dois tipos de estruturas diferentes, nomeadamente nanocápsulas e nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a sua composição e organização estrutural. As nanocápsulas constituem sistemas reservatórios onde é possível

identificar-se um núcleo diferenciado (hidrofílico ou hidrofóbico) rodeado por material sólido (invólucro polimérico). Neste caso a substância ativa pode encontrar-se dissolvida no núcleo e/ou incluída ou adsorvida na parede polimérica. As nanoesferas são sistemas formados por matrizes poliméricas que, contrariamente às nanocápsulas não apresentam um núcleo diferenciado. As substâncias ativas neste tipo de nanopartículas encontram-se frequentemente distribuídas/encapsuladas de forma homogênea no interior da matriz, sendo libertadas por difusão, podendo ainda encontrar-se adsorvidas à superfície da nanoesfera. A seleção dum polímero é feita tendo em conta a biocompatibilidade, a sua velocidade de degradação e a facilidade de obtenção/produção. Os polímeros podem ser naturais, tais como a albumina, celulose, colagénio e quitosano, ou sintéticos, como são exemplos o ácido polilático (PLA) e o poli(metil-metacrilato) (PMMA).<sup>24</sup>

Estas nanopartículas demonstraram ser úteis no tratamento de tumores cerebrais agressivos e disseminados. Nanopartículas cobertas com polissorbato 80, transportando gencitabina, inibiram a proliferação de células de glioma e aumentaram a sobrevivência de ratos.<sup>25</sup> Outra nanopartícula incorporando ácido poli( $\beta$ ,L-málico) (PMLA) e um oligonucleotídeo antisense conseguiu, através da libertação de oligonucleotídeo, regulada pelo pH, uma inibição do crescimento do tumor intracraniano.<sup>26</sup>

#### **V.4 - Dendrímeros**

São macromoléculas sintéticas, complexas e muito organizadas, com estrutura tridimensional regular e altamente ramificada. São tipicamente simétricas ao redor de um núcleo e muitas vezes apresentam estrutura esférica, semelhante à copa de uma árvore. São moléculas construídas através de crescimento radial, às camadas, de forma repetitiva, através de dois métodos distintos: no método divergente os dendrímeros são construídos a partir do núcleo para a periferia, enquanto, no método convergente, ele é construído da periferia para o núcleo. A estrutura dendrítica resultante contém um grande número de grupos funcionais na superfície.<sup>27</sup>

Vários estudos demonstraram que os dendrímeros podem atravessar a BHE e aumentar a concentração de fármaco no local do tumor. A libertação controlada de fármacos a partir dos dendrímeros pode ser conseguida ao adicionarem-se grupos que respondem a estímulos ambientais específicos. He e col., desenvolveram um dendrímero conjugado com transferrina e tamoxifeno, sensível ao pH, para tratar gliomas. Ligaram doxorubicina a poliamidoamina (PAMAM) situada no interior dos dendrímeros através de



uma ligação hidrazona. Apenas 6% do fármaco foi libertado a pH 7.4, enquanto que, a pH 4.5, este valor subiu para 32%.<sup>28</sup>

## **V.5 - Nanopartículas inorgânicas**

São física e quimicamente mais estáveis quando comparadas com as nanopartículas orgânicas, o que permite o seu armazenamento por longos períodos de tempo. A maioria está protegida por polímeros hidrofílicos, tornando-as mais solúveis na água.

Estudos com nanopartículas magnéticas demonstraram que, ao aplicar-se um campo magnético no local do tumor, se consegue aumentar a sua concentração no alvo após administração sistémica. Chertok e col.<sup>29</sup>, utilizaram esta estratégia com nanopartículas de óxido de ferro, conseguindo aumentar em cinco vezes a sua concentração em gliomas, após aplicação de campo magnético externo.<sup>29</sup>

Uma propriedade interessante das nanopartículas de óxido de ferro é a sua capacidade para gerar calor quando submetidas a um campo magnético alternado. Este fenómeno térmico pode ser devido à perda de energia durante o processo de desmagnetização. Esta propriedade permite a utilização de nanopartículas magnéticas na hipertermia, nas quais é necessária a aplicação de calor numa determinada zona do organismo. Estudos mostraram que a hipertermia gerada pelas nanopartículas pode causar a morte das células cancerosas e aumentar a sobrevivência dos doentes.<sup>30</sup>

Nanopartículas fotossensíveis também podem ser utilizadas com este fim mas em vez de serem excitadas com um campo magnético, é aplicada radiação, num processo denominado de terapia fototérmica. Foi demonstrado que nanopartículas de ouro absorvem radiação próxima do infravermelho, aumentando a sua temperatura mas esta estratégia é limitada pelo facto da radiação não penetrar no crânio.<sup>31</sup>

Outra estratégia envolve a utilização de materiais semicondutores como o dióxido de titânio e pontos quânticos<sup>32</sup> que, devido às suas propriedades fotossensíveis, podem ser utilizados em terapia fotodinâmica nos tumores cerebrais. Sob exposição luminosa, estas partículas absorvem energia e transferem-na para oxigénio molecular, gerando uma variedade de espécies reativas de oxigénio (ROS) citotóxicas, que vão reagir com componentes celulares como o ADN, proteínas e lípidos.<sup>33</sup>

## VI - Nanopartículas teranósticas

Em vez de administrarmos uma nanopartícula com fármaco e outra com um agente de contraste, o passo seguinte lógico para os investigadores foi criar uma nanopartícula que combinasse estes dois num só. O objetivo é manter a capacidade de libertar o agente terapêutico no tumor, através de direcionamento passivo e/ou ativo, ao mesmo tempo que acompanhamos em tempo real a sua biodistribuição no organismo, assim como nos dá uma imagem detalhada do tumor.<sup>34</sup>

Uma peça fundamental na visualização do tumor é a imagem por ressonância magnética (IRM). Este é o método mais utilizado para o efeito pois dá uma imagem espacial do tumor com elevada definição.

Um exemplo de sistema teranóstico foi demonstrado por Reddy e col.<sup>35</sup>, através de uma nanopartícula polimérica contendo Photofrin® (composto utilizado em terapia fotodinâmica) e óxido de ferro conjugado com peptídeo F3 num modelo de tumor num rato. Photofrin® foi capaz de gerar dioxigénio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) e induzir citotoxicidade após exposição à radiação. Conseguiu avaliar-se a farmacocinética das nanopartículas através da IRM devido às propriedades magnéticas do óxido de ferro. As nanopartículas com o peptídeo F3 mostraram maior tempo de retenção no local do tumor, aumentando em duas vezes o contraste da imagem obtida.<sup>35</sup>

Combinar a imagiologia e a terapia pode ser conseguido ao marcar as nanopartículas terapêuticas com sondas fluorescentes orgânicas, permitindo acompanhar a distribuição das nanopartículas. Foram feitos estudos para explorar as aplicações teranósticas destas nanossondas nos tumores cerebrais. Jung e col.<sup>36</sup>, criaram um ponto quântico multifuncional capaz de libertar siRNA nas células cancerosas. O siRNA encontra-se ligado de duas maneiras distintas à nanopartícula: através de uma ligação dissulfeto que é quebrada enzimaticamente para libertar o fármaco e através de uma ligação que não se quebra, permitindo acompanhar a sua distribuição. Experiências “in vitro” demonstraram que as nanopartículas teranósticas apresentaram especificidade para o oncogene EGFRvIII e o inibiram com sucesso. A entrada e a localização das nanopartículas nas células foram determinadas através de microscopia de fluorescência.<sup>36</sup>

Apesar dos resultados promissores, como estes estudos ainda estão em fase pré-clínica, é necessário mais investigação para definir os perfis de eficácia e segurança.

## **VII - Possíveis riscos para o Homem**

Apesar dos benefícios da nanotecnologia serem vastamente conhecidos, a discussão acerca dos potenciais efeitos nefastos (neurotoxicidade e toxicidade sistêmica, entre outros) ainda está numa fase inicial, o que levanta problemas acerca da sua utilização em doentes.

Os ensaios clínicos feitos com nanopartículas para tumores cerebrais são feitos em doentes com tumores recorrentes de elevado grau ou com metástases no cérebro, ambas com prognóstico muito desfavorável. Expandir a utilização de nanopartículas para formas menos agressivas de tumores cerebrais é por isso um desafio.

É extremamente importante determinar a toxicidade, efeitos a longo prazo e como o sistema imune reage às nanopartículas e materiais utilizados pois só assim saberemos quais nanotecnologias poderemos usar “in vivo”. Têm sido observadas reações inflamatórias relacionadas com o “stress” oxidativo após administração de variadas nanopartículas. Dado o seu tamanho muito reduzido, poderão ter efeitos não detetados com partículas convencionais. Por exemplo, poderão não ser detetadas pelas células fagocitárias, permitindo que cheguem ao sangue ou sistema nervoso. Estas partículas poderão funcionar como haptenos, modificando estruturas proteicas, alterando a sua função ou tornando-as antigénicas, aumentando a probabilidade de ocorrerem respostas autoimunes. Posto isto, parece claro que em paralelo com os avanços da nanotecnologia, também teremos de desenvolver novos testes para determinar corretamente a bioatividade e toxicidade das nanopartículas, assim como a sua propensão para causar uma resposta autoimune.<sup>37</sup>

## **VIII - Perspetivas futuras e desafios**

O grande objetivo da utilização de nanopartículas em tumores cerebrais é aumentar a sobrevivência dos pacientes e melhorar a sua qualidade de vida. Existe uma variedade de nanomaterias com propriedades únicas com grande utilidade para o tratamento de tumores cerebrais e o aparecimento de nanopartículas teranósticas são um passo em frente para a criação de uma terapêutica inovadora.

Apesar dos grandes esforços até agora, ainda poucos sistemas utilizando nanopartículas se encontram em ensaios clínicos, o que mostra que muito tem de ser feito até estas se tornarem uma terapêutica convencional.

Um dos maiores desafios é o desenvolvimento dum sistema de nanopartículas eficaz que consiga atravessar a BHE e seja direcionada especificamente para as células cancerosas

no cérebro. Porém, a heterogeneidade dos tumores cerebrais malignos e as barreiras fisiológicas que protegem o sistema nervoso central fazem desta uma tarefa complicada. Direcionar as nanopartículas para proteínas e recetores sobre-expressos nas células cancerosas continua a ser problemático pois as células normais também poderão expressar estes alvos até certo ponto.

Outro desafio é a libertação controlada dos fármacos transportados pelas nanopartículas. Só após a nanopartícula chegar ao local do tumor é que deve libertar o agente terapêutico. Nanopartículas que usam sistemas de libertação não-covalentes conseguem preservar os fármacos ativos mas frequentemente perdem fármaco através de difusão inespecífica durante o transporte. Ligações que podem ser quebradas por enzimas ou sensíveis a estímulos externos devem ser tidos em conta para melhorar a eficácia geral das nanopartículas como sistemas de libertação de fármacos. Campos magnéticos, raios-x, luz e calor são excelentes candidatos, capazes de controlar a libertação do fármaco temporal e espacialmente.

Por outro lado, problemas tais como a estabilidade a longo prazo das nanopartículas, controlo de qualidade nos processos de síntese e a capacidade para sintetizar estes materiais em larga escala são problemas práticos que dificultam a sua utilização clínica. A concepção e “design” das nanopartículas do futuro deverão ter estes aspetos em consideração.

Outra área importante a explorar é a utilização de nanopartículas com várias funcionalidades no campo da imagiologia. A criação destas exigirá que nos foquemos em materiais que apresentem propriedades óticas e magnéticas únicas. Novos estudos nesta área permitirão aumentar a sensibilidade para detetar tumores recorrentes e acompanhar as respostas dos pacientes ao tratamento. O desenvolvimento das nanopartículas teranósticas, onde se combina o diagnóstico e terapêutica num só, será extremamente importante pois permite avaliar o estado do tumor ao mesmo tempo que se executa o tratamento. Nanopartículas de óxido de ferro e de ouro, fruto das suas propriedades óticas e magnéticas já mostraram o seu valor e o seu potencial como plataformas teranósticas deverá continuar a ser explorado.

A implementação das nanopartículas no tratamento de pacientes com tumores cerebrais ainda está no início. Desenvolver estes sistemas complexos engloba diversas áreas como a medicina, nanotecnologia, farmacocinética e biologia. Há medida que o nosso conhecimento nestas áreas se for expandindo nos próximos anos, mais fácil será a criação de nanomateriais inovadores e eficazes na cura de pacientes com tumores cerebrais.

## **IX - Conclusão**

Mesmo após vários anos e com milhões e milhões de euros investidos globalmente, ainda não descobrimos uma cura para o cancro. Com 120 tipos de tumores cerebrais identificados até agora, cada um com diferenças mais ou menos significativas entre si, é fácil compreender porque não existe uma solução que seja eficaz em todos ou, pelo menos, em grande parte deles.

No caso dos tumores cerebrais, o desafio é ainda maior, comparativamente com outros tipos de cancro, pois a BHE limita seriamente a capacidade dos agentes terapêuticos chegarem ao seu alvo.

Neste sentido, as nanopartículas já mostraram ter grande potencial para superar as limitações da terapêutica convencional. Tendo em conta que muitas tecnologias utilizadas na sua conceção são inovadoras, é de esperar que esta área sofra um grande desenvolvimento nos próximos anos.

Apesar de ainda não existir nenhuma terapêutica com nanopartículas, clinicamente aprovada, para o tratamento de tumores cerebrais, os resultados obtidos em estudos clínicos e pré-clínicos são muito encorajadores. Com o desenrolar dos estudos, é espectável que surja, eventualmente, uma terapêutica aprovada com este fim.

O derradeiro objetivo é a criação de uma nanopartícula capaz de curar todos ou grande parte dos tipos de cancro existentes. Seria imprudente garantir que tal será conseguido mas, com o desenvolvimento da nanotecnologia e outras ciências, as possibilidades são infinitas.

O esforço global para curar o cancro irá continuar e sem dúvida que a nanotecnologia será imprescindível para atingirmos este objetivo.

## Bibliografia

- 1 – FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., ERVIK, M., DIKSHIT, R., ESER, S., MATHERS, C., REBELO, M., PARKIN, D.M., FORMAN, D., BRAY, F., GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
- 2 – WALKER, M.D., ALEXANDER, J.R., HUNT, W.E., MACCARTY, C.S., MAHALEY JR, M.S., MEALEY JR, J., Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg* 1978;49(3):333-43.
- 3 – MEYERS, J.D., DOANE, T., BURDA, C., BASILION, J.P., Nanoparticles for imaging and treating brain cancer, *Nanomedicine (Lond)*. 2013 Jan;8(1):123-43. doi: 10.2217/nnm.12.185.
- 4 – FAROKHAZD, O.C., LANGER, R., Impact of nanotechnology on drug delivery, *ACS Nano*. 2009 Jan 27;3(1):16-20. doi: 10.1021/nn900002m.
- 5 – BURGO, L., HERNANDEZ, M., ORIVE, G., PEDRAZ, J.L., Nanotherapeutic approaches for brain cancer management, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* (2013): 61-77.
- 6 – BUCKNER, J.C., BROWN, P.D., ONEILL, B.P., MEYER, F.B., WETMORE, C.J., UHM, J.H., Central nervous system tumors. *Mayo Clin Proc* 2007; 82: 1271-6.
- 7 – LOUIS, D.N., OHGAKI, H., WIESTLER, O.D., CAVENEE, W.K., BURGER, P.C., JOUVET, A., The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* (2007) 114: 97-109.
- 8 – SNEED, P.K., GUTIN, P.H., LARSON, D.A., MALEC, M.K., PHILLIPS, T.L., PRADOS, C.O., SCHARFEN, K.A., WARA, W.M., Patterns of recurrence of glioblastoma multiforme after external irradiation followed by implant boost, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 29 (1994) 719-727.
- 9 – STUPP, R., MASON, W.P., WELLER, M., FISHER, B., TAPHOORN, M.J., BELANGER, K., BRANDES, A.A., BRANDES, C., MAROSI, C., BOGDAHN, J., Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma, *N. Engl. J. Med.* 352 (2005) 987–996.
- 10 – FINE, H.A., DEAR, K., LOEFFLER, J.S., MCBLACK, P.L., CANELLOS, G.P., Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer* (1993), 71: 2585-2597.
- 11 – OMIDI, Y., BARAR, J., Impacts of Blood-Brain Barrier in Drug Delivery and Targeting of Brain Tumors, *BiolImpacts*, 2012, 2(1), 5-22.

- 12 – GROOTHUIS, D.R., The blood–brain and blood–tumor barriers: a review of strategies for increasing drug delivery, *Neuro-Oncology* 2 (2000) 45-59.
- 13 – SAILOR, M. J., PARK, J.-H. (2012), Hybrid Nanoparticles for Detection and Treatment of Cancer. *Adv. Mater.*, 24: 3779–3802. doi: 10.1002/adma.201200653.
- 14 – DOANE, T. L., BURDA, C., The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 41, 2885-2911.
- 15 – IYER, A., KHALED, G., FANG, J., MAEDA, H., Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discovery* (2006). *Today* 11, 812–818. doi: 10.1016/j.drudis.2006.07.005.
- 16 – GREF, R., LUCK, M., QUELLEC, M., MARCHAND, E., DELLACHERIE, S., HARNISCH, T., BLUNK, MULLER, R.H., ‘Stealth’ corona-core nanoparticles surfacemodified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 18 (2000) 301-313.
- 17 – FISHMAN, J.B., RUBIN, J.V., HANDRAHAN, J.V., CONNOR, J.R., FINE, R.E., Receptor-mediated transcytosis of transferrin across the blood–brain barrier, *J. Neurosci. Res.* 18 (1987) 299-304.
- 18 – FLEMING, T.P., SAXENA, A., CLARK, W.C., ROBERTSON, J.T., OLDFIELD, S.A., AURONSON, I.U., Amplification and/or overexpression of platelet-derived growth factor receptors and epidermal growth factor receptor in human glial tumors, *Cancer Res.* 52 (1992) 4550-4553.
- 19 – PERCHE, F., TORCHILIN, V., “Recent Trends in Multifunctional Liposomal Nanocarriers for Enhanced Tumor Targeting,” *Journal of Drug Delivery*, vol. 2013, Article ID 705265, 32 pages, 2013. doi:10.1155/2013/705265.
- 20 – BIRNGRUBER, T., RAML, R., GLADDINES, W., GATSCHELHOFER, C., GANDER, E., GHOSH, A., KROATH, T., GAILLARD, P.J., PIEBER, T.R., SINNER, F., Enhanced Doxorubicin Delivery to the Brain Administered Through Glutathione PEGylated Liposomal Doxorubicin (2B3-101) as Compared with Generic Caelyx,(®) /Doxil(®) -A Cerebral Open Flow Microperfusion Pilot Study. *Journal of pharmaceutical sciences.* . ISSN 1520-6017. 2014) 1945–1948. doi: 10.1002/jps.23994.
- 21 – WINKLER, J., MARTIN-KILLIAS, P., PLUCKTHUN, A., ZANGEMEISTER-WITTKER, U. et al., EpCAM-targeted delivery of nanocomplexed siRNA to tumor cells with designed ankyrin repeat proteins. *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 2674-83.

- 22 – MORSHED, R., CHENG, Y., AUFFINGER, B., WEGSCHEID, M., LESNIAK, M., The potential of polymeric micelles in the context of glioblastoma therapy, *Frontiers in Pharmacology* (2013); 4: 157. doi: 10.3389/fphar.2013.00157
- 23 – WU, Y., SEFAH, K., LIU, H., WANG, R., TAN, W., DNA aptamer-micelle as an efficient detection/delivery vehicle toward cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 5-10.
- 24 – STEICHEN, S.D., CALDORERA-MOORE, M., PEPPAS, N.A., A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics, *Eur. J. Pharm. Sci.* 48 (2012) 416-427.
- 25 – WANG, C.X., HUANG, L.S., HOU, L.B., JIANG, L., YAN, Z.T., WANG, Y.L., CHEN, Z.L., Antitumor effects of polysorbate-80 coated gemcitabine polybutylcyanoacrylate nanoparticles in vitro and its pharmacodynamics in vivo on C6 glioma cells of a brain tumor model, *Brain Res.* 1261 (2009) 91-99.
- 26 – DING, H., INOUE, S., LJUBIMOV, A.V., PATIL, R., PORTILLA-ARIAS, J., HU, J., KONDA, B., WAWROWSKY, K.A., Inhibition of brain tumor growth by intravenous poly (beta-L-malic acid) nanobioconjugate with pH-dependent drug release [corrected], *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 18143-18148.
- 27 – BRONSTEIN, L.M., SHIFRINA, Z.B., Dendrimers as encapsulating, stabilizing, or directing agents for inorganic nanoparticles. *Chem Rev.* 2011;111(9): 5301-5344.
- 28 - HE, H., LI, J., JIA, X.R., DU, J., YING, X., LU, W.L., LOU, J.N., WEI, Y., PEGylated poly(amidoamine) dendrimer-based dual-targeting carrier for treating brain tumors. *Biomaterials* (2011), 32 (2), 478-487.
- 29 – CHERTOK, B., MOFFAT, B.A., DAVID, A.E., YU, F.Q., BERGEMANN, C., ROSS, V.C., YANG, V.C., Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors, *Biomaterials* 29 (2008) 487-496.
- 30 – SILVA, A.C., OLIVEIRA, T., MAMANI, J.B., MALHEIROS, S., MALAVOLTA, L., PAVON, L.F., SIBOV, T.T., AMARO, E., TANNUS, A.. Application of hyperthermia induced by superparamagnetic iron oxide nanoparticles in glioma treatment, *Int. J. Nanomedicine* 6 (2011) 591-603.
- 31 – DAY, E.S., THOMPSON, P.A., ZHANG, L., LEWINSKI, N., AHMED, N., DREZEK, R.A., BLANEY, S.M., WEST, J.L., Nanoshell-mediated photothermal therapy improves survival in a murine glioma model, *Journal of Neuro-Oncology.* 2011 Aug;104(1):55-63. doi: 10.1007/s11060-010-0470-8.



- 32 – CHATTERJEE, D.K., FONG, L.S., ZHANG, Y., Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm, *Adv Drug Deliv Rev.* 2008 Dec 14;60(15):1627-37. doi: 10.1016/j.addr.2008.08.003.
- 33 – DIMITRIJEVIC, N.M., ROZHKOVA, E., RAJH, T., Dynamics of localized charges in dopamine-modified TiO<sub>2</sub> and their effect on the formation of reactive oxygen species, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 2893-2899.
- 34 – MCCARTHY, J.R., WEISSLEDER, R., Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy, *Adv Drug Deliv Rev.* 2008 Aug 17;60(11):1241-51. doi: 10.1016/j.addr.2008.03.014.
- 35 – REDDY, G.R., BHOJANI, M.S., MCCONVILLE, P., MODDY, J., MOFFAT, B.A., HALL, D.E., KIM, G., KOO, Y.E., WOOLLISCROFT, M.J., Vascular targeted nanoparticles for imaging and treatment of brain tumors, *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 6677-6686.
- 36 – JUNG, J., SOLANKI, A., MEMOLI, K.A., KAMEI, K., KIM, H., DRAHL, M.A., WILLIAMS, L.J., TSENG, H.R., LEE, K., Selective inhibition of human brain tumor cells through multifunctional quantum-dot-based siRNA delivery, *Angew Chem Int Ed Engl.* 2010;49(1):103-7. doi: 10.1002/anie.200905126.
- 37 – BORM, P.J., ROBBINS, D., HAUBOLD, S., KUHLBUSCH, T., FISSAN, H., DONALDSON, K., SCHINS, R., STONE, V., KREYLING, W., The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Part Fibre Toxicol* 2006; 3: 11.