



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**THERANOSTICS - NOVAS TENDÊNCIAS EM MEDICINA  
PERSONALIZADA**

Trabalho submetido por  
**Nuno Maria Lago Ferreira da Veiga Cardoso**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Novembro de 2015**





**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**THERANOSTICS - NOVAS TENDÊNCIAS EM MEDICINA  
PERSONALIZADA**

Trabalho submetido por  
**Nuno Maria Lago Ferreira da Veiga Cardoso**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Professora Doutora Gabriela Almeida**

Novembro de 2015



## RESUMO

O conceito de medicina personalizada surge associado à optimização da prática clínica, procurando um ajuste e adequação dos recursos terapêuticos e de diagnóstico às necessidades individuais de cada paciente. Recorrendo ao perfil genético de cada indivíduo de forma a promover uma divisão em sub-populações em função da susceptibilidade a uma determinada patologia, ou da resposta a determinada terapêutica, a personalização da medicina procura diminuir a incidência de efeitos secundários enquanto racionaliza e direcciona de forma mais eficiente os meios disponíveis. O desenvolvimento da nanomedicina advém do intuito de promover a criação de novos sistemas de distribuição de fármacos através de nanoplataformas, como os lipossomas, os dendrímeros, os nanotubos de carbono ou as nanopartículas de ouro, capazes de dirigir selectivamente a terapêutica para um determinado alvo terapêutico. A aposta em modelos de distribuição selectiva de fármacos procura optimizar o seu índice terapêutico, promovendo a sua acumulação no tecido alvo, e limitando a sua acumulação em tecido saudável o que diminui e previne a ocorrência de efeitos secundários a nível sistémico. O conceito de *theranostic* procura fundir agentes com actividade terapêutica e agentes de contraste numa mesma entidade polivalente. Este conceito possibilita uma identificação e monitorização da terapêutica em tempo real, permitindo uma maior eficácia terapêutica, e a detecção de patologias em fase precoce. Embora a grande maioria da investigação científica esteja direccionada para as patologias oncológicas, esta abordagem demonstra um tremendo potencial no contexto das patologias infecciosas, auto-imunes e cardiovasculares. No futuro, espera-se que os sistemas de distribuição selectiva de fármacos activáveis em *theranostic* possam assumir-se como um recurso precioso na diminuição da prevalência de patologias com elevadas taxas de mortalidade associadas.

**Palavras-Chave:** *Theranostic*, Medicina Personalizada, Diagnóstico, Nanomedicina, Distribuição Selectiva de Fármacos.



## ABSTRACT

The concept of personalized medicine appears associated with the optimization of clinical practice, seeking an adjustment and adaptation of the therapeutic and diagnostic resources to the individual needs of each patient. Using the genetic profile of each individual to promote the division into sub-populations according to the susceptibility to a given disease or the response to a given therapy, personalized medicine aims to reduce the incidence of side effects while rationalizes and drives the available resources in a more efficient manner. The development in the nanomedicine field comes from seeking the creation of new drug delivery systems through nanoplateforms, such as liposomes, dendrimers, carbon nanotubes and gold nanoparticles, capable of selective therapeutic delivery for a certain therapeutic target. The choice of selective drug distribution models allows the optimization of a drug therapeutic index, by promoting their accumulation at the target site and limiting their accumulation in healthy tissue, which reduces and prevents the occurrence of systemic side effects. The concept of *theranostic* looks to merge contrast imaging agents and agents with therapeutic activity in the same polyvalent entity. This concept aims to enable identification and monitoring of therapy in real time, allowing not only a higher therapeutic efficacy, as the detection of pathologies at an early stage. Although the vast majority of scientific studies are directed to oncological diseases, the *theranostic* approach demonstrates a tremendous potential in the context of infectious, autoimmune and cardiovascular diseases. In the future, it is expected that the triggered and selective distribution systems in the theranostics sphere, may be a valuable asset in decreasing the prevalence of diseases associated with high mortality rates.

**Keywords:** *Theranostic*, Personalized Medicine, Diagnosis, Nanomedicine, Nanoparticle, Targeted Drug Delivery.



# Índice

RESUMO.....	5
ABSTRACT .....	7
ABREVIATURAS .....	12
<b>1. INTRODUÇÃO À MEDICINA PERSONALIZADA.....</b>	<b>16</b>
1.1. CONTRIBUIÇÃO DA GENÓMICA NA MEDICINA PERSONALIZADA.....	18
1.2. BIOMARCADORES COMO GUIAS DO TRATAMENTO PERSONALIZADO.....	20
1.2.1. Importância dos biomarcadores no desenvolvimento de fármacos .....	22
<b>2. THERANOSTIC - A CONJUGAÇÃO DA TERAPÊUTICA COM O DIAGNÓSTICO.....</b>	<b>25</b>
2.1. A FUSÃO DA TERAPÊUTICA COM O DIAGNÓSTICO .....	26
2.2. O IMPACTO DA NANOTECNOLOGIA NA MEDICINA: A NANOMEDICINA.....	28
2.2.1. Nanoplataformas como sistemas de distribuição de fármacos .....	29
2.2.1.1. Conjugados fármaco-polímero .....	32
2.2.1.2. Nanopartículas poliméricas .....	33
2.2.1.3. Nanopartículas magnéticas.....	35
2.2.1.4. Nanopartículas de lípidos sólidos.....	36
2.2.1.5. Dendrímeros .....	37
2.2.1.6. Lipossomas.....	39
2.2.1.7. Micelas .....	41
2.2.1.8. Nanopartículas de ouro.....	42
2.2.1.9. Nanotubos de carbono.....	44
2.3. NANOMEDICINA DE DIAGNÓSTICO .....	46
2.3.1. Ressonância Magnética.....	47
2.4. NANOTERAPÊUTICA: O APARECIMENTO DA NANOFARMACOLOGIA .....	49
2.4.1. Limitações em Nanofarmacologia.....	52
2.5. NANOTHERANOSTIC.....	53
<b>3. APLICAÇÕES DE THERANOSTIC.....</b>	<b>58</b>
3.1. THERANOSTIC NA DOENÇA ONCOLÓGICA.....	60
3.1.1. Revestimento de formulações .....	61
3.1.2. Direccionamento selectivo de formulações para o alvo tumoral através de ligandos .....	65
3.1.3. Potenciais sistemas de distribuição selectiva de fármacos em theranostic .....	70
3.2. THERANOSTIC EM PATOLOGIAS NÃO ONCOLÓGICAS .....	72
3.2.1. Theranostic nas doenças infecciosas .....	72
3.2.1.1. Terapêutica Fotodinâmica .....	73
3.2.1.2. Terapêutica Fototérmica.....	75

3.2.2. Theranostic nas doenças cardiovasculares .....	77
3.2.3. Theranostic nas doenças auto-imunes .....	79
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>86</b>

## Índice de Figuras

Figura 1 - Influência de biomarcadores no processo de desenvolvimento de fármacos Fonte: (Amir-Aslani & Mangematin, 2010). .....	23
Figura 2 – Efeito do EPR nos vários modelos de distribuição de fármacos. Em I), está identificado o modelo de distribuição tradicional sem recurso a nanoplateformas. Em II), está identificada a distribuição de selectiva de fármacos passiva mediada por EPR e com recurso a nanoveículos. Em III) e em IV), estão identificados modelos de distribuição selectiva de fármacos activa através do recurso à incorporação de ligandos na superfície de nanoveículos, um para células tumorais e o outro para células endoteliais, respectivamente. Em V), está identificado o modelo de distribuição selectiva de fármacos activável por um estímulo externo.....	30
Figura 3 - Exemplos de nanoplateformas e algumas das suas principais vantagens como veículos de sistemas de distribuição de fármacos. Fonte: (Jain et al., 2014).....	1
Figura 4 - Representação esquemática de um conjugado fármaco-polímero, onde além da incorporação de um agente terapêutico se verifica a presença de um agente de diagnóstico e de um ligando. Fonte: (M. S. Muthu et al., 2014) .....	1
Figura 5 - Representação esquemática de uma nanopartícula polimérica conjugado fármaco-polímero, onde se verifica a incorporação de um agente terapêutico, de um agente de diagnóstico e de um ligando. Fonte: (M. S. Muthu et al., 2014).....	34
Figura 6 - Representação esquemática de uma nanopartícula de lípidos sólidos, onde se verifica a incorporação de um agente terapêutico, de um agente de diagnóstico e de um ligando. Fonte: (M. S. Muthu et al., 2014) .....	37
Figura 7 - Representação esquemática de um dendrímero, onde se verifica a incorporação de um agente terapêutico, de um agente de diagnóstico e de um ligando. Fonte: (M. S. Muthu et al., 2014) .....	39
Figura 8 - Representação esquemática de um lipossomacom revestimento polimérico, onde se verifica a incorporação de um agente terapêutico, de um agente de diagnóstico e de um ligando. Fonte: (M. S. Muthu et al., 2014).....	40
Figura 9 - Representação esquemática de uma micela com revestimento polimérico, onde se verifica a incorporação de um agente terapêutico, de um agente de diagnóstico e de um ligando. Fonte: (M. S. Muthu et al., 2014).....	42
Figura 10 - Representação esquemática de uma nanopartícula de ouro com revestimento polimérico, onde se verifica a incorporação de um agente terapêutico e de um ligando. Fonte: (M. S. Muthu et al., 2014).....	44
Figura 11 - Representação esquemática de um nanotubo de carbono, onde se verifica a incorporação de um agente terapêutico, de um agente de diagnóstico e de um ligando. Fonte: (M. S. Muthu et al., 2014).....	45

Figura 12 - Em (a) está representada, de forma esquemática, um exemplo de uma formulação theranostic. Esta é então constituída internamente por um nanoveículo, neste caso um SPION, e a sua superfície polivalente pode ser composta por um revestimento polimérico, o qual são incorpora o fármaco, o ligando, o agente de contraste, e um agente promotor da captação celular. Em (b) encontra-se esquematizado o processo de distribuição selectiva da formulação theranostic para um alvo tumoral através de diferentes processos. Em (I) a distribuição é mediada passivamente pelo Efeito de Permeabilidade e Retenção aumentado. Em (II) a distribuição selectiva da formulação é mediada activamente para o alvo tumoral pela incorporação de um ligando específico. Em (III) o processo de distribuição selectiva acontece na sequência da aplicação de um estímulo externo, neste caso concreto, resulta da aplicação de um campo magnético. Fonte: (Singh & Sahoo, 2014)..... 55

Figura 13 - Diagrama esquemático demonstrativo do processo de selecção de indivíduos para ensaios clínicos preconizado pela abordagem theranostic. Fonte: (Rizzo et al., 2013)..... 56

Figura 14 -Representação das diferentes conformações de PEG. Em I) está representada a organização das moléculas de PEG em forma de cogumelo, onde se verifica que a distância entre moléculas é maior que o valor de Rf. Em II), está ilustrada a organização das moléculas de PEG em escova, constatando-se que o valor de Rf é superior à distância entre moléculas. Fonte: (M. Wang & Thanou, 2010)..... 64

Figura 15 - Observação de imagens de ressonância magnética na sequência da aplicação de uma nanoformulação constituída por Doxorubicina, um SPION e um anticorpo anti-Her como ligando, a um ratinho portador de cancro da mama ao longo do tempo. Em (a) observa-se a imagem do tumor no momento anterior à injeccção da formulação, 1 hora após a injeccção (b), 4 horas após a injeccção (c), e 12 horas após a injeccção (d). R2, que representa a taxa do tempo de relaxamento (T2), e que é tanto maior quanto maior a interacção com partículas magnéticas, verificando-se por isso uma acumulação máxima da formulação 1 hora após a injeccção, em (b). Fonte:(Mura & Couvreur, 2012) ..... 66

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Factores limitantes à distribuição de fármacos em tumores. Fonte:(Rizzo et al., 2013) ..... 50  
 Tabela 2 - Estado actual da nanofarmacologia. Fonte: (Jain et al., 2014)..... 51

## **ABREVIATURAS**

Ac- Anticorpo

BHE- Barreira Hematoencefálica

CNT- Carbon Nanotube

CT- Tomografia Computorizada

DMRI- Degeneração Macular Relacionada Com A Idade

DNA- Desoxyribonucleic Acid

DOTA- Ácido Tetraazaciclododecanotetraacético

DTPA- Ácido Dietilenotriaminapentaacético

DWCNT- Double-Walled Carbon Nanotube

EPR- Enhanced Permeability and Retention Effect

Fc- Crystallisable Fragment

Fab- Fragment Antigen-Binding

FDA- Food And Drug Administration

Gd- Gadolínio

GNP- Gold Nanoparticle

HER-2- Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

HGP- Human Genome Project

HPMA- N-(2-hidroxipropil) metacrilamida

MRSA- Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*

*Abreviaturas*

MWCNT- Multi-Walled Carbon Nanotube

NGS- Next Generation Sequencing

NIH- National Institute of Health

NIR- Near-Infrared

Nm- Nanómetro

NP- Nanoparticle

PCAST- President's Council of Advisors on Science Technology

PDT- Photodynamic Therapy

PEG- Polietilenoglicol

PET- Tomografia Por Emissão De Positrões

PLGA- Poli(D,L-láctico-co-glicólico)

PLGA-PEG- Poli(D,L-láctico-co-glicólico)-Polietilenoglicol

PNP- Polymeric Nanoparticle

PPIX- Protoporfirina IX

PSA- Prostate-Specific Antigen

PTT- Photothermal Therapy

Rf- Flory Radius

RM- Ressonância Magnética

RNA- Ribonucleic Acid

SNP- Single Nucleotide Polimorphisms

SPECT- Tomografia Por Emissão De Fotão Único

SPION- Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle

SWCNT- Single-Walled Carbon Nanotube

TfR- Transferrin Receptor

TWCNT- Triple-Walled Carbon Nanotube

uPA- Urokinase Plasminogen Activator

US- Ultra-Sonografia



## Capítulo

# 1. INTRODUÇÃO À MEDICINA PERSONALIZADA

Ao longo da última década e meia o conceito de medicina personalizada foi permanentemente redimensionado face ao aumento da sua prevalência no seio da comunidade científica. Dada a complexidade do conceito, não possui uma definição universal, sendo típica e genericamente descrito por Bates (2010) como “o doente certo, com o medicamento certo, na dose certa e no tempo certo”. Sendo este lema, à partida, pouco distintivo relativamente à prática médica, o relatório norte-americano *President’s Council of Advisors on Science Technology* (PCAST) publicado em Setembro de 2008, apresenta uma definição, porventura mais relevante e abrangente deste conceito. Segundo o PCAST, a medicina personalizada decorre da adaptação do tratamento médico às características individuais de cada doente, tendo por base a classificação de indivíduos em subpopulações consoante a sua susceptibilidade a uma determinada patologia, ou à resposta a determinado medicamento. Desta forma, e não prevendo a criação de medicamentos ou dispositivos médicos específicos para cada indivíduo, as intervenções terapêuticas com carácter preventivo podem ser direccionadas apenas para quem delas beneficiará, obtendo-se uma menor incidência de efeitos secundários, além de fomentar uma maior racionalização de meios (Bates, 2010) (Ryu et al., 2014).

Tendo como objectivo prioritário a maior efectividade terapêutica possível, torna-se premente uma maior particularização, quer na definição de determinada patologia, quer dos doentes que por esta são afectados. Assim sendo, a medicina personalizada surge como uma progressão natural das boas práticas clínicas, o alicerce da prestação de cuidados de saúde, reflectindo um desenvolvimento contínuo através da medicina estratificada (Bates, 2010).

O vasto impacto criado pelo progresso tecnológico tanto ao nível molecular como ao nível genómico, acelerou a conclusão do projecto genoma humano (HGP) e conduziu ao copioso aparecimento tanto de novos diagnósticos, como de terapêuticas localizadas (Amir-Aslani & Mangematin, 2010). Deste modo, a medicina personalizada assume um enorme potencial na identificação de lacunas actualmente existentes tanto no âmbito do diagnóstico de patologias, como no da resposta do doente, tanto à doença como à terapêutica. Esta premissa é suportada pela variabilidade existente na resposta dos doentes aos medicamentos em regimes padrão. Embora existam variações consideráveis dependentes da patologia em estudo, estima-se que se verifique uma ausência de resposta à terapêutica aplicada em 30% a 70% dos doentes. Reconhecendo a existência de múltiplos factores no condicionamento da

resposta à terapêutica, julga-se importante a contribuição de factores específicos do doente, como a variação das taxas de metabolização do medicamento, ou a variação da natureza da própria patologia (Bates, 2010).

### **1.1. CONTRIBUIÇÃO DA GENÓMICA NA MEDICINA PERSONALIZADA**

No ano de 1977, o autor Fred Sanger descreveu o método de terminação de cadeia com o propósito de promover uma rápida sequenciação de DNA tornando possível a sequenciação de genes completos, e posteriormente de um genoma inteiro. Ao nível do seu procedimento, este método reduziu o manuseio de produtos químicos tóxicos e de radioisótopos (Schuster, 2007). A “*sequenciação de Sanger*” tornou-se, desde então, no processo de sequenciação de DNA de eleição tendo originado, nos últimos anos do século XX, os primeiros sequenciadores comerciais (Gonzalez-Garay, 2014).

No início do século XXI e no seguimento do projecto genoma humano, que visou a identificação e sequenciação de todos os nucleótidos do genoma humano, a indústria farmacêutica assumiu a necessidade de alteração de paradigma na concepção e desenvolvimento de fármacos, reconhecendo que o progresso na terapêutica e no diagnóstico estaria dependente da identificação de diferenças, entre indivíduos, ao nível do código genético (Langreth & Waldholz, 1999).

Em 1999, e num acto sem precedentes até aquela data, várias das maiores multinacionais do sector farmacêutico como a Novartis, a Roche ou a Glaxo Wellcome PLC, reuniram-se em consórcio com o objectivo de mapear os genes humanos através da utilização de *Single Nucleotide Polimorphisms* (SNP), a fim de determinar pequenas variações nas unidades base dos ácidos nucleicos entre indivíduos. A expectativa dos investigadores, era a de que estas variações pudessem explicar uma maior predisposição genética para uma determinada doença por parte de alguns indivíduos, bem como as diferenças registadas na resposta à terapêutica, o que consequentemente permitiria um *design* de fármacos específico para um determinado perfil genético (Langreth & Waldholz, 1999).

Sendo claro que as variações genéticas podem causar grandes diferenças de resultados no que diz respeito à efectividade de uma terapêutica, e mesmo sendo possível estimar estas mesmas diferenças de resultados, a verdade é que os mecanismos subjacentes bem como as

variações genéticas responsáveis continuam amplamente desconhecidas. De forma a responder a esta problemática, tem-se registado um esforço na promoção da farmacogenómica com o objectivo de se tornarem conhecidas todas as variações genéticas relevantes para a terapêutica, nomeadamente as que apresentem índices de causalidade e prevalência suficientes numa população alvo (Amir-Aslani & Mangematin, 2010). Uma abordagem com recurso à genómica, é actualmente o primeiro passo no quadro actual de *design* de fármacos, especialmente na obtenção de terapias moleculares localizadas guiadas por biomarcadores em doenças do foro oncológico. Embora se tenha obtido durante um período inicial um total estado de remissão, verificou-se na generalidade dos casos um posterior retorno da doença, com maior agressividade e com resistências a um maior número de soluções terapêuticas. Consequentemente, a farmacogenómica tem como prioritário o desenvolvimento de testes com recurso a biomarcadores multi-gene com forte poder preditivo e capazes de evidenciar factores de risco, para que, mantendo a máxima efectividade terapêutica, sejam evitadas situações de toxicidade (DeNardo & DeNardo, 2012). Ao tornar-se numa área de especial interesse, a farmacogenómica poderá assumir-se como protagonista na pesquisa de novas soluções terapêuticas em medicina personalizada, contribuindo significativamente para a alteração da prática dos prestadores de cuidados de saúde. Permitirá o tratamento em fase precoce da doença, ou mesmo a sua prevenção, traduzindo-se numa inequívoca melhoria ao nível dos resultados dos tratamentos. Existe, no entanto, pouco incentivo económico para o desenvolvimento desta promissora abordagem terapêutica, o que tem retardado o seu desenvolvimento. Por este motivo e apesar dos avanços expressivos, actualmente os conceitos vigentes das ciências biomédicas e das suas aplicações clínicas, ainda são em grande parte orientados com um foco estrito na doença (Limaye, 2013).

Após a conclusão do Projecto Genoma Humano, e no ano de 2007, Craig Venter sequenciou o seu próprio genoma, o HuRef, tornando-o no primeiro genoma humano diplóide de um único indivíduo alguma vez sequenciado e com um custo de 100 milhões de dólares. Esta iniciativa conduziu ao aparecimento dos *Next Generation Sequencing* (NGS) (Gonzalez-Garay, 2014). Ao promover um processo de sequenciação mais rápido, mais barato, e mais preciso, os NGS preconizam um progresso significativo na tecnologia de sequenciação genética, sendo, desde 2012, utilizados na investigação de patologias oncológicas. Inserindo-se no contexto da medicina personalizada, os NGS tem gerado grande expectativa relativamente ao impacto que pode vir a ter na revolução da abordagem do tratamento do cancro, tanto ao nível do diagnóstico, como da terapêutica (Carlson, 2012). Actualmente estão

disponíveis no mercado vários sistemas para a sequenciação de DNA, dos quais se destaca o Illumina HiSeq X Ten, o primeiro sistema NGS capaz de sequenciar um genoma inteiro com um custo de 1000 dólares (Gonzalez-Garay, 2014).

O progresso contínuo nos campos da genética e da genómica evidenciou a tendência emergente para a medicina personalizada. A procura de novas soluções terapêuticas orientadas para o perfil genético do indivíduo, depende de diversos conjuntos de biomarcadores (Amir-Aslani & Mangematin, 2010). Com o actual estado da arte, espera-se que a optimização da terapêutica para cada indivíduo promova desde logo uma melhoria significativa no resultado dos tratamentos, tanto com novos medicamentos como com os já existentes (Bates, 2010).

## **1.2. BIOMARCADORES COMO GUIAS DO TRATAMENTO PERSONALIZADO**

Ao conceito de medicina personalizada está associado, de forma inerente um crescente interesse na descoberta de biomarcadores. De acordo com o *National Institute of Health* (NIH), um biomarcador é uma característica objectivamente medida e avaliada como um indicador de um processo biológico normal, de um processo patogénico, ou da resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica (Amir-Aslani & Mangematin, 2010). Contudo o conceito de biomarcador tem sido refinado ao longo do tempo, com o recurso à genómica e à proteómica, obtendo-se hoje em dia indicadores moleculares de uma propriedade biológica específica. (Sadee, 2011) (Mura & Couvreur, 2012)

Dada a capacidade que apresentam para medir a resposta à terapêutica e prever a ocorrência de efeitos secundários, a utilização de biomarcadores como guias da terapêutica, é o processo que torna a medicina individualizada. Porém, apesar da informação que fornecem relativamente à progressão da doença é ainda limitada (Sadee, 2011) (Zhang, Zhang, Nagaraju, & El-Rayes, 2015). Deste modo, os biomarcadores validados biologicamente acompanham todo o processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, podendo ser utilizados para averiguar a resposta de um doente a um tratamento com uma terapêutica específica, fornecendo tanto informação acerca da sua efectividade como de eventual toxicidade (Amir-Aslani & Mangematin, 2010) (Zhang et al., 2015).

Uma abordagem baseada no recurso a biomarcadores sugere um tremendo potencial no desenvolvimento de fármacos, por apresentarem a capacidade de fornecer, ainda numa fase inicial do desenvolvimento, informação mais específica acerca dos mecanismos subjacentes à interacção do fármaco com a patologia. De facto, espera-se que as ferramentas da genómica, da proteómica e da imagiologia, possam causar um impacto dramático no desenvolvimento de novos fármacos, resolvendo problemas de inovação e promovendo uma maior produtividade, com uma diminuição dos custos (Amir-Aslani & Mangematin, 2010) (Sadee, 2011).

Uma patologia ocorre normalmente segundo um conjunto de processos que se desenrolam em cascata. Se um biomarcador estiver envolvido directamente na fisiopatologia de uma doença, essa envolvimento pode ocorrer numa fase inicial ou final da cascata. Os biomarcadores que ocorrem numa fase inicial são conhecidos por biomarcadores a montante, e fornecem informação acerca da interacção física ou biológica com o alvo molecular do fármaco. Por oposição, se um biomarcador ocorrer numa fase tardia da cascata é designado biomarcador a jusante, e possui a capacidade de prever o eventual benefício clínico. (Amir-Aslani & Mangematin, 2010) (Sadee, 2011).

Os biomarcadores representam um largo espectro de medidas, com maior incidência, os que resultam da genómica. Diferentes objectivos podem ser alcançados empregando variações genéticas ao nível dos SNP, representadas por sequências genómicas ou perfis de expressão, de RNA, proteínas ou metabolitos. Tipicamente, estes indicadores não sofrem variações nos tecidos somáticos, excepto em casos onde sejam provocadas alterações físicas pelo estágio da doença, tratamento farmacológico, ou ainda, como resposta a condições ambientais (Amir-Aslani & Mangematin, 2010) (Sadee, 2011).

Através da farmacogenómica, podem ser detectados perfis de expressão genética em tecidos, auxiliando o diagnóstico em fase precoce da doença e permitindo a estratificação de patologias semelhantes. Podem ser utilizados inclusivamente na identificação das patologias que respondem a uma determinada terapêutica, bem como patologias que não respondem. De modo a que se possa assistir a uma massificação da tecnologia com recurso a biomarcadores para uma vasta população, carecem ainda de desenvolvimento abordagens que permitam uma identificação e validação confiáveis dos biomarcadores, em amostras de doentes que sejam facilmente acessíveis, tais como o sangue ou a urina (Amir-Aslani & Mangematin, 2010) (Sadee, 2011).

Uma abordagem proteômica com recurso a biomarcadores envolve uma análise dos mecanismos celulares afectados por uma patologia, bem como a identificação das proteínas capazes de avaliar a perturbação desses mesmos mecanismos. Esta estratégia, ao apreciar qualitativa e quantitativamente a composição proteica, pode fornecer informação acerca da função de um órgão, ou mesmo de todo o organismo (Cho, 2007) (Sadee, 2011). Tal como acontece nos biomarcadores genómicos, o desafio do diagnóstico com recurso a biomarcadores de proteínas também se apresenta como uma solução precisa, economicamente apelativa, e que será aplicável sob a forma de testes rápidos. O crescimento do espectro de acção deste tipo de biomarcadores, bem como uma maior extensão dos candidatos terapêuticos, está dependente de avanços nos estudos das interacções proteína-proteína, nos perfis de expressão proteica, e na compilação de bases de dados proteómicos (Cho, 2007) (Amir-Aslani & Mangematin, 2010).

De forma distinta, espera-se que os biomarcadores relativos aos receptores de fármacos e às vias de sinalização sejam capazes de guiar a classe de fármaco que deve ser eleita. Enquanto esta abordagem tem vindo a assumir uma preponderância na terapêutica relacionada com o foro oncológico, nas outras áreas clínicas o conhecimento é ainda muito limitado (Amir-Aslani & Mangematin, 2010).

### **1.2.1. IMPORTÂNCIA DOS BIOMARCADORES NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS**

A implementação da medicina personalizada implica a estratificação de uma população assente na previsão da resposta a uma determinada terapêutica, através da identificação de biomarcadores relativos à actividade do fármaco. Assim, tanto podem ser antecipadas respostas favoráveis e indicadoras de efectividade terapêutica, como respostas desfavoráveis indicando ocorrência de efeitos secundários e eventual toxicidade. Com o objectivo de alavancar a utilização de biomarcadores, têm surgido iniciativas dignas de especial registo, como é o caso do “*HapMap*”. Esta iniciativa de carácter internacional, consta de uma base de dados de variações genómicas do genoma humano acumuladas na população ao longo do tempo. O “*HapMap*” procura facultar o acesso a recursos críticos à produção e divulgação de conhecimento científico, bem como ao próprio desenvolvimento de fármacos (Amir-Aslani & Mangematin, 2010).

Os biomarcadores podem agilizar o processo de desenvolvimento de um fármaco através da identificação de efeitos adversos, com maior destaque para os potencialmente fatais, antes da chegada deste ao mercado. Esta estratégia conduz a um elevado aumento da segurança da terapêutica para o público em geral, ao qual está associado de forma inerente, uma pronunciada diminuição de riscos (Amir-Aslani & Mangematin, 2010) (Zhang et al., 2015).

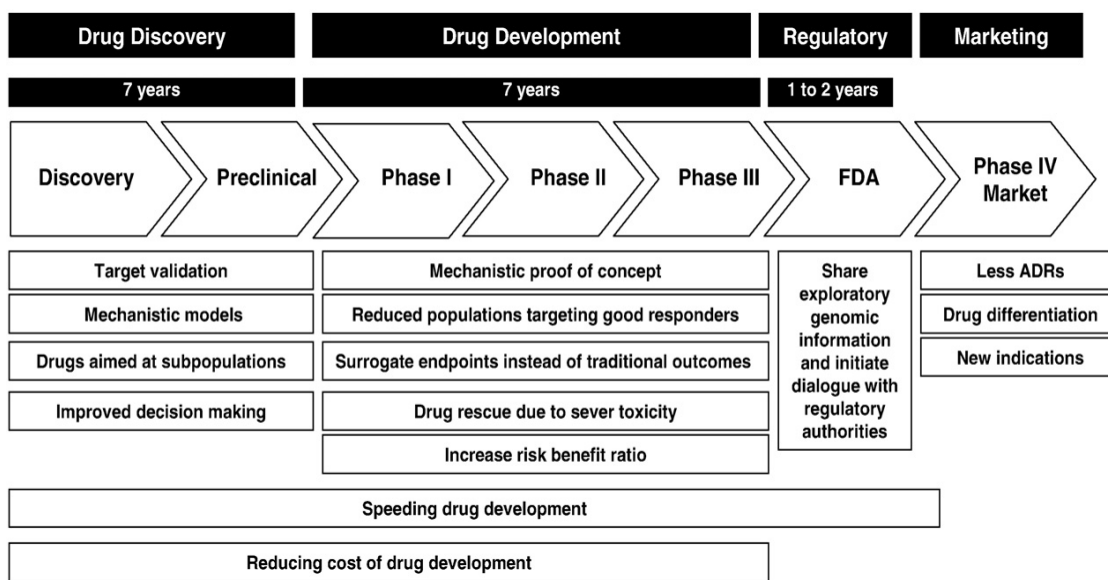


Figura 1- Influência de biomarcadores no processo de desenvolvimento de fármacos  
 Fonte: (Amir-Aslani & Mangematin, 2010).

A toxicidade de um composto, constitui uma das principais causas para que um composto seja abandonado durante o processo de desenvolvimento do fármaco, como representado pelo diagrama da Figura 1. Em cerca de 66% dos casos, os compostos em ensaio não chegam ao mercado devido à toxicidade hepática, cardíaca ou neurológica, que apresentam. Dada a circunstância, verifica-se que a aplicação de biomarcadores com a capacidade de avaliar a toxicidade de um composto, pode coadjuvar a extrapolação de dados pré-clínicos para humanos. O impacto económico, será tanto maior quanto mais precoce for a sua inclusão (Amir-Aslani & Mangematin, 2010).

Uma das estratégias utilizadas para uma maior racionalização de custos durante o processo de desenvolvimento, passa por uma tentativa de reaproveitamento de fármacos abandonados numa qualquer fase do seu desenvolvimento. São realizados esforços, relacionados com a aplicação de biomarcadores, numa tentativa de criar um caminho alternativo para fazer chegar estes fármacos já existentes ao mercado. A identificação através

de um biomarcador de uma subpopulação de doentes para os quais o composto é seguro, desde que acompanhada por um diagnóstico, pode reposicionar um fármaco previamente abandonado no decurso do seu desenvolvimento (Amir-Aslani & Mangematin, 2010).

Com efeito, a abordagem que combina a utilização de um biomarcador e a medicina, capaz de prever a taxa de resposta à terapêutica e o risco de toxicidade recorrendo a dados clínicos e biomédicos, já se tornou obrigatória em alguns casos e indicia uma tendência dominante para o futuro (Amir-Aslani & Mangematin, 2010).

## Capítulo

# 2. THERANOSTIC - A CONJUGAÇÃO DA TERAPÊUTICA COM O DIAGNÓSTICO

## **2.1. A FUSÃO DA TERAPÊUTICA COM O DIAGNÓSTICO**

O conceito de *theranostic*, tal como o de medicina personalizada abordado no capítulo anterior, tem sido alvo de um extenso processo de diversificação ao longo do tempo. Apesar de frequentemente utilizado como um sinónimo de medicina personalizada, quando empregue pela primeira vez no ano de 2000 pela empresa PharmaNetics, a dimensão de *theranostic* resumia-se ao desenvolvimento de testes rápidos capazes de estratificar uma população de doentes, promovendo o diagnóstico de patologias e estabelecer uma previsão dos riscos associados. Seria então possível realizar uma identificação e monitorização da terapêutica, tendo em vista a obtenção de uma maior eficácia, conferindo ao clínico a possibilidade de elaboração, de forma rápida e adaptável, de uma resposta face ao resultado do tratamento. Devido ao crescente progresso tecnológico, nomeadamente ao nível da nanomedicina, o conceito estende-se às estratégias que englobam o tratamento, e em simultâneo, o diagnóstico da efectividade terapêutica aplicada a esse mesmo tratamento (Clemente-Casares & Santamaria, 2014).

O conceito de *theranostic* advém da associação entre a terapêutica e o diagnóstico, e cujo propósito passa pelo *design* de uma abordagem farmacoterapêutica individualizada. Esta abordagem é utilizada na identificação de alvos moleculares adequados para o tratamento com a melhor terapêutica possível, descartando simultaneamente terapêuticas ineficazes. Esta ferramenta permite a determinação da farmacocinética e da farmacodinâmica de um fármaco, possibilitando a eleição da melhor opção terapêutica, assim como a adopção do regime posológico mais adequado para um determinado indivíduo (Lu, 2014) (Kojima, Aibel, & Fussenegger, 2015).

Associados ao diagnóstico estão, inevitavelmente, os recursos provenientes da imagiologia biomédica, que ao permitirem a visualização não invasiva de estruturas anatómicas de órgãos e tecidos humanos, e facultando informação acerca da patologia, materializam uma preponderante contribuição para a realização de um diagnóstico preciso. Actualmente e devido ao progresso tecnológico nesta área, a imagiologia biomédica estende o diagnóstico de um nível estrutural para um nível molecular, permitindo uma observação quantitativa e qualitativa dos processos biológicos afectos às patologias humanas ao nível molecular. O progresso registado neste âmbito fomentou com naturalidade uma transversal propagação da recorrência aos métodos de imagiologia na prática clínica, como sejam o diagnóstico e prognóstico de uma doença, as intervenções terapêuticas orientadas por

imagem, e ainda na avaliação não invasiva da efectividade terapêutica (Lu, 2014) (Kojima et al., 2015).

As potencialidades da imagiologia biomédica tornam-se de capital relevância, quando os recursos actualmente disponíveis permitem a determinação não invasiva da farmacocinética e da farmacodinâmica de uma abordagem terapêutica. Assim, os métodos utilizados em imagiologia biomédica são também utilizados concomitantemente com a terapêutica, possibilitando uma adaptação personalizada da terapêutica, o melhor resultado possível (Lu, 2014) (Kojima et al., 2015).

A inclusão dos agentes utilizados em imagiologia nos sistemas de distribuição de fármacos torna-se crucial ao permitir a obtenção não invasiva de parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicas do sistema de distribuição em causa. Esta associação fomenta consequentemente a produção de informação necessária à optimização dos sistemas de distribuição de fármacos utilizados por *theranostic*, perspectivando uma maior competência para lidar com as patologias mais severas, como as patologias do foro oncológico ou de natureza cardiovascular (Lu, 2014) (Kojima et al., 2015).

*Theranostic* apresenta-se como um esforço de convergência interdisciplinar de várias áreas do conhecimento, onde se incluem as engenharias, a química, a biologia, a ciência farmacêutica e a medicina. Consistindo numa estratégia multidisciplinar, esta abordagem tem como prioritária a procura de diagnósticos e terapêuticas seguras. Em última análise, *theranostic* procura facultar ao doente uma maior qualidade no tratamento aliada a uma maior segurança (Lu, 2014).

Relativamente ao impacto emergente que *theranostic* tem consubstanciado no seio da comunidade científica, importa referir que foi criada uma revista com o nome “*Theranostics Journal*” no ano de 2011 e publicada pela editora Ivyspring International Publisher. A revista, num claro reconhecimento do potencial de *theranostic* para o futuro da prestação de cuidados de saúde, procura preencher a lacuna existente na comunidade, divulgando e promovendo simultaneamente o conceito de *theranostic*. Esta revista caracteriza-se pela pluridisciplinaridade dos artigos científicos originais e inovadores que publica, repercutindo a evolução ao nível da imagiologia molecular, da terapêutica molecular, das plataformas multifuncionais de nanopartículas, da terapêutica orientada por imagem e da nanomedicina.

Esta publicação procura ainda incentivar um largo espectro de pesquisa biomédica que pode ser aplicada a aplicações futuras em *theranostic*. (X. S. Chen, 2011)

## **2.2. O IMPACTO DA NANOTECNOLOGIA NA MEDICINA: A NANOMEDICINA**

No presente capítulo pretende-se abordar o impacto da nanotecnologia na Saúde, com especial destaque para o contexto clínico. Assumindo-se como uma área multidisciplinar, compete à nanotecnologia a integração dos contributos da Física, da Química, da Biologia, bem como de várias outras Ciências, com o objectivo de processar e fabricar, à escala nanométrica, produtos com um vasto leque de possíveis aplicações. O conceito de nanomedicina é, então, designado pelo conjunto de aplicações oriundas da nanotecnologia destinadas à medicina, e aos cuidados de saúde (Clemente-Casares & Santamaria, 2014).

Sob a premissa da medicina personalizada, a terminologia “nanomedicina” tem aparecido de forma insistente no seio da comunidade científica. A primeira referência do termo nanomedicina pontificou na obra “*Unbounding the future: the Nanotechnology Revolution*” de Eric Drexler, Christine Petersen e Gayle Pergamit, publicada no ano de 1991, onde e por definição, nanomedicina refere-se à aplicabilidade de nanomateriais, caracterizados como “estruturas organizadas sob a escala nanométrica em pelo menos uma dimensão”, na área da medicina (Clemente-Casares & Santamaria, 2014).

Com o aparecimento, identificação e caracterização de nanomateriais com o propósito de superar as limitações dos modelos tradicionais de distribuição de fármacos, desde a sua génese até à actualidade, a definição de nanomedicina sofreu algumas alterações sendo hoje entendida e de forma genérica, como a aplicação directa da nanotecnologia no universo biomédico, nomeadamente em sistemas de libertação controlada de fármacos assim como em métodos de diagnóstico, com o propósito de melhorar o diagnóstico, a monitorização, a prevenção e o tratamento de patologias (Mura & Couvreur, 2012).

Apesar do inequívoco e considerável progresso a que assistimos, particularmente nas últimas duas décadas, no âmbito da nanotecnologia, registam-se dificuldades, maiores que as inicialmente previstas, no controlo de algumas variáveis como a alteração do ambiente biológico, as barreiras fisiológicas ou ainda as propriedades físico-químicas das formulações encontradas. Esta realidade requer uma maior investigação científica no universo da nanotecnologia de modo a que se possam encontrar um maior número de soluções viáveis do

ponto de vista da aplicabilidade num contexto clínico (Mura & Couvreur, 2012)(Jain, Mehra, & Jain, 2014).

### **2.2.1. NANOPLATAFORMAS COMO SISTEMAS DE DISTRIBUIÇÃO DE FÁRMACOS**

O recurso às aplicações geradas pela nanomedicina ao nível dos sistemas de distribuição de fármacos, deve-se às inúmeras vantagens destas últimas face às modalidades terapêuticas mais tradicionais. Algumas das principais vantagens das formulações oriundas da nanomedicina são a redução da excreção renal, promovendo um maior tempo de circulação; a redução do volume de distribuição, gerando uma menor acumulação em tecidos saudáveis; o aumento da capacidade de acumulação de um fármaco no alvo terapêutico; ao aumentarem a concentração do fármaco no alvo terapêutico, e reduzindo a sua acumulação num tecido saudável, melhoram significativamente o índice terapêutico do fármaco (Rizzo, Theek, Storm, Kiessling, & Lammers, 2013) (Xie, Lee, & Chen, 2010). Além das vantagens acima mencionadas, estas aplicações são também utilizadas tanto na distribuição de agentes terapêuticos, como é o caso dos agentes quimioterapêuticos de baixo peso molecular, permitindo que estes ultrapassem várias barreiras e tornando a sua distribuição até ao alvo tumoral mais eficiente. Ao auxiliarem de forma significativa o processo de distribuição, as nanoplataformas promovem uma menor incidência de efeitos secundários, contribuindo para um aumento da tolerância e aceitação dos doentes à terapêutica, e para um melhor prognóstico (Rizzo et al., 2013) (Xie et al., 2010).

Os tumores sólidos, tal como os tecidos inflamados, apresentam geralmente uma vasculatura com menor estanquidade quando comparada à maioria da vasculatura encontrada em tecidos saudáveis, e que permite o extravasamento de nanoplataformas com dimensões até aos 400 nm. Devido a esta circunstância, podem acumular-se de forma mais selectiva e efectiva nestes tecidos alvo, através de um fenómeno conhecido por *Enhanced Permeability and Retention Effect* (EPR), representado na Figura 2. Este efeito deve-se, além da fraca estanquidade, à reduzida drenagem linfática que ocorre ao nível do tumor, o que possibilita a permanência das nanoplataformas no alvo terapêutico. O direccionamento terapêutico mediado pelo *EPR* designa-se por **direccionamento terapêutico passivo**, na medida em que depende unicamente de particularidades da patologia (Rizzo et al., 2013). De forma contrária, o **direccionamento terapêutico activo** depende da incorporação física ou química de um agente de direccionamento, ou ligando, na nanoplataforma, de modo a permitir a localização, ou captação por parte das células do tecido alvo. Os agentes normalmente utilizados são

anticorpos, péptidos e moléculas de pequenas dimensões, como os folatos (Tomuleasa, Braicu, Irimie, Craciun, & Berindan-Neagoe, 2014). Existem outras estratégias de direccionamento terapêutico activo que visam melhorar o processo de distribuição do fármaco, facilitando a libertação do mesmo e, ou aumentando a efectividade da terapêutica no tecido alvo, como é o caso do direccionamento para o endotélio do tumor, ou como é ainda o caso do desenvolvimento de sistemas que respondam a estímulos, como a hipertermia ou o ultra-som, que quando accionados libertam o seu conteúdo (Rizzo et al., 2013).

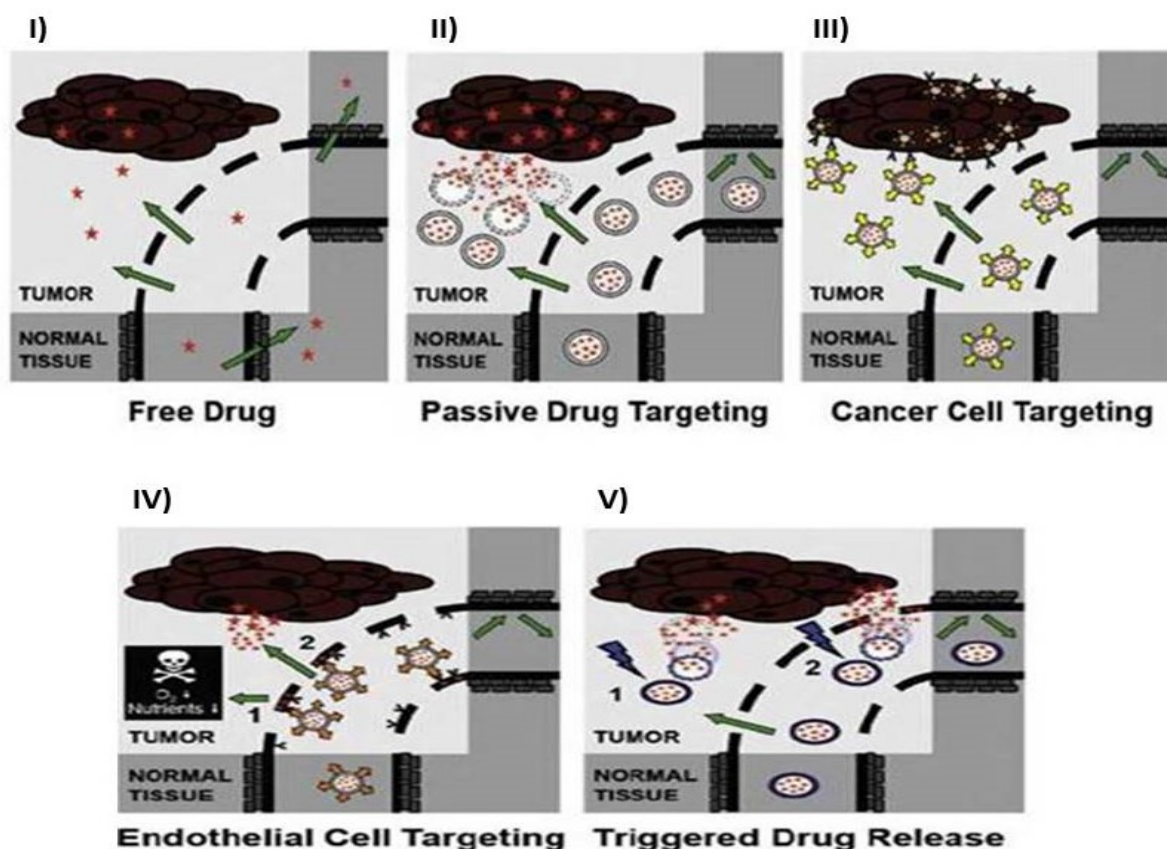


Figura 2 – Efeito do EPR nos vários modelos de distribuição de fármacos. Em I), está identificado o modelo de distribuição tradicional sem recurso a nanoplateformas. Em II), está identificada a distribuição de selectiva de fármacos passiva mediada por EPR e com recurso a nanoveículos. Em III) e em IV), estão identificados modelos de distribuição selectiva de fármacos activa através do recurso à incorporação de ligandos na superfície de nanoveículos, um para células tumorais e o outro para células endoteliais, respectivamente. Em V), está identificado o modelo de distribuição selectiva de fármacos activável por um estímulo externo. Fonte: (Rizzo et al., 2013).

O direccionamento terapêutico activo tem menos utilidade prática que o seu homónimo passivo, sendo utilizado com sucesso apenas num restrito número de casos específicos, já que a incorporação de agentes de direccionamento tende a criar problemas no

*design* da formulação (Rizzo et al., 2013) (Urban, Urban, Charron, & Joshi, 2013). Na generalidade dos casos, só se procede à incorporação de um ligando a uma nanoplataforma se este possuir uma propriedade específica que não possa ser transmitida através do direccionamento passivo, como é o caso da efectividade anti tumoral intrínseca que permite um direccionamento combinado da terapêutica. Assim, o direccionamento terapêutico activo é utilizado em casos onde o agente é residualmente captado, como é o caso das macromoléculas carregadas negativamente (e.g. DNA) , tornando a utilização deste método fundamental para a captação celular e para a efectividade terapêutica (Tomuleasa et al., 2014) (Urban et al., 2013).

Tratando-se de uma área clínica na qual urgem soluções e considerando os mecanismos acima descritos, nomeadamente o direccionamento terapêutico passivo mediado por EPR em tumores, compreende-se que a larga maioria da investigação científica no âmbito das nanoplataformas esteja direccionada para a oncologia. No entanto, denota-se um esforço acentuado da comunidade em aumentar a abrangência desta abordagem terapêutica a outras áreas clínicas (Rizzo et al., 2013) (M. S. Muthu, Leong, Mei, & Feng, 2014) (Jain et al., 2014).

Conforme acima mencionado, também nos processos inflamatórios se verifica uma menor estanquidade da vasculatura, permitindo uma maior acumulação de nanoplataformas no tecido alvo e, simultaneamente, diminuindo a sua distribuição em tecidos saudáveis. Deste modo, criou-se a expectativa de aplicação direccionada de doses mais elevadas de terapêutica anti-inflamatória, razão pela qual, neste contexto, estão a ser investigadas outras patologias, como a artrite reumatóide e a aterosclerose (Rizzo et al., 2013) (M. S. Muthu et al., 2014) (Jain et al., 2014).

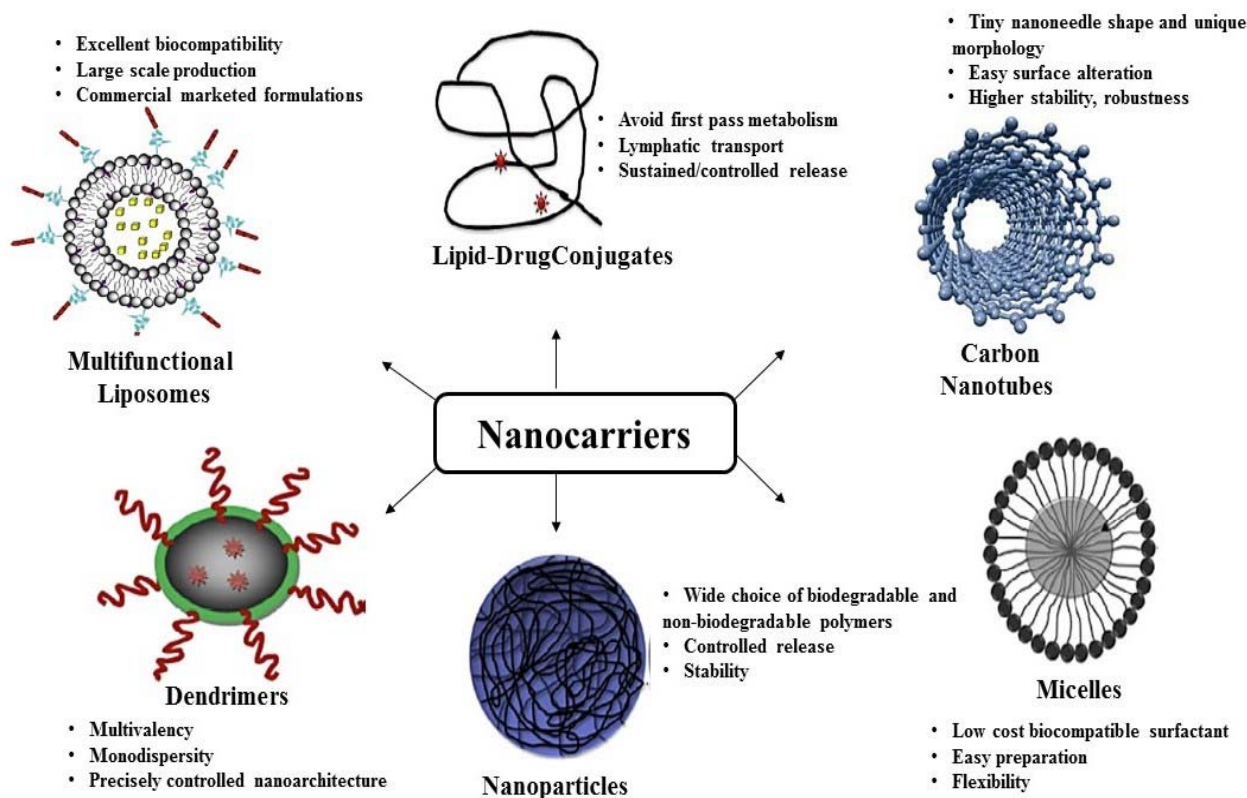


Figura 3 - Exemplos de nanoplataformas e algumas das suas principais vantagens como veículos de sistemas de distribuição de fármacos. Fonte: (Jain et al., 2014)

No âmbito da intervenção terapêutica com recurso à nanomedicina, foram desenvolvidas ao longo dos anos um conjunto de nanoplataformas, ou nanotransportadores, de crucial relevância para uma nova geração de sistemas de distribuição de fármacos e que serão particularmente caracterizados de seguida. (Rizzo et al., 2013) (M. S. Muthu et al., 2014) (Jain et al., 2014).

### 2.2.1.1. CONJUGADOS FÁRMACO-POLÍMERO

Os conjugados fármaco-polímero são preparados através de interações covalentes mediadas por um vasto conjunto de reacções químicas que dependem, em primeira instância, dos grupos funcionais presentes, do fármaco e do veículo polimérico. No contexto da

investigação científica, os polímeros utilizados tanto podem ser de origem biológica como de origem sintética. O polímero utilizado com maior sucesso na obtenção de conjugados fármaco-polímero no âmbito de *theranostic* é o N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (HPMA) (Allmeroth et al., 2013) (Kopeček & Kopečková, 2010) (Borgman et al., 2008). Os métodos tradicionais, quer por conjugação química quer por co-polimerização, que visam dotar os co-polímeros de HPMA de funcionalidade, através da capacidade de incorporar simultaneamente agentes de contraste em imagiologia e agentes de actividade terapêutica. Os co-polímeros de HPMA adequam-se à investigação no âmbito de *theranostic* devido à sua estabilidade, à e biocompatibilidade, e ao facto de não terem efeitos adversos associados à sua aplicação, existindo inúmeros estudos que consubstanciam a sua aplicabilidade nomeadamente em patologias do foro oncológico (Allmeroth et al., 2013) (Kopeček & Kopečková, 2010) (Borgman et al., 2008).



Figura 4 - Representação esquemática de um conjugado fármaco-polímero, onde além da incorporação de um agente terapêutico se verifica a presença de um agente de diagnóstico e de um ligando. Fonte: (M. S. Muthu et al., 2014)

### **2.2.1.2. NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS**

As nanopartículas obtidas a partir de polímeros biodegradáveis, têm sido alvo de extensa investigação com propósitos terapêuticos. A utilização destes polímeros deve-se à sua capacidade de prolongar o tempo de circulação, ao limitar o reconhecimento de formulações por macrófagos (M. S. Muthu et al., 2014) (Soppimath, Aminabhavi, Kulkarni, & Rudzinski, 2001). Os polímeros biodegradáveis são utilizados na preparação de nanopartículas tendo em vista a obtenção de biocompatibilidade e de uma menor citotoxicidade. Esta abordagem mostrou-se vantajosa relativamente à utilização tanto de lipossomas como de micelas devido à sua capacidade de armazenamento (M. S. Muthu et al., 2014) (Soppimath et al., 2001).

No âmbito de *theranostic*, as nanopartículas poliméricas são utilizadas para o direccionamento e co-distribuição dos agentes, terapêutico e de diagnóstico, devido à sua biocompatibilidade, capacidade de armazenamento, protecção dos agentes de terapêutica e diagnóstico incorporados, e ainda pela sua capacidade de libertar o agente de forma controlada (M. S. Muthu et al., 2014) (Soppimath et al., 2001).

O Poli(D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA) e o Poli(D,L-láctico-co-glicólico)-Polietilenoglicol (PLA-PEG), são os dois polímeros mais associados à construção de nanopartículas poliméricas no contexto de *theranostic*, atendendo ao facto de serem facilmente hidrolisados nos seus monómeros, ácido láctico e ácido glicólico, o que consequentemente facilita a sua eliminação do organismo. Estes nanoveículos são obtidos através da polimerização dos seus monómeros ou através da dispersão de polímeros, por meio da nanoprecipitação ou recorrendo a métodos de evaporação de solventes (M. S. Muthu et al., 2014) (Soppimath et al., 2001).

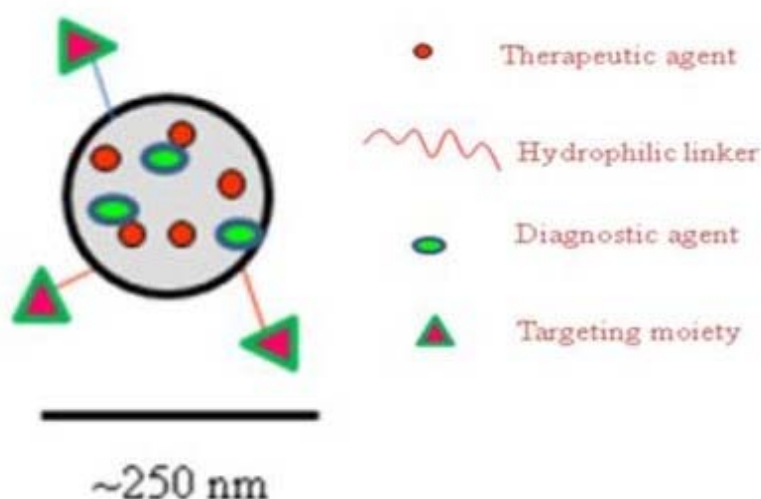


Figura 5 - Representação esquemática de uma nanopartícula polimérica conjugada fármaco-polímero, onde se verifica a incorporação de um agente terapêutico, de um agente de diagnóstico e de um ligando. Fonte: (M. S. Muthu et al., 2014)

Tal como se verifica em outras nanoplataformas, a investigação de nanopartículas poliméricas como veículos de sistemas de distribuição de fármacos em *theranostic* está direccionada para patologias do foro oncológico, tendo sido obtidos resultados significativos

ao nível da detecção de tumores, bem como da inibição do crescimento tumoral (M. S. Muthu et al., 2014) (Soppimath et al., 2001).

### **2.2.1.3. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS**

As nanopartículas magnéticas com maior relevância em sistemas de distribuição selectiva de fármacos são as partículas de óxido de ferro superparamagnético, vulgarmente designados na literatura por SPIONs, e são obtidas a partir de minerais como a magnetite, ou a hematite. Estes nanoveículos apresentam biocompatibilidade e dependendo da sua dimensão, podem apresentar propriedades de superparamagnetismo, o que incentivou a sua investigação e aplicação na bioseparação, na hipertermia, como agentes de contraste na ressonância magnética., e ainda como plataformas em sistemas de distribuição selectiva de fármacos (Tietze et al., 2015) (Unterweger et al., 2014) (Tietze et al., 2013).

Como agentes de contraste em ressonância magnética, a utilização de SPIONs é particularmente útil na detecção de nodos linfáticos, onde se verifica uma melhoria dos resultados obtidos relativamente aos agentes de contraste tradicionais. No âmbito de theranostic, estas nanopartículas actuam fundamentalmente na terapêutica oncológica, podendo actuar sozinhas ou incorporadas no interior de outras nanoplataformas, como acontece no caso das nanopartículas poliméricas e dos lipossomas. Estes nanoveículos podem ainda ser utilizados como agentes de hipertermia em diversas patologias, verificando-se também a sua aplicação como plataformas theranostic em patologias auto-imunes (Tietze et al., 2015) (Unterweger et al., 2014) (Tietze et al., 2013). Estas nanopartículas apresentam uma elevada área superficial em relação ao seu volume, mostrando uma tendência para se aglomerarem com o objectivo de reduzir a sua energia superficial. De forma a evitar esta ocorrência, torna-se necessário recorrer a agentes estabilizadores, sob a forma de moléculas poliméricas. Entre os polímeros mais utilizados no revestimento e estabilização de SPIONs estão o polietilenoglicol, e o dextrano. Decorrente deste processo, verifica-se que tanto os SPIONs, como as moléculas poliméricas utilizadas na sua estabilização, têm a capacidade de induzir repulsão e de contrariar a atracção magnética entre partículas através de um efeito estérico e, ou de um efeito electroestático. No entanto, verifica-se que o processo de estabilização destas nanoplataformas não é confiável quando se promove a incorporação de

ligandos, constatando-se a obtenção de um revestimento mais estável quando este é exclusivamente constituído por moléculas poliméricas. A estabilização de SPIONs pode realizar-se *in-situ* e através de técnicas de co-polimerização, na presença de agentes poliméricos de complexação da superfície (Tietze et al., 2015) (Unterweger et al., 2014) (Tietze et al., 2013).

O estudo de SPIONs como plataformas de sistemas de distribuição de fármacos no contexto de theranostic, assume-se como uma das mais promissoras abordagens terapêuticas para patologias do foro oncológico. Comparativamente com os sistemas de distribuição de fármacos tradicionais, esta abordagem permite uma menor acumulação da formulação em tecido saudável, diminuindo a ocorrência de efeitos adversos sistémicos e promove uma maior acumulação no alvo terapêutico específico e da qual resulta uma ampliação do efeito terapêutico (Tietze et al., 2015) (Unterweger et al., 2014) (Tietze et al., 2013).

#### **2.2.1.4. NANOPARTÍCULAS DE LÍPIDOS SÓLIDOS**

As nanopartículas de lípidos sólidos são constituídas por uma matriz coloidal, cujo núcleo sólido e hidrofóbico pode conter um fármaco nele disperso ou dissolvido. Estas nanoplataformas assumem-se como uma alternativa segura e efectiva às emulsões tradicionais, aos lipossomas, e às nanopartículas poliméricas para a distribuição intravascular. As nanopartículas de lípidos sólidos são obtidas a partir de lípidos biocompatíveis, como por exemplo os triglicéridos, que permanecem no estado sólido à temperatura ambiente. Tipicamente, estes nanoveículos são preparados através de um processo de homogeneização, tanto a quente, como a frio (M. S. Muthu et al., 2014) (Wissing, Kayser, & Müller, 2004) (Mäder & Mehnert, 2001).

As nanopartículas de lípidos sólidos ganham facilmente acesso ao compartimento sanguíneo devido às suas pequenas dimensões e à sua superfície lipofílica. Ao apresentarem dimensões inferiores a 100 nm, possuem uma área superficial suficientemente extensa para interagir com receptores ao nível do alvo terapêutico, verificando-se a capacidade destas nanoplataformas em atravessar pequenas células endoteliais e a barreira hemato-encefálica (BHE), permitindo que a terapêutica possa ser direccionada ao cérebro. Ao permitirem uma

incorporação de fármacos com elevada eficiência, promovem a estabilidade do fármaco na matriz coloidal, o que oferece a possibilidade do fármaco ser libertado de forma controlada, podendo o seu processo de libertação durar, inclusivamente, várias semanas (M. S. Muthu et al., 2014) (Wissing et al., 2004) (Mäder & Mehnert, 2001).

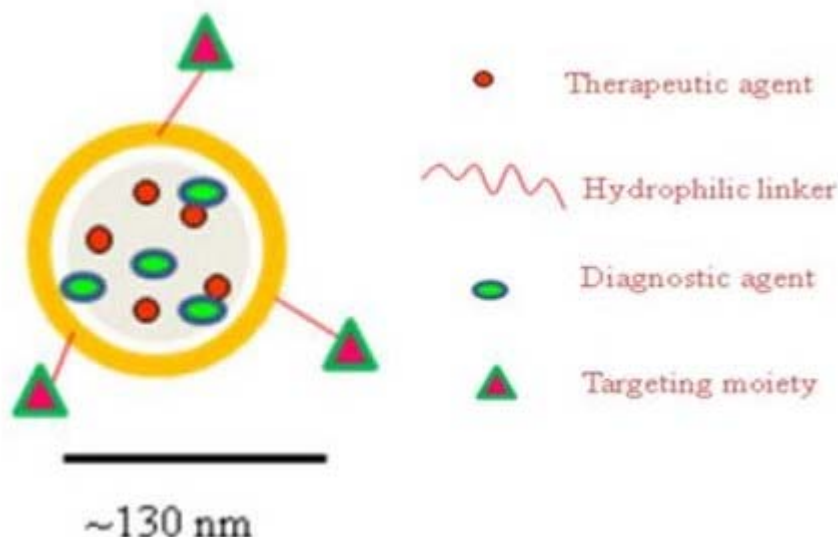


Figura 6 - Representação esquemática de uma nanopartícula de lípidos sólidos, onde se verifica a incorporação de um agente terapêutico, de um agente de diagnóstico e de um ligando. Fonte: (M. S. Muthu et al., 2014)

Estes nanoveículos têm sido investigados em patologias do foro oncológico, demonstrando viabilidade enquanto plataformas de sistemas de distribuição selectiva de fármacos no contexto de theranostic, permitindo uma incorporação simultânea de agentes de contraste em imagiologia e de agentes com actividade terapêutica, tendo-se verificado efectividade no processo distribuição, e uma elevada acumulação das formulações a nível tumoral (M. S. Muthu et al., 2014) (Wissing et al., 2004) (Mäder & Mehnert, 2001).

#### **2.2.1.5. DENDRÍMEROS**

Com dimensões entre os 10 e os 100 nm, os dendrímeros são nanoplataformas de conformação globular, sintetizados a partir de polímeros ramificados de origem sintética. Entre as suas propriedades, assumem especial destaque a presença de grupos funcionais

variáveis, uma área de superfície suficientemente extensa para permitir uma boa interação com receptores localizados nos tecidos alvo, e a existência de cavidades interiores de grandes dimensões (Jain et al., 2014) (Gillies & Fréchet, 2005) (Tomalia & Fréchet, 2005).

Os dendrímeros são sintetizados através da adição repetida de unidades ramificadas ao seu núcleo amina, podendo ser sintetizados de forma divergente, isto é, do seu núcleo central para a periferia, ou de forma oposta, a partir de uma síntese convergente, evoluindo a síntese da periferia para o centro. A estrutura básica de um dendrímero é a ramificação repetida em torno do seu núcleo amina resultando num padrão geométrico quase perfeito em três dimensões (Gillies & Fréchet, 2005) (Tomalia & Fréchet, 2005) (M. Liu & Fréchet, 1999).

Ao controlar o grau de polimerização, os dendrímeros podem ser sintetizados com diferentes dimensões, pesos moleculares e composições químicas. Os dendrímeros de gerações superiores tendem a assumir uma forma esférica, possuindo um vasto número de cavidades e ramificações que permite a incorporação de um agente terapêutico e um agente de diagnóstico de forma a serem aplicados no âmbito de theranostic. Para este efeito, são normalmente eleitos os dendrímeros de 5<sup>a</sup> geração, que ao serem mais hidrófobos, conferem uma maior estabilidade ao fármaco (M. S. Muthu et al., 2014) (Jain et al., 2014) (Gillies & Fréchet, 2005).

As desvantagens decorrentes da sua aplicação prendem-se com o facto de ter sido reportada uma tendência para libertar a terapêutica de forma precoce, conduzindo a uma menor acumulação ao nível do alvo terapêutico, a um aumento da probabilidade de ocorrência de efeitos secundários, e ainda a ruptura de membranas celulares devido à carga positiva na sua superfície, sendo esta última uma manifestação de toxicidade que deve ser considerada (M. S. Muthu et al., 2014) (Jain et al., 2014) (Gillies & Fréchet, 2005).

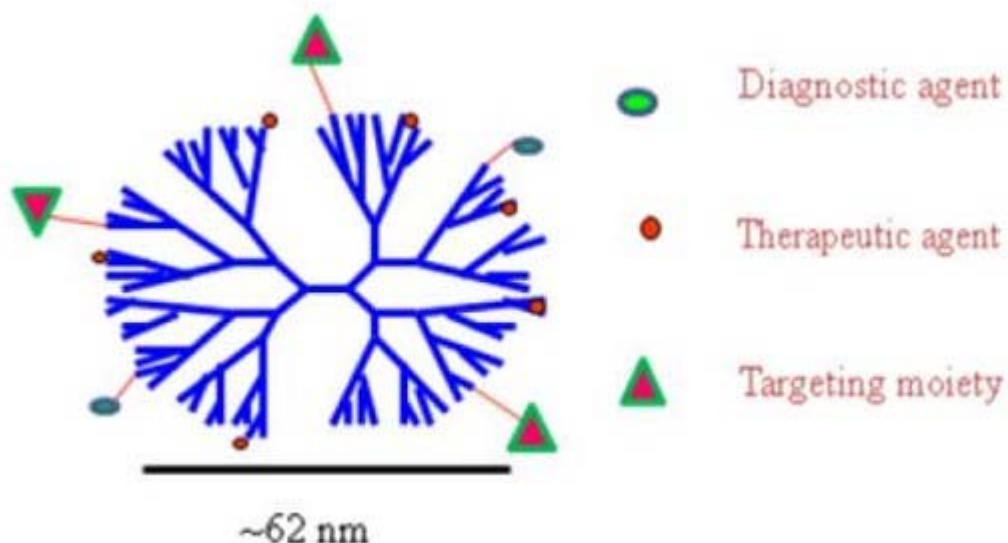


Figura 7 - Representação esquemática de um dendrímero, onde se verifica a incorporação de um agente terapêutico, de um agente de diagnóstico e de um ligando. Fonte: (M. S. Muthu et al., 2014)

Estas nanoplateformas têm demonstrado um enorme potencial na distribuição selectiva de fármacos no âmbito de *theranostic*, com efeito, além de permitirem a incorporação de fármacos nas suas cavidades interiores, os dendrímeros podem ser usados na incorporação de agentes de contraste em imagiologia, e promovendo de forma intrínseca o direccionamento selectivo de formulações para tumores. A sua sensibilidade ao pH e a possibilidade de emissão de fluorescência, adequam estes nanoveículos aos sistemas de *theranostic* mais avançados, que requerem a utilização de estímulos externos para serem activados e libertarem a terapêutica (M. S. Muthu et al., 2014) (Jain et al., 2014).

#### 2.2.1.6. LIPOSSOMAS

Os lipossomas são pequenas vesículas esféricas constituídas por uma dupla camada fosfolipídica, que envolve um compartimento aquoso que se forma espontaneamente. O processo de síntese de lipossomas pode recorrer a fosfolípidos anfipáticos e ao colesterol, e a processos como a dispersão mecânica, dispersão com solvente, ou a remoção através de um detergente. Com dimensões entre os 80 e os 300 nm, estes nanoveículos possuem uma extensa superfície para a interacção com receptores ao nível do alvo terapêutico (M. S. Muthu,

Kulkarni, Raju, & Feng, 2012) (M. S. Muthu, Kulkarni, Xiong, & Feng, 2011) (Leung & Romanowski, 2011).

Devido à sua dimensão, biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade, os lipossomas têm sido amplamente investigados como veículos de sistemas de distribuição selectiva de fármacos no âmbito de *theranostic*. Assim, estas nanoplataformas têm sido utilizadas com o intuito de aumentar a solubilidade, de melhorar parâmetros farmacocinéticos, de aumentar o índice terapêutico de fármaco, e ainda de reduzir a ocorrência de efeitos secundários. Entre as desvantagens decorrentes da sua utilização estão a sua fraca estabilidade, a sua baixa efectividade na incorporação de fármacos, e ainda as variações entre lotes registadas ao nível da produção (M. S. Muthu et al., 2012) (M. S. Muthu et al., 2011) (Leung & Romanowski, 2011).

Tal como acontece com a generalidade das nanoplataformas, também os lipossomas necessitam de alterações na sua superfície para que se tornem funcionais. Tendo o objectivo de aumentar a estabilidade do nanoveículo e aumentar o seu tempo de circulação, é frequente o revestimento de lipossomas com polímeros, como o PEG. Além do revestimento, os lipossomas podem ainda possuir ligandos na superfície de forma a dotar a formulação de selectividade para receptores localizados no alvo terapêutico (M. S. Muthu et al., 2012) (M. S. Muthu et al., 2011) (Leung & Romanowski, 2011).

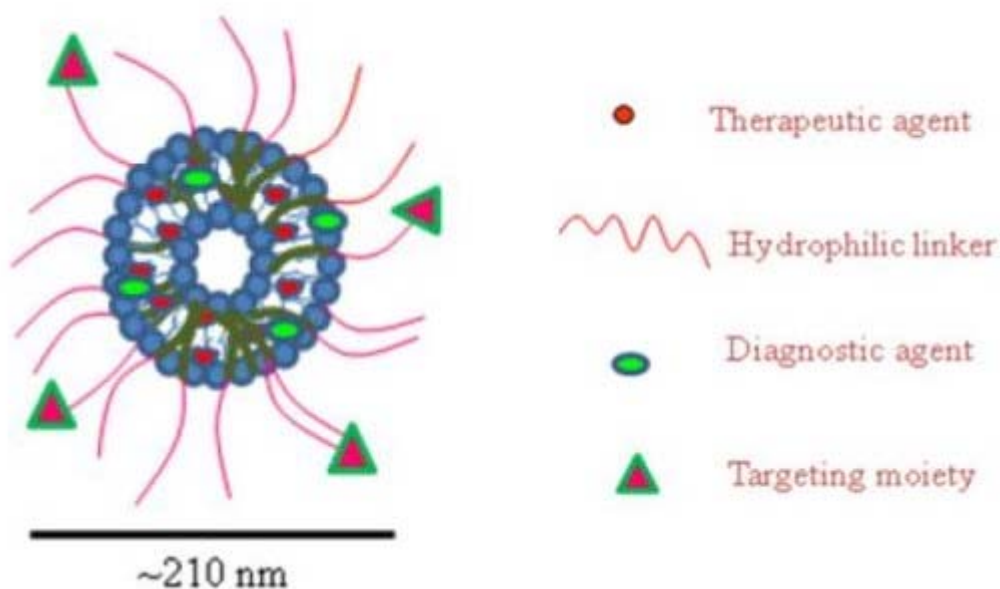


Figura 8 - Representação esquemática de um lipossoma com revestimento polimérico, onde se verifica a incorporação de um agente terapêutico, de um agente de diagnóstico e de um ligando. Fonte: (M. S. Muthu et al., 2014)

Entre as nanoplateformas, os lipossomas foram os mais investigados pela comunidade científica ao longo dos anos, com um maior enfoque nas patologias do foro oncológico, onde se verificou a sua viabilidade como veículos de sistemas *theranostic* capazes de veicular em simultâneo agentes de contraste em imagiologia e agentes terapêuticos, promovendo uma efectiva distribuição e acumulação da terapêutica ao nível das células tumorais. Além da sua aplicação em patologias oncológicas, devido à sua multifuncionalidade, tem vindo a testar-se a aplicação destes nanoveículos numa grande diversidade de patologias, como por as infecciosas, em que através do direccionamento passivo da terapêutica, se tornam alvos para o rápido processo fagocítico levado a cabo pelos macrófagos (M. S. Muthu et al., 2012) (M. S. Muthu et al., 2011) (Leung & Romanowski, 2011).

#### **2.2.1.7. MICELAS**

As micelas são estruturas globulares, coloidais com um núcleo hidrofóbico, e uma superfície hidrofílica. Estas nanoplateformas apresentam dimensões inferiores aos 100 nm, verificando-se que constituem uma alternativa segura para a administração parentérica de compostos pouco solúveis em água. A estabilidade destes nanoveículos depende de fortes forças de coesão entre o fármaco e o núcleo do polímero. As micelas são normalmente obtidas através de dissolução directa em solventes orgânicos (M. S. Muthu et al., 2014) (MAHMUD, XIONG, & LAVASANIFAR, 2008) (Lukyanov, Gao, & Torchilin, 2003).

Os agentes com actividade terapêutica, ou de diagnóstico podem ser incorporados no núcleo hidrofóbico das micelas, sendo o ligando incorporado na camada superficial hidrofílica, para posterior administração intravenosa. Em alguns estudos onde se aplicaram micelas como plataformas de sistemas de distribuição selectiva de fármacos, verificou-se uma libertação precoce de fármaco, sem que este tivesse alcançado o alvo terapêutico (M. S. Muthu et al., 2014) (Lukyanov et al., 2003) (Kataoka, Harada, & Nagasaki, 2001).

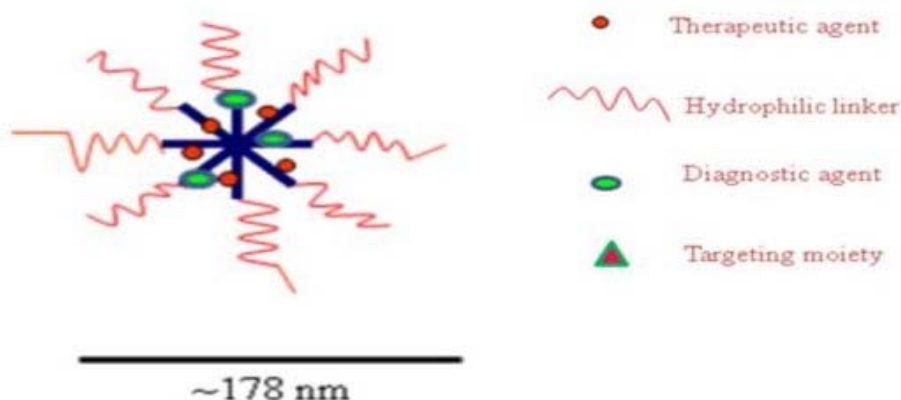


Figura 9 - Representação esquemática de uma micela com revestimento polimérico, onde se verifica a incorporação de um agente terapêutico, de um agente de diagnóstico e de um ligando. Fonte: (M. S. Muthu et al., 2014)

As micelas utilizadas na investigação no âmbito de *theranostic* apresentam dimensões inferiores aos 50 nm, evitam o sistema reticular endotelial o que permite um aumento da permeabilidade celular ao nível do endotélio tumoral. Estes nanoveículos são plataformas eficientes na distribuição selectiva de terapêutica anticancerígena, tendo sido avaliadas como seguras em ensaios clínicos em que incorporam derivados do taxol (M. S. Muthu et al., 2014) (Zhao, Mi, & Feng, 2013) (Lee et al., 2013).

Atendendo à sua estabilidade, fácil preparação, encapsulamento hidrofóbico e ao sucesso alcançado tanto em ensaios pré-clínicos, como em ensaios clínicos, as micelas assumem-se como plataformas emergentes de grande potencial em sistemas de distribuição selectiva de fármacos no âmbito de *theranostic* (M. S. Muthu et al., 2014) (MAHMUD et al., 2008).

#### 2.2.1.8. NANOPARTÍCULAS DE OURO

As nanopartículas de ouro, frequentemente descritas na literatura como GNP's, são plataformas constituídas por núcleos de ouro e dotadas de grande versatilidade e polivalência, o que as torna um valioso recurso na construção de formulações para *theranostic*. Estas nanoplataformas possuem núcleos de ouro com dimensões entre 1,5 e os 10 nm, proporcionando uma extensa superfície para a incorporação de fármacos e de ligandos. As

nanopartículas de ouro são normalmente obtidas através do tratamento químico com ácido cloroáurico (Kumar, Zhang, & Liang, 2013) (W.-H. Chen et al., 2013) (Heo et al., 2012).

Estes nanomateriais podem incorporar fármacos e ligandos na sua superfície, assumindo-se como potenciais veículos de sistemas theranostic capazes de promover uma distribuição selectiva de fármacos num determinado alvo terapêutico. Nestes nanoveículos, a ligação da componente terapêutica pode ocorrer através de uma interacção não covalente, como é o caso das interacções electrostáticas, ou com recurso a conjugação química covalente, em que é tido em conta a afinidade intrínseca das nanopartículas de ouro para determinadas células (Kumar et al., 2013) (W.-H. Chen et al., 2013) (Heo et al., 2012).

Adicionalmente, estudos relativos à aplicação de nanopartículas de ouro têm consubstanciado um efeito um efeito citotóxico sobre células tumorais, o que adequa a sua utilização em patologias do foro oncológico. Num estudo em que se utilizou um modelo animal, usaram-se nanopartículas de ouro nas quais se incorporou doxorrubicina através de um substrato peptídico, que é especificamente clivado por uma protease tumoral. Após injeção da formulação em ratinhos portadores de tumor, verificou-se que a sobreexpressão de protease no tecido tumoral promoveu uma rápida libertação de doxorrubicina por parte da nanoplataforma, tendo-se obtido de forma simultânea, imagens decorrentes da fluorescência e uma eficaz inibição do crescimento tumoral (Kumar et al., 2013) (W.-H. Chen et al., 2013) (Heo et al., 2012).

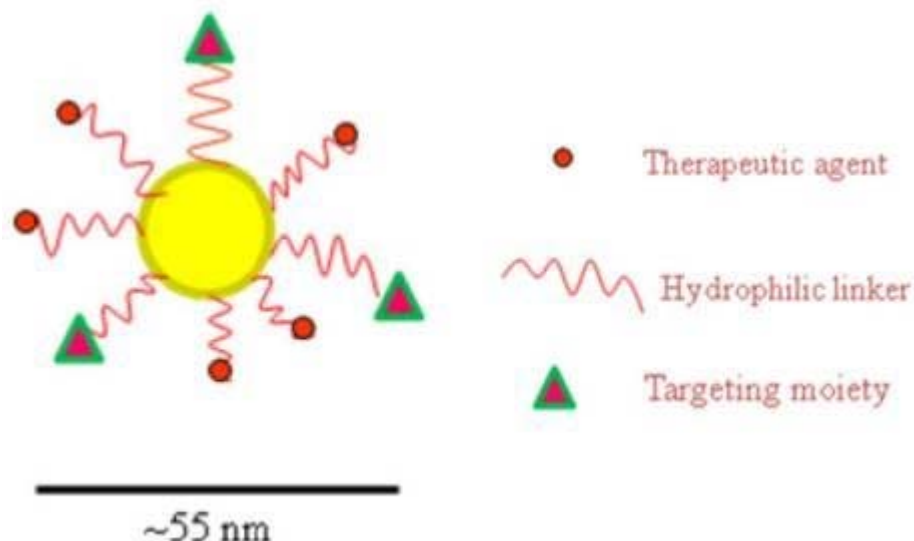


Figura 10 - Representação esquemática de uma nanopartícula de ouro com revestimento polimérico, onde se verifica a incorporação de um agente terapêutico e de um ligando. Fonte: (M. S. Muthu et al., 2014)

Além do potencial impacto da aplicação de nanopartículas de ouro como plataformas *theranostic* em patologias do foro oncológico, a aplicação destes nanoveículos em sistemas *theranostic* activáveis através de estímulos externos, nomeadamente quando sujeitas a radiação luminosa, tem sido recentemente investigada em diversas patologias gerando muita expectativa em torno delas (Kumar et al., 2013) (W.-H. Chen et al., 2013) (Heo et al., 2012).

#### 2.2.1.9. NANOTUBOS DE CARBONO

Os nanotubos de carbono, vulgarmente designados na literatura como CNT's do inglês *Carbon Nanotubes*, constituem uma das mais recentes inovações de desenvolvimento de nanoplataformas no âmbito da nanomedicina. Estes nanomateriais são constituídos por finas camadas de grafite, nos quais os anéis benzénicos altamente condensados se enrolam e assumem uma conformação tubular. No que à classificação de CNT's diz respeito, estes são então classificados consoante o número de camadas de grafite que os constituem, podendo ser constituídos por uma única camada (SWCNT's), por uma camada dupla (DWCNT's), tripla (TWCNT's) ou por múltiplas camadas (MWCNT's) (Jain et al., 2014) (Boncel, Müller, Skepper, Walczak, & Koziol, 2011) (Z. Liu, Robinson, Tabakman, Yang, & Dai, 2011).

Desde que estes nanomateriais foram descobertos, têm surgido inúmeras tentativas de proceder à sua aplicação em sistemas de distribuição selectiva de fármacos. Uma das técnicas utilizadas para a obtenção nanoveículos funcionais, passa pela alteração da sua superfície de forma a impedir interacções com componentes do organismo, o que prolonga o seu tempo de circulação. Quando modificados para esta finalidade, os nanotubos de carbono incorporam o fármaco no seu interior, permitindo uma libertação controlada do mesmo. Estas nanoplataformas têm a capacidade de promover a distribuição de fármacos insolúveis em água, como são os casos dos derivados do taxol, o paclitaxel e o docetaxel, gerando por isso grande expectativa relativamente ao impacto da sua aplicação em patologias do foro oncológico. O processo de libertação de um fármaco a partir deste nanoveículo pode ocorrer através de um estímulo como o pH, a indução de calor, ou decorrente de acção enzimática. Adicionalmente, estes nanomateriais têm demonstrado a sua capacidade para ultrapassar a inúmeras barreiras fisiológicas incluindo a membrana plasmática, permitindo a libertação de fármaco ao nível do citoplasma (Jain et al., 2014) (Boncel et al., 2011)(Z. Liu et al., 2011).

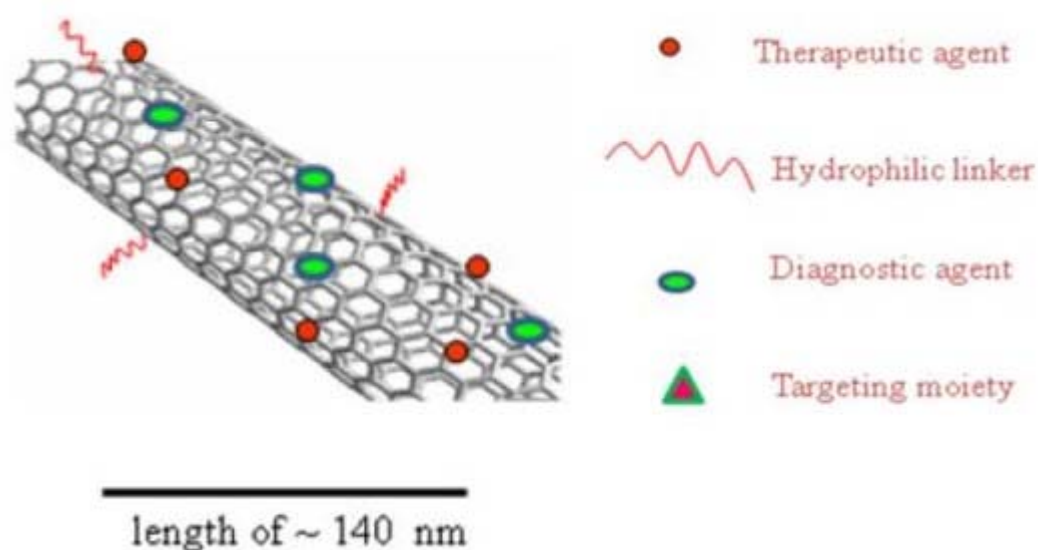


Figura 11 - Representação esquemática de um nanotubo de carbono, onde se verifica a incorporação de um agente terapêutico, de um agente de diagnóstico e de um ligando. Fonte: (M. S. Muthu et al., 2014)

Capazes de promover um efectivo transporte de genes e de ácidos nucleicos, no âmbito de *theranostic*, a investigação destes nanoveículos remete para a incorporação simultânea de agentes de contraste em imagiologia e de agentes com actividade terapêutica.

Atendendo às suas características físico-químicas diferenciadoras e que se traduzem numa estrutura de grande estabilidade, estes nanomateriais assumem-se como sérios candidatos a diversas aplicações nas ciências biomédicas, e de forma especialmente relevante, no contexto de theranostic (Jain et al., 2014) (Boncel et al., 2011) (Z. Liu et al., 2011).

### **2.3. NANOMEDICINA DE DIAGNÓSTICO**

Considerado o impacto das formulações desenvolvidas pela nanomedicina na terapêutica e atendendo à sua capacidade de, ora de forma activa, ora de forma passiva, seleccionarem o alvo terapêutico, também a aplicação destas formulações no âmbito da imagiologia apresenta um grande potencial. A sua utilização neste campo de acção específico tem sido positivamente reveladora, tanto a nível pré-clínico, como no próprio contexto clínico (Clemente-Casares & Santamaria, 2014) (Cohen & Shoushan, 2013) (Mura & Couvreur, 2012). Incorporando um conjunto de técnicas e de processos, normalmente não invasivos, que visam a obtenção de imagens do corpo humano para fins clínicos, ou científicos, as técnicas actualmente utilizadas em imagiologia, com relevância para as formulações oriundas da nanomedicina, incluem a imagiologia óptica, a ressonância magnética (RM), a tomografia computadorizada (CT), a tomografia por emissão de positrões (PET), a tomografia por emissão de fóton único (SPECT), e ainda a ultra-sonografia (US) (Clemente-Casares & Santamaria, 2014) (Cohen & Shoushan, 2013) (Mura & Couvreur, 2012).

A combinação entre as nanoplataformas disponíveis com os diversos agentes de contraste utilizados em imagiologia, dos quais se destacam os iões metálicos paramagnéticos, as nanopartículas de óxido de ferro superparamagnético (SPIONs), e as sondas infravermelho próximo (NIR), promoveu o desenvolvimento de plataformas plurivalentes que podem contribuir significativamente, tanto para a detecção, como para o diagnóstico de patologias (Mura & Couvreur, 2012).

Neste contexto, verifica-se que a aplicação de nanoplataformas como agentes de contraste conduz a uma razão sinal-ruído mais elevada no tecido alvo, comparativamente com a razão obtida num tecido saudável circundante, o que se traduz numa diminuição significativa do efeito do ruído no tecido circundante e saudável, na detecção do sinal no tecido alvo. Verifica-se também que a aplicação destes nanoagentes de contraste provocam um aumento da resolução da imagem, o que permite a visualização e detecção de pequenas

lesões, que com a utilização de metodologias mais tradicionais permaneceriam indetectáveis (Xie et al., 2010) (Mody, Nounou, & Bikram, 2009).

No que diz respeito à aplicação em contexto pré-clínico, a incorporação de agentes de contraste em nanoplataformas tem demonstrado ser extremamente vantajosa ao permitir um aprofundamento do conhecimento acerca das propriedades, bem como o próprio potencial da formulação desenvolvida. Neste sentido, a utilização da imagiologia não invasiva pode fornecer informação acerca da circulação de formulações, ao aclarar os mecanismos que promovem a sua acumulação no alvo terapêutico, e ainda através do acompanhamento de formulações fora do alvo terapêutico o que permite a monitorização da eficácia terapêutica. Esta utilização combinada permite ainda que as várias técnicas utilizadas em imagiologia possam obter mais informação acerca da fisiopatologia e do tratamento da doença (Rizzo et al., 2013).

Quando esta abordagem é utilizada num contexto clínico, verifica-se que a sua aplicabilidade é muito limitada. Esta situação deve-se ao facto dos critérios farmacocinéticos e de eliminação aplicados a agentes de diagnóstico administrados por via intravenosa serem muito rigorosos, o que impede a utilização da grande generalidade das formulações em nanodiagnóstico, cuja aplicação ainda se resume a modelos animais, estando a sua investigação numa fase precoce (Rizzo et al., 2013).

### **2.3.1. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA**

Entre as várias modalidades utilizadas em imagiologia, a ressonância magnética apresenta-se como uma técnica de diagnóstico médico não invasiva, capaz de produzir informação fisiológica e anatómica, não necessitando da utilização de radiação ionizante. A sua versatilidade torna-a inclusivamente, em muitas das suas aplicações, o método mais sensível disponível para a caracterização de tecidos moles, sendo por isso e também neste âmbito, a técnica de imagiologia mais investigada (Z. Chen, 2012) (Mody et al., 2009). A ressonância magnética é extremamente utilizada na imagiologia do cérebro e do sistema nervoso central, na avaliação da função cardíaca, ou ainda na detecção de tecidos anormais, como é manifestamente o caso dos tumores. No entanto, constata-se que em várias ocasiões a diferença das imagens proporcionadas por ressonância magnética de tecidos normais e anormais não é suficientemente grande, resultando na necessidade de aplicar agentes de

contraste de modo a aumentar a qualidade da imagem obtida, bem como a sua resolução e sensibilidade (Z. Chen, 2012) (Mody et al., 2009).

Os iões metálicos paramagnéticos, de entre os quais se destaca particularmente o gadolínio ( $Gd^{3+}$ ), têm sido apresentados como agentes de contraste para ressonância magnética de enorme potencial. O desenvolvimento de agentes de contraste tem como objectivo a obtenção de estruturas estáveis e menos tóxicas, onde e por essa razão, os iões metálicos paramagnéticos são ligados a compostos orgânicos, originando quelatos. Os casos de maior sucesso são os do Gd(III)-DTPA, no qual o gadolínio (III) está ligado ao ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA), e o Gd(III)-DOTA, no qual o gadolínio está ligado ao ácido tetraazaciclododecanotetraacético (DOTA), comercialmente designados, respectivamente, por Omniscan e ProHance (Z. Chen, 2012).

Entre as nanoformulações que são utilizadas em contexto clínico e cuja monitorização é realizada através de ressonância magnética, assumem maior relevância o *Gadomer 17* e o *Resovist*. Estas formulações permitem a monitorização da perfusão em vasos sanguíneos tumorais e em artérias coronárias, e ainda a visualização primária, ou metastática, de lesões hepáticas. Tendo estes, como os dois exemplos de maior sucesso, foram posteriormente realizados estudos clínicos utilizando nanopartículas de óxido de ferro que mimetizam a acção de *Resovist*, como o *Endorem* e o *Sinerem*, na monitorização de células estaminais nervosas, em metástases do nodo linfático, na injeccção intranodal de vacinas e ainda na actividade dos macrófagos na aterosclerose. Actualmente, decorrem vários estudos que contemplam formulações de nanodiagnóstico e a sua aplicação num conjunto vasto de patologias, e cujos resultados são aguardados com grande expectativa (Rizzo et al., 2013) (Mody et al., 2009).

As técnicas e métodos utilizados actualmente na imagiologia, permitem a possibilidade de acompanhar a biodistribuição das nanoplataformas, determinar o seu mecanismo de acção e, especialmente, monitorizar a progressão de determinada patologia em tempo real. No entanto, e na sua generalidade, as nanoplataformas que se constituem como, ou incorporam agentes de contraste, não apresentam habitualmente actividade terapêutica, sendo o diagnóstico o seu único propósito (Mura & Couvreur, 2012).

## **2.4. NANOTERAPÊUTICA: O APARECIMENTO DA NANOFARMACOLOGIA**

Assinalando a revolução tecnológica imposta pelo progresso científico recente no âmbito da nanotecnologia e da nanomedicina, e independentemente do debate inerente à própria introdução da nanotecnologia na indústria da saúde, verifica-se que esta área pluridisciplinar veio originar novos campos de acção, sendo um exemplo especialmente pertinente, a nanofarmacologia (Stylianopoulos & Jain, 2015) (Jain et al., 2014) (M. Muthu & Feng, 2010).

Aportam à nanofarmacologia todas as etapas necessárias ao desenvolvimento de um protocolo terapêutico começando, desde logo, pela descoberta de novos fármacos, de novos veículos terapêuticos, assim como o processo de selecção de fármacos tendo em vista a maximização do seu índice terapêutico, aumentando a eficácia terapêutica e diminuindo a toxicidade alcançada pela distribuição selectiva de um principio activo. Auxiliada por nanoplataformas e tendo como objectivo a ampliação da efectividade terapêutica, cabe à nanofarmacologia o conhecimento e o escrutínio das variáveis subjacentes à efectividade terapêutica, nomeadamente, o mecanismo de acção do fármaco, o veículo utilizado e, ou o percurso realizado no organismo até ao alvo terapêutico, bem como os processos de distribuição e eliminação do fármaco (Stylianopoulos & Jain, 2015) (Jain et al., 2014) (M. Muthu & Feng, 2010).

Genericamente, e quando comparadas com as opções terapêuticas de baixo peso molecular tradicionais, as formulações geradas pela nanofarmacologia apresentam um conjunto de vantagens em vários aspectos diferentes, no que à sua utilização em contexto clínico diz respeito. Ao permitirem uma redução da excreção renal e ou da metabolização hepática, promovem um aumento do tempo de circulação do fármaco no organismo. Ao actuarem sobre parâmetros farmacocinéticos, nomeadamente sobre o volume de distribuição, provocando a sua redução, diminuem a acumulação de fármaco em tecidos saudáveis. Por outro lado, as opções da nanoterapêutica aumentam a capacidade de acumulação do fármaco num determinado alvo terapêutico (Stylianopoulos & Jain, 2015) (Rizzo et al., 2013) (M. Muthu & Feng, 2010).

Adicionalmente, e com especial relevo nas patologias do foro oncológico, as opções da nanoterapêutica podem incorporar agentes quimioterapêuticos de baixo peso molecular, auxiliando-os a ultrapassar diversas barreiras fisiológicas, tipificadas na Tabela 1, e

promovendo uma distribuição eficiente do fármaco no alvo tumoral, melhorando assim o próprio índice terapêutico dos fármacos utilizados (Stylianopoulos & Jain, 2015) (Rizzo et al., 2013) (M. Muthu & Feng, 2010).

Tabela 1 - Factores limitantes à distribuição de fármacos em tumores. Fonte:(Rizzo et al., 2013)

<b>Barreiras à distribuição de fármacos em tumores</b>			
<b>Barreiras Químicas</b>	<b>Barreiras Anatômicas</b>	<b>Barreiras Fisiológicas</b>	<b>Barreiras Clínicas</b>
Baixa Solubilidade	Endotélio Vascular	Excreção Renal	Baixa eficácia
Baixa Estabilidade	Espaço Perivascular	Metabolização Hepática	Elevada toxicidade
Baixo Peso Molecular	Membrana celular	Tumor de elevada densidade celular	Necessidade de hospitalização
Elevado Volume de Distribuição	Membrana nuclear	Elevada pressão de fluido intersticial	Administração frequente
Interacção de cargas	Barreira Hematoencefálica	Bombas de efluxo de fármacos	Efectividade de baixo custo

Com o propósito de promover o desenvolvimento de formulações farmacêuticas biocompatíveis, terapeuticamente eficazes e não tóxicas, a investigação científica tem-se focado no desenvolvimento de nanoplataformas, conforme abordado nos sub-capítulos anteriores (Stylianopoulos & Jain, 2015)(Jain et al., 2014) (Crielaard, Lammers, Schiffelers, & Storm, 2012).

Ao longo dos anos, o *design* de formulações em nanofarmacologia dirigiu-se sobretudo para a distribuição selectiva de fármacos em tumores, estando a sua acção dependente do EPR para mediar passivamente a selectividade do fármaco. No entanto, nos últimos anos tem-se registado uma tendência para aplicar as opções nanoterapêuticas em patologias não oncológicas e das quais se destacam a artrite reumatóide e a aterosclerose, ao constatar-se o potencial da incorporação de agentes anti-inflamatórios potentes, como os corticóides, em nanoplataformas (Stylianopoulos & Jain, 2015)(Crielaard et al., 2012)(X.-M. Liu, Miller, & Wang, 2010).

A demanda por melhores intervenções terapêuticas conduziu não só ao aparecimento de nanoformulações, conforme ilustrado na Tabela 2, como a um aumento progressivo da investigação farmacológica da nanotecnologia, estando o sucesso da nanofarmacologia

dependente da descoberta de formulações que possam simultaneamente ultrapassar barreiras fisiológicas e promover uma distribuição controlada de fármacos. Desta forma, perspectiva-se o contínuo aparecimento de nanoformulações que possam de forma concomitante monitorizar e manipular a biologia humana de forma controlada, tendo como propósito o tratamento de patologias (Jain et al., 2014) (M. Muthu & Feng, 2010).

Tabela 2 - Estado actual da nanofarmacologia. Fonte: (Jain et al., 2014)

<b>Estado actual da terapêutica oriunda da nanofarmacologia</b>					
<b>Nome Comercial</b>	<b>Fármaco</b>	<b>Nanoplataforma</b>	<b>Via de Administração</b>	<b>Aplicação Farmacológica</b>	<b>Estado Actual</b>
Abraxane	Paclitaxel	Nanopartículas ligadas à Albumina	Intravenosa	Cancro da mama metastático	Mercado
Myocet	Doxorubicina	Lipossoma	Intravenosa	Cancro da mama metastático	Mercado
Caelyx	Doxorubicina	PEG-Lipossoma	Intravenosa	Cancro dos ovários e cancro metastático da mama; Sarcoma de Kaposi	Mercado
DaunoXome	Daunorubicina	Lipossoma	Intramuscular	Sarcoma de Kaposi	Mercado
Ambisome	Anfotericina B	Lipossoma	Intravenosa	Infecções Fúngicas	Mercado
Genexol-PM	Paclitaxel	Dendrímeros	Intravenosa	Cancro da mama e do pulmão	Ensaio Clínico Fase II
L-Annamycacin	Annamicina	Lipossoma	Intravenosa	Crianças com leucemia linfocítica refractária ou leucemia mielóide aguda	Ensaio Clínico Fase II
Docetaxel-PNPs	Docetaxel	Nanopartículas Poliméricas	Intravenosa	Tumores sólidos em estágio avançado	Ensaio Clínico Fase I

A especificidade das nanoplataformas para o alvo terapêutico é o aspecto de maior relevância em nanofarmacologia, e pode ser obtida tanto através activação do fármaco no alvo terapêutico específico como dotando a formulação com a capacidade de localizar selectivamente o alvo terapêutico. O próximo desafio imposto à nanofarmacologia passa pela estimulação programável do sistema imunitário, permitindo a obtenção de soluções

terapêuticas de rápida acção e possibilitando a regeneração de tecidos (Jain et al., 2014) (M. Muthu & Feng, 2010).

#### **2.4.1. LIMITAÇÕES EM NANOFARMACOLOGIA**

Com a crescente investigação e desenvolvimento da nanotecnologia promovendo a utilização de nanoplataformas num contexto clínico, constata-se um aumento da exposição de humanos a estas aplicações. Estes nanomateriais podem entrar em contacto com o humano através de vários processos, como por exemplo a absorção cutânea, a inalação, a injeção ou ainda a ingestão, o que implica a necessidade de um efectivo controlo de qualidade, assim como uma avaliação efectiva dos riscos inerentes aos nanomateriais envolvidos. Surgindo como uma consequência natural, e de forma a responder a esta questão, a nanotoxicidade procura avaliar tanto a segurança como os potenciais riscos das aplicações que envolvem nanomateriais, que tal como a avaliação farmacológica, limitou a introdução em contexto clínico de várias nanoformulações propostas (Stylianopoulos & Jain, 2015) (Jain et al., 2014) (M. Muthu & Feng, 2010).

Comparativamente com partículas de maiores dimensões e idênticas propriedades físicas e químicas, o facto de terem uma maior área de superfície dota os nanomateriais de uma maior efectividade. Não obstante o progresso recente, no âmbito da nanotecnologia oferecer potenciais benefícios em várias áreas, inclusivamente em sistemas de distribuição de fármacos, a avaliação da segurança e o controlo de qualidade de nanomateriais assumem-se como parâmetros críticos a ter em conta no que à saúde humana e à própria protecção ambiental dizem respeito (Stylianopoulos & Jain, 2015) (Jain et al., 2014) (M. Muthu & Feng, 2010).

A inalação de nanoplataformas, por exemplo, pode resultar numa ampla disseminação e deposição do nanomaterial envolvido, mediado por difusão, ao longo de todo o tracto respiratório. Tratando-se de partículas de reduzidas dimensões, estas podem entrar na circulação sistémica e alcançar facilmente órgãos de crítica sensibilidade, como são os casos do cérebro, do coração, do baço ou ainda dos nodos linfáticos, carecendo, para já, de evidência científica acerca das potenciais consequências para o organismo deste tipo de ocorrência. (Stylianopoulos & Jain, 2015) (Jain et al., 2014) (M. Muthu & Feng, 2010) .

Um outro exemplo, estudos recentes apontam os nanotubos de carbono como causa de inflamação e de fibrose no caso de alcançarem os pulmões. Num estudo onde foi utilizado o rato como modelo animal, foram administradas formas de nanotubos de carbono com diferentes graus de pureza. Após examinação histopatológica dos pulmões dos modelos utilizados ao vigésimo primeiro dia do estudo, constataram-se diferentes contagens celulares, diferentes valores de actividade enzimática, nomeadamente da desidrogenase do lactato, assim como um aumento do número de neutrófilos no sangue (Jain et al., 2014).

A divulgação e análise destes resultados enfatiza a necessidade de uma investigação científica sistemática apostada na utilização de modelos toxicológicos, *in vitro* e *in vivo*, de modo a facultar uma extensa e detalhada investigação acerca das interacções entre nanomateriais e sistemas vivos, com o propósito de permitir a avaliação tanto da eficácia, como da toxicidade dos nanomateriais estudados. Ao pretender o desenvolvimento com segurança de uma medicina com recurso à nanotecnologia, revela-se necessário identificar e ponderar os prováveis efeitos adversos associados às nanoplataformas. Nesse sentido, importa não só a obtenção de evidência científica, como o tratamento e compilação de dados que esta gera acerca das relações entre a estrutura, a dimensão, a efectividade e a toxicidade de nanoplataformas (Jain et al., 2014). Ao garantir a sua segurança e a sua eficácia, a inclusão de nanomateriais em intervenções terapêuticas será potenciada. Desta forma, o destino das formulações oriundas da nanomedicina está absolutamente dependente da biocompatibilidade e da imunocompatibilidade dos nanomateriais, devendo ser, para as entidades reguladoras, uma prioridade vital a inexistência de toxicidade associada à sua aplicação de uma forma geral (Jain et al., 2014).

## **2.5. NANOTHERANOSTIC**

Em sùmula, e de forma a fazer face à rápida proliferação de patologias severas, como é o caso das doenças oncológicas, infecciosas, cardíacas e auto-imunes, assume-se como uma prioridade essencial a aposta na elaboração de melhores estratégias terapêuticas e de diagnóstico, com o propósito de facultar a detecção e o tratamento da patologia, especialmente quando esta ainda se encontra numa fase precoce. Tendo essa prioridade como absoluta, avanços significativos nas áreas da nanotecnologia e das ciências biomédicas permitiram a convergência destas duas disciplinas, o que resultou numa abordagem mais

complexa na construção de nanoplataformas dotando-as de multifuncionalidade, ou seja, combinando a selecção do alvo e a terapêutica localizada com o diagnóstico. Desta forma, o progresso científico conduziu à fusão da terapêutica com o diagnóstico numa mesma entidade, caminhando assim ao encontro da premissa de *theranostic* (Kojima et al., 2015) (Fan, Fu, Yu, & Ray, 2014) (M. S. Muthu et al., 2014).

O aparecimento de nanoplataformas *theranostic*, frequentemente apelidadas no seio da comunidade científica de partículas *theranostic*, ou *nanotheranostic*, assume-se como uma alternativa à administração individualizada de agentes de contraste e diagnóstico, e a de agentes com actividade farmacológica, ao permitir uma distribuição única e harmoniosa de ambos (Kojima et al., 2015) (Fan et al., 2014) (M. S. Muthu et al., 2014).

As técnicas de imagiologia acessíveis na actualidade, permitem a execução de estudos longitudinais, ao longo de um determinado período de tempo, que visam a monitorização de alterações no tecido alvo promovidas pela estratégia terapêutica aplicada, possibilitando a recolha e o processamento de dados precisos e detalhados relativos à progressão da patologia, assim como uma avaliação da intervenção realizada numa fase precoce (Kojima et al., 2015) (Fan et al., 2014) (M. S. Muthu et al., 2014).

Uma importante vantagem das formulações *nanotheranostic* sobre as da nanoterapêutica reside no facto da possibilidade de monitorizar as primeiras, no que à sua biodistribuição, e à sua acumulação no alvo terapêutico diz respeito. Esta vantagem aplica-se tanto em contexto pré-clínico como clinicamente, já que podem ser igualmente aplicáveis em modelos animais como em humanos (Rizzo et al., 2013) (Mura & Couvreur, 2012).

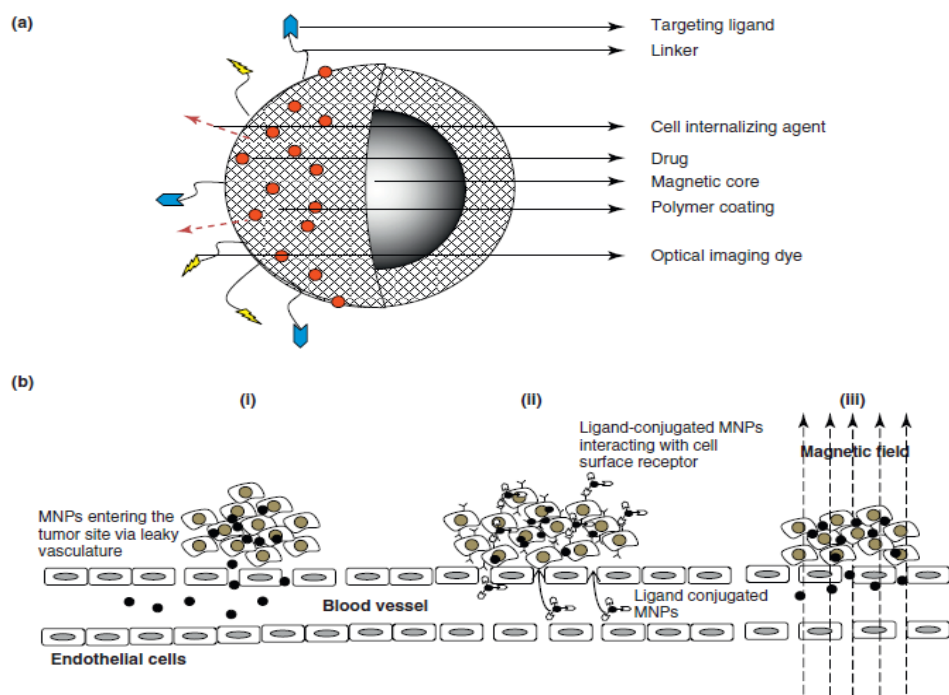


Figura 12 - Em (a) está representada, de forma esquemática, um exemplo de uma formulação theranostic. Esta é então constituída internamente por um nanoveículo, neste caso um SPION, e a sua superfície polivalente pode ser composta por um revestimento polimérico, o qual são incorpora o fármaco, o ligando, o agente de contraste, e um agente promotor da captação celular. Em (b) encontra-se esquematizado o processo de distribuição selectiva da formulação theranostic para um alvo tumoral através de diferentes processos. Em (I) a distribuição é mediada passivamente pelo Efeito de Permeabilidade e Retenção aumentado. Em (II) a distribuição selectiva da formulação é mediada activamente para o alvo tumoral pela incorporação de um ligando específico. Em (III) o processo de distribuição selectiva acontece na sequência da aplicação de um estímulo externo, neste caso concreto, resulta da aplicação de um campo magnético. Fonte: (Singh & Sahoo, 2014)

A abordagem em *nanotheranostic*, combinando de forma racional a imagiologia não invasiva à distribuição selectiva de fármacos a um alvo terapêutico, prevê uma pré-selecção dos pacientes, conforme representado pelo esquema da Figura 13. Numa primeira etapa do processo de selecção, apenas os indivíduos que demonstram níveis médios, ou elevados, de acumulação no alvo terapêutico podem ser seleccionados para o tratamento com a nanoformulação em questão, enquanto que pacientes que demonstrem níveis baixos, ou inexistentes de acumulação no alvo terapêutico podem ser direccionados para outros tratamentos. Numa segunda etapa, utilizam-se técnicas de imagiologia não invasiva para monitorizar a eficácia terapêutica, identificando os pacientes que respondem melhor à intervenção terapêutica (Rizzo et al., 2013) (Mura & Couvreur, 2012). Embora represente do ponto de vista económico e do volume de trabalho, um maior investimento, este tipo de

abordagem em *theranostic* facilita a realização de ensaios clínicos em que as patologias se encontram em fase precoce e envolvem a utilização da nanoterapêutica (Rizzo et al., 2013)(Mura & Couvreur, 2012).

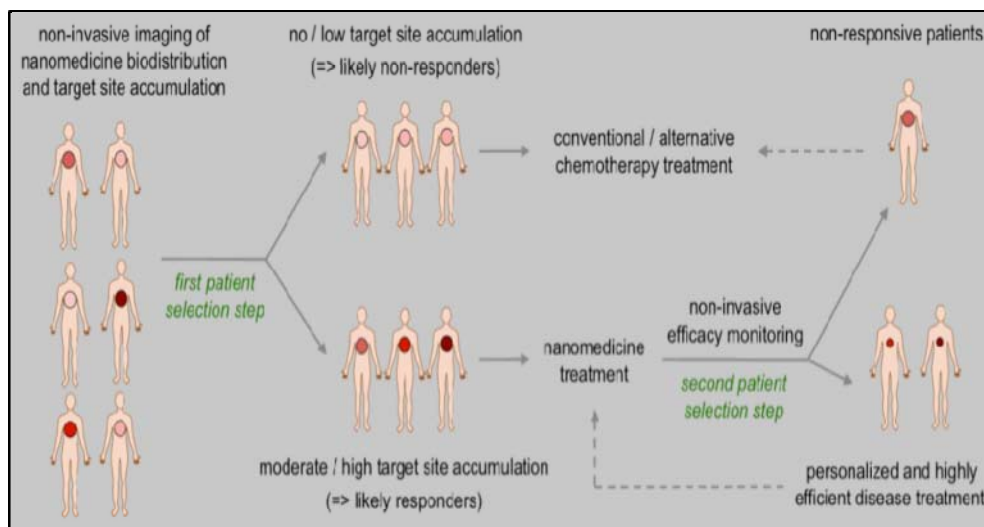


Figura 13 - Diagrama esquemático demonstrativo do processo de seleção de indivíduos para ensaios clínicos preconizado pela abordagem *theranostic*. Fonte: (Rizzo et al., 2013)

Este tipo de estratégia pode ter um contributo extremamente útil, ao assegurar que apenas os indivíduos que respondem positivamente à terapêutica terão possibilidade de participar no ensaio clínico, e nas eventuais análises relativas à eficácia terapêutica. Por outro lado, a informação gerada pela imagiologia permite a exclusão de indivíduos onde se verifica a acumulação de fármaco fora do alvo terapêutico, como por exemplo em casos de comorbilidades associadas, reduzindo assim o risco de ocorrência e, ou intensidade de potenciais efeitos adversos (Rizzo et al., 2013) (Mura & Couvreur, 2012).

Ao combinar de forma eficiente e harmoniosa um agente de contraste com um agente farmacologicamente activo numa única formulação, dotando a nanopartícula *theranostic* de um extenso grau de versatilidade, gera-se uma entidade capaz de oferecer um importante contributo no desenvolvimento e optimização de intervenções e protocolos terapêuticos de carácter individualizado, colocando a prática de uma medicina personalizada no horizonte (M. S. Muthu et al., 2014) (Mura & Couvreur, 2012).

Na sua grande generalidade, as aplicações *nanotheranostic* investigadas têm apresentado resultados interessantes e promissores em estudos *in vitro*, sendo ainda necessário ultrapassar algumas barreiras para que a sua aplicação *in vivo* em contexto clínico possa ser uma realidade. O crescente número de artigos publicados no *PubMed* ao longo da última década e no âmbito de *theranostic*, sendo já mais de 400, vem reforçar o interesse que esta área inovadora vem suscitando na comunidade científica, sendo que a maioria das publicações refere a preparação e a caracterização das propriedades físicas e químicas das formulações *theranostic*. Ocasionalmente, são acompanhadas por estudos *in vitro*, verificando-se na grande generalidade a ausência da prova de conceito *in vivo*. Por outro lado, em vários estudos *in vivo*, a investigação da combinação das funcionalidades terapêutica e de diagnóstico têm sido preteridas por estudos onde estas funcionalidades são investigadas separadamente, o que não só impossibilita a extrapolação dos resultados obtidos como impede que estes possam ser considerados sistemas *theranostic* reais (Mura & Couvreur, 2012). Apesar do aumento progressivo que se tem registado ao longo dos últimos anos, actualmente, as publicações que remetem para a aplicação *in vivo* das formulações *theranostic* representam cerca de 15% dos artigos publicados neste âmbito. Atendendo a esta circunstância, fica por demais evidente a necessidade de um aumento significativo da investigação *in vivo* para que a dimensão pré-clínica dos estudos possa ser ultrapassada e a aplicação clínica do conceito de *theranostic* se possa tornar realidade ao introduzir as formulações *nanotheranostic* em ensaios clínicos (Mura & Couvreur, 2012).

## Capítulo

### 3. APLICAÇÕES DE THERANOSTIC

Ao serem concebidas para a investigação não invasiva de patologias durante o decurso do seu tratamento, as formulações *theranostic* afirmam-se como um instrumento da personalização da prática clínica repercutindo as características específicas de uma patologia em cada paciente. Ao monitorizarem a acumulação de fármaco no alvo terapêutico, proporcionam a realização de uma triagem com o propósito de seleccionar apenas os indivíduos que apresentam uma maior probabilidade de responderem positivamente a uma terapêutica sendo, então, escolhidos os pacientes em que se verifica uma elevada acumulação da nanoformulação no alvo. Ao detectar a acumulação da nanoformulação em tecidos saudáveis e, portanto, fora do alvo terapêutico, torna também possível a avaliação do risco associado ao desenvolvimento de efeitos adversos (Ryu et al., 2014) (Lim, Jang, Lee, Haam, & Huh, 2013).

O carácter ambivalente destas formulações, resultante da pela junção de um agente de contraste em imagiologia e de um agente com actividade farmacológica numa mesma entidade, permite a introdução de intervenções terapêuticas ajustadas às necessidades de cada indivíduo em contexto clínico. Desenvolvidas nos últimos anos no sentido de caminhar para a prática de uma medicina personalizada e recorrendo, nomeadamente, à farmacogenómica e à farmacoproteómica, têm sido implementadas estratégias que permitem a individualização da terapêutica. Estas estratégias em voga, alicerçadas no contributo dado pelos perfis genético e molecular de cada indivíduo, procuram identificar os biomarcadores passíveis de afectar a evolução da patologia, e ainda a resposta do indivíduo ao tratamento (Mura & Couvreur, 2012).

Ao permitir o acompanhamento da intervenção terapêutica em tempo real prevendo, e avaliando, a sua efectividade, a abordagem em *theranostic* permite também a fundamentação de eventuais insucessos deste modelo de distribuição de fármacos em determinadas patologias (Dianzani et al., 2014) (Lim et al., 2013) (P. S. Kim, Djazayeri, & Zeineldin, 2011).

Com um maior destaque para as patologias do foro oncológico, e sendo esse ainda hoje o principal foco de investigação neste âmbito, a aplicação de formulações *theranostic* é igualmente equacionada para um conjunto de patologias particularmente severas, e das quais se destacam as doenças infecciosas, as doenças cardiovasculares, e as doenças e auto-imunes. (Ryu et al., 2014) (Lim et al., 2013) (Mura & Couvreur, 2012).

### **3.1. THERANOSTIC NA DOENÇA ONCOLÓGICA**

No final da década de 70 do passado século e devido ao elevado número de mortes associado, surgiram as primeiras iniciativas de índole científica relativas à aplicação de nanoplateformas em patologias oncológicas, nomeadamente, utilizando o polialquilcianoacrilato como veículo. É desde então que a nanotecnologia se associa à investigação científica, com o objectivo de criar nanoplateformas capazes de promover a distribuição de um fármaco a um tumor, com maior exactidão, e numa concentração capaz de desenvolver uma acção terapêutica durante um longo período de tempo (Lim et al., 2013).

É precisamente na área oncológica, onde a combinação das variáveis terapêutica e diagnóstico gera maior expectativa no que ao desenvolvimento de protocolos assentes numa medicina personalizada diz respeito. Apesar da ausência da prova de conceito relativa à eficácia de várias nanoformulações e do ainda largo percurso até à sua introdução em ensaios clínicos, a implementação de intervenções com base no conceito de theranostics permitiriam tanto o diagnóstico, como o tratamento da patologia em fase precoce, prevendo a efectividade da terapêutica assim como o desfecho do tratamento. Ao conseguir melhorar a gestão da doença, será possível fazer face às diferenças entre indivíduos, e à própria heterogeneidade que caracteriza este tipo de patologia (Ryu et al., 2014) (Mura & Couvreur, 2012) (Janib, Moses, & MacKay, 2010).

A forte aposta na investigação deste tipo de formulação deve-se fundamentalmente às características das nanoplateformas, cujas dimensões entre os 10-100 nm, são semelhantes às das macromoléculas biológicas, nomeadamente, das proteínas e do DNA. As nanoplateformas podem ser produzidas industrialmente, garantindo os requisitos necessários, como a exactidão da dimensão, a forma, a carga na sua superfície, a sua estabilidade, ou outras características necessárias à sua aplicação *in vivo*. Como descrito anteriormente, de forma a ampliar a sua funcionalidade, foram adicionalmente desenvolvidos um conjunto de processos e de técnicas, com o propósito de permitir uma selectividade activa na distribuição de fármacos, através de modificações da superfície do nanoveículo ao introduzir moléculas capazes de reconhecer o alvo terapêutico (Lim et al., 2013).

Para que se obtenha um tratamento anticancerígeno efectivo, torna-se imperativa uma eficiente penetração do fármaco no alvo terapêutico. Nesse sentido, além de ponderar os

aspectos fisiológicos dos tumores, importa também considerar a utilização de nanoplateformas que permitam uma melhor penetração do fármaco no tecido tumoral, e da qual seja resultante uma melhoria do índice terapêutico. De forma suplementar, têm sido descobertos inúmeros biomarcadores expressos especificamente pelas células tumorais, que não só aprofundaram o conhecimento nesta área, como resultaram no direcionamento selectivo da terapêutica para o tumor (Maruyama, 2011) (Torchilin, 2011) (Fang, Nakamura, & Maeda, 2011).

Do ponto de vista vascular, uma patologia oncológica é tipicamente caracterizada por uma fraca organização, assim como uma baixa densidade de vasos sanguíneos em redor de um tumor, verificando-se também a compressão tanto de vasos linfáticos, como de vasos sanguíneos por parte das células tumorais, causando uma corrente sanguínea irregular (Lim et al., 2013) (Maruyama, 2011) (Torchilin, 2011).

Quando comparados com tecidos saudáveis, os tumores podem apresentar taxas superiores de produção de marcadores e enzimas, que em conjunto conduzem a um aumento da permeabilidade dos vasos tumorais devido a uma rápida vascularização. Adicionalmente uma pequena, ou mesmo inexistente, drenagem linfática a nível tumoral, possibilita a acumulação, como a retenção de nanoplateformas, que devido ao elevado EPR, conseguem manter-se em circulação por longos períodos de tempo. Este efeito é, por isso, um mediador passivo da distribuição selectiva de fármacos a um alvo terapêutico (Lim et al., 2013) (Maruyama, 2011) (Torchilin, 2011).

### **3.1.1. REVESTIMENTO DE FORMULAÇÕES**

Os lipossomas foram as primeiras nanopartículas, com actividade terapêutica demonstrada no contexto oncológico a serem aprovadas pela FDA. Tendo sido o primeiro nanoveículo utilizado na distribuição de quimioterapia, os primeiros estudos indicaram a contribuição dos lipossomas para um aumento da eficiência terapêutica, de melhorias na biodistribuição e dos parâmetros farmacocinéticos da doxorrubicina. A cardiotoxicidade é um efeito adverso frequentemente associado à utilização deste fármaco, assumindo-se como um factor limitante da dose que pode ser administrada. Contudo, e ao encapsular a doxorrubicina

em lipossomas, observou-se não só, um aumento da acumulação deste fármaco em tumores, um aumento da actividade anti-tumoral, mas também uma diminuição da cardiotoxicidade associada à sua utilização. Assim, a doxorrubicina encapsulada por lipossomas demonstrou ser uma alternativa segura e eficiente na prática clínica, sendo utilizada no cancro dos ovários e no cancro da mama (M. Wang & Thanou, 2010). A esta formulação adicionou-se ainda o PEG, o qual aumenta a estabilidade coloidal e impede a captação do fármaco por parte do sistema retículo-endotelial, que se assume como uma importante barreira à circulação sistémica de nanoplateformas. Surgindo assim o fármaco que hoje conhecemos por Doxil. Além da possibilidade de ser adicionado a lipossomas, o PEG pode ser adicionado à superfície de várias nanoplateformas, formando uma típica camada protectora hidrofílica na sua superfície que impede fenómenos de agregação, e interações com os vários componentes sanguíneos. Através da utilização de PEG, registou-se também uma diminuição da captação de nanoplateformas por macrófagos e aumentou-se o seu tempo de circulação (M. Wang & Thanou, 2010).

A segunda nanoformulação aprovada pela FDA no âmbito da terapêutica oncológica foi um conjugado de albumina e paclitaxel. Com o propósito de ultrapassar a questão da insolubilidade do Taxol, e através da ligação do paclitaxel a nanopartículas de albumina de 130 nm, surgiu o fármaco Abraxane. A albumina é um veículo endógeno natural de moléculas hidrofóbicas, ligadas através de ligações não covalentes. Adicionalmente, a albumina liga-se ainda à osteonectina, uma glicoproteína produzida ao nível dos osteoblastos que promove a mineralização óssea, sendo também responsável pela secreção de um ácido proteico rico em cisteína que está presente em alguns tumores, como se verifica nos casos do cancro da mama, do pulmão e da próstata, razão pela qual se a albumina se acumula em tumores (M. Wang & Thanou, 2010).

Camadas de PEG são adicionadas a qualquer nanoplateforma que tenha o propósito de ser administrada por via intravenosa para posterior acumulação em tumores. Independentemente da nanoplateforma em questão ser um lipossoma, um dendrímero ou uma nanopartícula inorgânica, a adição de PEG visa o aumento do tempo de circulação inibindo a acumulação de opsoninas, proteínas que promovem a fagocitose, e a sua posterior captação por parte de macrófagos (Min et al., 2015) (Joh et al., 2013) (Dos Santos et al., 2007).

Apesar de não existir qualquer legislação acerca da organização ou do tipo de PEG a ser utilizado na superfície de nanoplateformas, surgem tendências de utilização deste

composto oriundas da extensa investigação de lipossomas no contexto oncológico. Assim, é possível verificar que tanto a dimensão, como a densidade do PEG na superfície de nanoplateformas assumem especial preponderância nos tempos de circulação, assim como na acumulação das nanoplateformas em tumores. Refer-se que as camadas de PEG que envolvem o nanoveículo podem ainda interferir com ligandos, utilizados para dotar a formulação de selectividade para o alvo terapêutico, impedindo a sua interacção com o respectivo receptor (Min et al., 2015) (Joh et al., 2013) (Dos Santos et al., 2007).

No caso particular dos lipossomas, o efeito da camada protectora de PEG depende da dimensão da sua cadeia e da densidade da sua superfície. Importa referir que apesar da adição de PEG a um lipossoma melhorar a eficiência da distribuição até ao alvo tumoral, este método pode comprometer tanto a ligação, como a captação por parte das células tumorais (M. Wang & Thanou, 2010) (Vonarbourg, Passirani, Saulnier, & Benoit, 2006). Uma maior cobertura da superfície dos lipossomas é conseguida pela utilização de PEG e conjugados lipídicos de maiores densidades, existindo no caso dos lipossomas, um valor percentual molar máximo que pode ser incorporado à formulação sem que a distribuição sistémica seja comprometida. Caso a densidade do PEG não seja suficientemente elevada, existe o risco de este se dissociar (M. Wang & Thanou, 2010) (Dos Santos et al., 2007) (Otsuka, Nagasaki, & Kataoka, 2003).

Ao serem incorporados na superfície de lipossomas, as cadeias de PEG apresentam uma dimensão Flory ( $R_f$ ), uma medida de viscosidade que avalia o volume molecular que o polímero assume em solução, e que é aplicada em polímeros flexíveis e de cadeia linear. Quanto maior a dimensão da cadeia de PEG, maior será o valor do seu  $R_f$ . No entanto, alguns estudos indicam que a densidade de PEG na superfície do lipossoma assume maior importância que a dimensão da cadeia polimérica (M. Wang & Thanou, 2010). Ao aumentar o valor lipídico de PEG, consegue-se aumentar a densidade PEG na formulação, diminuindo a distância entre cada molécula de PEG na superfície da nanopartícula. Quando o valor da distância entre moléculas é superior ao do  $R_f$ , as cadeias de PEG tendem a organizar-se aleatoriamente em forma de espiral, com uma nuvem semelhante a um cogumelo, conforme ilustrado na Figura 14. Quando o valor da distância entre moléculas é inferior ao do  $R_f$ , a pressão lateral exercida pela sobrelotação das nuvens de PEG em forma de cogumelo, força a extensão dos polímeros afastando-os da superfície da nanoplateforma, verificando-se o aparecimento de conformações que tendem para uma maior linearidade, assumindo tipicamente, a nuvem de PEG, a forma de escova. A configuração de PEG em forma de

escova permite um aumento do tempo de circulação da nanoplataforma, já que causa maior repulsão proteica ao nível da interacção com as proteínas plasmáticas (M. Wang & Thanou, 2010).

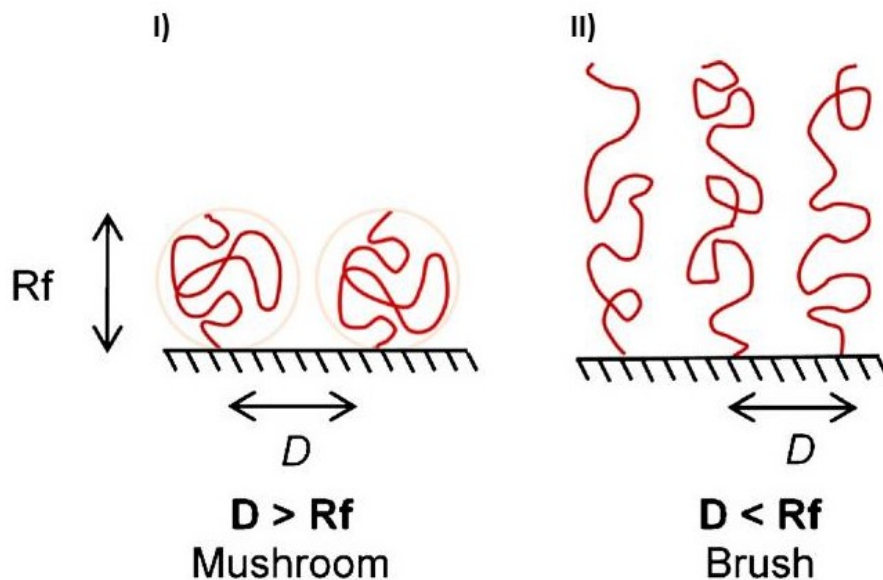


Figura 14 -Representação das diferentes conformações de PEG. Em I) está representada a organização das moléculas de PEG em forma de cogumelo, onde se verifica que a distância entre moléculas é maior que o valor de Rf. Em II), está ilustrada a organização das moléculas de PEG em escova, constatando-se que o valor de Rf é superior à distância entre moléculas. Fonte: (M. Wang & Thanou, 2010).

Um outro fenómeno a ter em consideração remete para a actividade de anticorpos anti-PEG. Alguns estudos indicam que este efeito pode ocorrer entre 2 e 4 dias após a primeira administração de lipossomas peguilados, e no qual é acelerada a clearance plasmática das administrações seguintes desta formulação. Não existem ainda dados relativos a outras nanoplataformas peguiladas que induzam a actividade de anticorpos anti-PEG, pelo que esta variável deve ser extensamente investigada no contexto pré-clínico do desenvolvimento de nanopartículas (M. Wang & Thanou, 2010) (X. Wang, Ishida, & Kiwada, 2007).

Contrastando com o caso dos lipossomas, as nanopartículas inorgânicas, e ainda que revestidas com uma camada biocompatível, tendem a originar estruturas com dimensões muito menores. São ainda desconhecidos os efeitos da incorporação de PEG, da sua dimensão, e da sua densidade na cinética das várias nanoplataformas, bem como no que á acumulação em tumores diz respeito. Apesar de se verificar um número considerável de

estudos relativos ao revestimento de lipossomas com PEG, o mesmo não é possível afirmar no que concerne às nanopartículas inorgânicas. Adicionalmente, o revestimento de dendrímeros e de polímeros biocompatíveis com PEG, afigura-se demasiado variável para serem observadas tendências na sua investigação, ainda que na sua maioria, o PEG é utilizado como co-polímero no caso das nanopartículas poliméricas, dando geralmente origem a uma micela (M. Wang & Thanou, 2010) (Gupta & Gupta, 2005) (Otsuka et al., 2003).

### **3.1.2. DIRECCIONAMENTO SELECTIVO DE FORMULAÇÕES PARA O ALVO TUMORAL ATRAVÉS DE LIGANDOS**

Uma outra forma de promover um efectivo direccionamento da nanoformulação para o alvo tumoral, passa pela incorporação de moléculas na superfície de nanoplataformas, que justamente ao alterarem a sua superfície, fomentam o seu reconhecimento por parte das células tumorais (Bertrand, Wu, Xu, Kamaly, & Farokhzad, 2014) (Lim et al., 2013) (Shmeeda, Tzemach, Mak, & Gabizon, 2009).

Sem a incorporação destas unidades de reconhecimento, as nanoformulações estão exclusivamente dependentes do seu revestimento, como abordado anteriormente, à base de polímeros como o PEG. O efeito de selectividade dos ligandos incorporados na superfície das formulações depende não só da própria natureza do ligando, como de um conjunto de variáveis que dependem de um enquadramento cooperativo, para realizarem um desempenho mais favorável (Bertrand et al., 2014) (Lim et al., 2013) (M. Wang & Thanou, 2010).

Um dos desafios a considerar no direccionamento selectivo para tumores, é o facto de células defeituosas terem frequentemente um elevado grau de semelhança com as células saudáveis vizinhas. De forma a ultrapassar este obstáculo, é necessário que o *design* de ligandos tenha em consideração a especificidade para receptores sobreexpressos em células tumorais, e que apresentem taxas de expressão normais, ou mínimas em células saudáveis. Assim, não só devem os ligandos possuir elevada afinidade para o receptor, como devem ainda induzir, de forma inata, a endocitose mediada pelo mesmo. Regra geral, os ligandos são incorporados na porção mais superficial da formulação, por cima da camada polimérica de revestimento. Entre o grupo de estruturas com capacidade já demonstrada na indução da distribuição selectiva de nanoformulações para células tumorais, encontram-se os anticorpos, fragmentos de anticorpos, aptámeros, polissacáridos como o ácido hialurónico, proteínas,

péptidos como a arginina, a glicina ou o aspartato, e algumas moléculas de pequenas dimensões como se verifica no caso dos folatos (Bertrand et al., 2014) (Lim et al., 2013) (M. Wang & Thanou, 2010).

Anticorpos com actividade contra o receptor da transferrina (TfR), contra o receptor antigénio específico da próstata (PSA) e ainda contra o HER-2, receptor sobreexpresso no cancro da mama, são exemplos de referência de receptores alvo devido à sua sobreexpressão nas células tumorais. Normalmente, é possível verificar interacções fortes entre estes anticorpos e os seus receptores correspondentes, como se pode verificar em baixo na

Figura 15, onde se aplicou uma nanoformulação constituída por um SPION, doxorrubicina e um anticorpo anti-Her, num ratinho portador de cancro da mama. (M. Wang & Thanou, 2010) (Tang et al., 2005) (J. W. Park et al., 2001)

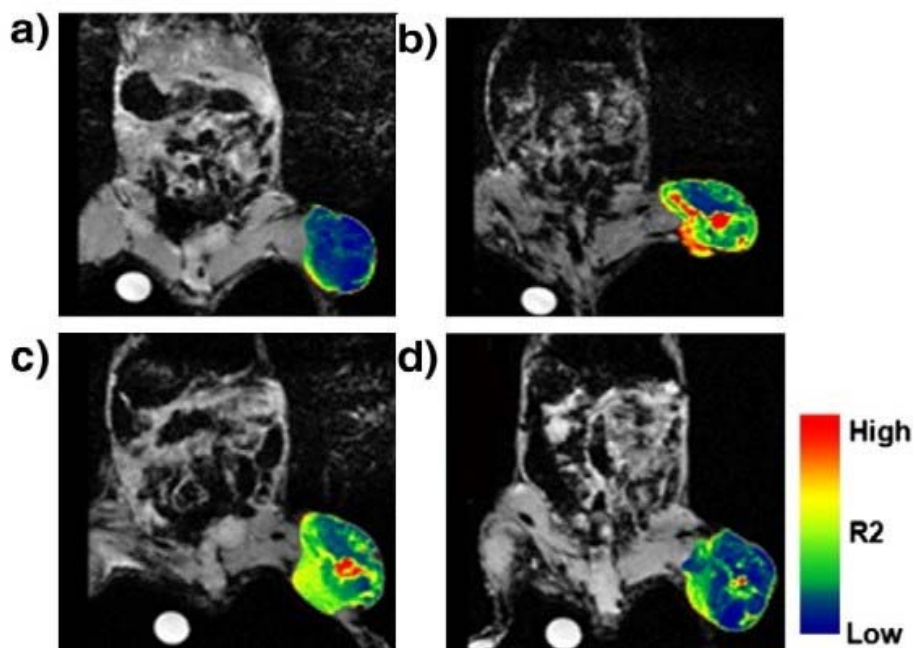


Figura 15 - Imagens de ressonância magnética na sequência da aplicação de uma nanoformulação constituída por Doxorrubicina, um SPION e um anticorpo anti-Her como ligando, a um ratinho portador de cancro da mama ao longo do tempo. Em (a) observa-se a imagem do tumor no momento anterior à injeção da formulação, 1 hora após a injeção (b), 4 horas após a injeção (c), e 12 horas após a injeção (d). R2, que representa a taxa do tempo de relaxamento ( $T_2$ ), e que é tanto maior quanto maior a interação com partículas magnéticas,

verificando-se por isso uma acumulação máxima da formulação 1 hora após a injeção, em (b). Fonte:(Mura & Couvreur, 2012)

Os fragmentos de anticorpos, denominados por fragmentos Fab por corresponderem precisamente à região variável do anticorpo que é responsável pela ligação ao antigénio, também têm sido investigados como possíveis ligandos selectivos. As vantagens da sua aplicação devem-se às suas menores dimensões e ao facto de não possuírem a região do anticorpo responsável pela indução de actividade biológica (Fc), como a imunogenicidade e a antigenicidade, em caso de contacto com a superfície das formulações (Bertrand et al., 2014) (M. Wang & Thanou, 2010) (Tang et al., 2005).

Tal como se constata nos casos dos anticorpos e dos fragmentos de anticorpos, também a utilização de proteínas como ligandos selectivos se deve à sua elevada afinidade para receptores alvo. No caso concreto do ligando natural do TfR, a proteína transferrina, a ligação ao seu receptor surge com elevada afinidade, assumindo-se como um factor importante para que a formulação tenha a capacidade de ultrapassar as barreiras sistémicas e alcançar o alvo tumoral. Entre os ligandos proteicos de maior relevância, destaca-se também a uroquinase (uPA), uma enzima que ao activar o plasminogénio e ao induzir a sua conversão em plasmina permite uma diminuição da formação de trombos. Estudos realizados demonstram a selectividade deste ligando proteico para receptores sobreexpressos nos cancros do colon e da mama (Lim et al., 2013)(M. Wang & Thanou, 2010).

Os péptidos apresentam-se como versões mais reduzidas dos anticorpos e dos ligandos proteicos. Estruturas peptídicas como a U11, que actua na região de ligação da uroquinase, têm sido utilizadas para dotar formulações de selectividade para células tumorais nos cancros da mama e da próstata. Entre os ligandos de menores dimensões, destaca-se o ácido fólico, o qual tem uma afinidade para receptores específicos e sobreexpressos nas células tumorais no cancro dos ovários, e ainda a anisamida, um ligando com afinidade para os receptores sigma, sobreexpressos nas células tumorais no cancro do pulmão (Lim et al., 2013) (M. Wang & Thanou, 2010) (Paulos, 2004).

Consoante o tipo de ligando seleccionado para a indução de endocitose mediada por receptor, e o tipo de interacção entre ligando e receptor, a taxa de internalização celular da formulação pode ser alvo de variação, podendo influenciar a acumulação da mesma no alvo tumoral. Uma elevada taxa de internalização celular, como se verifica no caso dos folatos, cria

gradientes de difusão mais elevados, promovendo uma difusão mais rápida das formulações ao longo da vasculatura tumoral e permitindo uma maior acumulação nas células do tumor (Lim et al., 2013) (M. Wang & Thanou, 2010) (Paulos, 2004).

A incorporação adequada do ligando na nanoformulação é um aspecto crucial a ter em conta. Sendo a camada responsável pela selectividade, a camada mais superficial da formulação, a sua superfície interage em primeira instância com membranas celulares. Assim, o ligando deve possuir conformação adequada, elevada afinidade para o receptor correspondente, e ser capaz de promover elevadas taxas de captação celular (Lim et al., 2013) (M. Wang & Thanou, 2010) (Paulos, 2004). De forma cooperativa com a camada de revestimento, a incorporação do ligando deve ainda contribuir para que a formulação apenas seja reconhecida pelo organismo ao nível do alvo terapêutico. Neste sentido, assume especial importância a incorporação de cadeias de PEG, com valores de densidade adequados a uma cobertura óptima da superfície da formulação, o que tal como abordado anteriormente, implica a incorporação de cadeias com nuvem em forma de escova, permitindo um aumento de interações entre os ligandos e os receptores correspondentes (Bertrand et al., 2014) (Shmeeda et al., 2009). Normalmente, a incorporação de ligandos em formulações é feita através de espaçadores de PEG. O espaçador de PEG, é uma cadeia única deste polímero utilizada para fazer a ligação entre a nanoplataforma e o ligando, dota a nanoplataforma de maior flexibilidade e permite um aumento da interacção com receptores. Quando utilizado este método, a variável mais importante a considerar é a dimensão da cadeia do espaçador, caso seja demasiado curta o ligando é tapado pela restante camada de PEG que constitui o revestimento da formulação. Por outro lado, se a cadeia do espaçador de PEG for demasiado longa, esta vai tender a adoptar a conformação em forma de cogumelo, comprometendo a exposição do ligando ao receptor, já que também aqui, será tapado pelas conformações em escova da camada de revestimento. Assim, a cadeia do espaçador deve ter a mesma dimensão das cadeias em conformação de escova que compõem o revestimento, de forma a evidenciar a exposição do ligando, e não comprometendo a interacção com o receptor (Bertrand et al., 2014) (M. Wang & Thanou, 2010).

Vários estudos sugerem, de forma geral, uma relação de dependência entre a efectividade terapêutica nos modelos de distribuição selectiva de fármacos que utilizam nanoplataformas e a extensão do processo de captação celular, sendo que a contribuição da

acumulação no alvo terapêutico assume-se como um factor secundário para alcançar uma boa efectividade terapêutica (Bertrand et al., 2014) (Shmeeda et al., 2009).

Podemos então constatar que tanto as formulações que recorrem à incorporação de ligandos, como as que não dependem da acção destas unidades de carácter selectivo, estão sujeitas a um EPR aumentado até alcançarem as proximidades do alvo terapêutico, momento em que o mecanismo de captação celular pelas células tumorais é ampliado no caso das formulações que recorrem a ligandos (Bertrand et al., 2014) (Shmeeda et al., 2009).

Outra variável sujeita a considerar é a quantidade de ligandos a incorporar na superfície da formulação, visto que afecta o efeito de selectividade. Se por um lado, uma elevada densidade de ligandos pode traduzir-se num aumento da probabilidade da existência de interacções entre as formulações e receptores, por outro lado, a presença excessiva destas unidades de selectividade pode comprometer a efectividade da formulação tornando-se numa clara desvantagem (Bertrand et al., 2014) (M. Wang & Thanou, 2010) (Shmeeda et al., 2009).

Verifica-se também, e de forma comparativa, que as formulações que utilizam a incorporação de ligandos demonstram uma acumulação mais rápida, e em concentrações mais elevadas no alvo tumoral que as formulações que não recorrem à incorporação destas unidades de selectividade. Assim, constata-se que a incorporação de ligandos não aumenta a acumulação de uma determinada formulação num tumor, mas demonstra uma maior eficácia, já que, amplia a taxa de captação de formulações pelas células tumorais (Bertrand et al., 2014) (M. Wang & Thanou, 2010) (Shmeeda et al., 2009).

Em alguns estudos onde se recorreu à incorporação de folatos como ligandos, registou-se uma acumulação mais rápida das formulações a nível tumoral que em formulações que não utilizam ligandos. Concluiu-se que este facto se deveu ao reconhecimento das formulações por macrófagos associados ao tumor, nos quais ocorre uma sobreexpressão de receptores correspondentes aos folatos, tornando os macrófagos especialmente sensíveis para o elevado grau de exposição dos folatos, verificado na conformação em forma de escova do PEG (Bertrand et al., 2014) (M. Wang & Thanou, 2010) (Shmeeda et al., 2009).

### **3.1.3. POTENCIAIS SISTEMAS DE DISTRIBUIÇÃO SELECTIVA DE FÁRMACOS EM THERANOSTIC**

Uma estratégia com grande potencial na distribuição selectiva de formulações, passa pela orientação magnética da formulação até ao alvo terapêutico, e no qual existe controlo da libertação de fármaco. Neste contexto, têm sido utilizadas nanopartículas com propriedades magnéticas que ao serem guiadas por um íman colocado externamente, possibilita a distribuição de fármacos no alvo terapêutico desejado (Lim et al., 2013) (Janib et al., 2010). Esta abordagem alcançou elevada localização e retenção de fármaco na região alvo com poucos efeitos secundários em quimioterapia. Por exemplo, num estudo efectuado por Gang et al., desenvolveram-se nanoplataformas constituídas por polímeros magnéticos e contendo um fármaco com actividade anti-tumoral, a gencitabina, com o objectivo de criar um sistema mais eficiente para a distribuição de fármacos em terapêutica oncológica. Não só as nanoplataformas demonstraram uma elevada efectividade terapêutica na distribuição de fármacos através da “activação magnética” para tecidos tumorais, como demonstraram a possibilidade de serem utilizadas como agentes de contraste em ressonância magnética. Este sistema poderia ser aplicado para a distribuição selectiva de fármacos com a possibilidade de detecção simultânea de cancro (Lim et al., 2013) (Janib et al., 2010).

Num estudo levado a cabo por Haam *et al.*, foram desenvolvidas nanoplataformas constituídas por nanocristais magnéticos e fármacos anticancerígenos, encapsulados por um co-polímero anfipático. Esta formulação *theranostic* demonstrou ser muito sensível à detecção através de ressonância magnética e apresentou resultados muito significativos na inibição do crescimento tumoral. Num outro trabalho, Brody *et al.* investigou a acção de uma formulação *theranostic*, constituída por um hidrogel contendo nanopartículas à base de poliacrilamida contendo um agente de contraste para a tomografia de emissão de positrões (PET), com acção sobre o cancro do pulmão. Estes estudos revelaram o potencial da estratégia preconizada por *theranostic*, podendo ser utilizada como um novo sistema de distribuição de nanofármacos que permite de forma concomitante o tratamento e o diagnóstico de várias tipos de patologias oncológicas (Lim et al., 2013).

Existem ainda um conjunto de sistemas em *theranostic* cujo design ainda se encontra numa fase precoce do seu desenvolvimento, mas nos quais se depositam grandes expectativas atendendo ao potencial impacto numa grande diversidade de patologias, incluindo as do foro oncológico. Entre as formulações *theranostic* em desenvolvimento, assumem especial

destaque os sistemas de distribuição selectiva de fármacos activáveis. Nesta abordagem específica de *theranostic*, as formulações são monitorizadas em tempo real via ressonância magnética, e quando esta demonstra acumulação máxima no alvo terapêutico, é então aplicado um estímulo físico externo que activa a formulação, fazendo com que esta liberte a terapêutica (C. S. Kim, Duncan, Creran, & Rotello, 2013) (Lim et al., 2013).

Ao considerar a aplicação destes sistemas emergentes de distribuição de nanoformulações em medicina personalizada, torna-se necessário o desenvolvimento de plataformas responsivas a estímulos, consagrando nanomateriais aptos a promoverem, *in vivo*, alterações físicas ou químicas. Assim sendo, importa dotar este tipo de sistema com a capacidade de responder de forma adequada a ténues alterações *in vivo*, de modo a possibilitar a libertação controlada do fármaco, a recolha de informação acerca do metabolismo, e permitindo ainda a sua activação, que consiste na indução tanto do sinal como da terapêutica, no momento adequado (C. S. Kim et al., 2013) (Lim et al., 2013). Entre os estímulos que activam estes sistemas de distribuição selectiva de fármacos encontram-se a activação por laser próximo do infravermelho, a activação através da indução de calor por ultra-som ou por radiação luminosa, nos casos em que se recorre à utilização de agentes fotossensíveis. A aplicação deste tipo de estímulo, visa induzir a decomposição da nanoplataforma com o propósito de se libertar rapidamente a terapêutica ao nível do alvo respectivo (C. S. Kim et al., 2013) (Katagiri, Imai, & Koumoto, 2011) (Janib et al., 2010). Em particular, activação de sistemas selectivos de distribuição de fármacos anticancerígenos através da indução de calor pode permitir uma destruição selectiva de células tumorais durante um curto período de tempo. Assim, e caso estes métodos alcancem a prática clínica, as abordagens actualmente utilizadas, a remoção cirúrgica e a quimioterapia crónica, seriam evitadas (C. S. Kim et al., 2013) (Katagiri et al., 2011) (Janib et al., 2010).

Seguindo uma tendência recente, a investigação em *theranostic* tem direccionado esforços no desenvolvimento de formulações activáveis por pH, nas quais nanopartículas magnéticas, obtidas a partir de polímeros anfipáticos, incorporam fármacos com actividade anticancerígena e solúveis em compostos orgânicos. Estas formulações não só demonstram uma eficiente distribuição do fármaco para o alvo terapêutico, como evidenciaram a capacidade de assinalar tumores para posterior obtenção de imagens, recorrendo à ressonância magnética (Lim et al., 2013) (Felber, Dufresne, & Leroux, 2012) (Makhlof, Tozuka, & Takeuchi, 2009). Devido à envolvimento do meio tumoral, o pH extracelular dos tumores, varia

tipicamente entre 5-6, sendo mais ácido que o pH do sangue e dos tecidos saudáveis, que apresentam valores mais próximos da neutralidade (pH 7,4). Este facto deve-se fundamentalmente à produção de ácido láctico por parte dos tumores, que posteriormente o libertam no meio extracelular. Neste modelo responsivo de distribuição de fármacos, os perfis de libertação de fármaco podem ser encarados como uma função do valor de pH. Assim que alcançado o alvo terapêutico, os perfis de libertação do fármaco podem avaliar a eficácia do tratamento através de uma monitorização rigorosa, como podem, inclusivamente, ser utilizados para estimar a quantidade e a duração da libertação do fármaco veiculado. Estas formulações *theranostic* apresentam, por isso, o potencial para se constituírem como um sistema bivalente, possuindo uma capacidade de diagnóstico aliada à produção de um efeito terapêutico, a ser futuramente aplicado em contexto clínico (Lim et al., 2013) (Felber et al., 2012) (Makhlof et al., 2009).

### **3.2. THERANOSTIC EM PATOLOGIAS NÃO ONCOLÓGICAS**

#### **3.2.1. THERANOSTIC NAS DOENÇAS INFECCIOSAS**

Apesar de grande parte da investigação científica no âmbito de *theranostic* ser dirigida ao contexto oncológico e atendendo à sua versatilidade, estas formulações assumem-se também como potenciais soluções terapêuticas em patologias infecciosas, assumindo especial relevância nos casos onde se verificam fenómenos de resistência a fármacos. O nexo de causalidade inerente às doenças infecciosas remete para a acção de agentes patogénicos, como é o caso das bactérias, dos vírus, dos fungos ou ainda dos protozoários (Dai et al., 2012) (Rai et al., 2010).

Actualmente o aumento de estirpes patogénicas resistentes à terapêutica constitui-se como um dos principais desafios, tornando evidente a necessidade de se desenvolverem e, ou optimizarem, protocolos de diagnóstico que permitam uma identificação específica e mais célere do agente envolvido na infecção, permitindo uma melhor abordagem terapêutica numa fase precoce do tratamento, e uma utilização mais eficiente dos agentes antimicrobianos disponíveis (Dai et al., 2012) (Rai et al., 2010).

Os métodos actualmente utilizados em laboratório que visam a identificação bacteriana, bem como a susceptibilidade antibacteriana, necessitam de um período de tempo nunca inferior a 48 horas, já que requerem o isolamento e o crescimento de microrganismos. Ao depender do desfecho deste tipo de processo para se iniciar a terapêutica, especialmente nos casos em que a doença infecciosa é severa, este atraso é um factor de extrema importância e que pode comprometer o sucesso de uma intervenção terapêutica, tornando urgente o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, mais rápidos e precisos (Dai et al., 2012) (Rai et al., 2010).

Nos últimos anos têm sido descritos métodos de diagnóstico que visam uma rápida identificação de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA), um dos agentes patogénicos de maior importância no âmbito das infecções nosocomiais. O teste de diagnóstico “Inc-MRSA” tem um elevado grau de especificidade para a detecção de MRSA através da recolha de amostras em esfregaços nasais. A sua implementação na prática clínica foi considerada viável, e este método de diagnóstico demonstrou maior rapidez na obtenção de resultados quando comparado com os métodos tradicionalmente utilizados. No entanto, a sua implementação requer um investimento significativo em equipamento avançado. Contrastando com este caso, a implementação de métodos baseados numa abordagem theranostic teriam a capacidade de obter resultados precisos, com maior rapidez, sendo fáceis de manusear, e sem custo acrescido (Huh & Kwon, 2011) (Rai et al., 2010) (Pissuwan, Cortie, Valenzuela, & Cortie, 2010).

### **3.2.1.1. TERAPÊUTICA FOTODINÂMICA**

O contexto específico das doenças infecciosas parece ser o indicado para uma das mais promissoras abordagens em theranostic, a Terapêutica Fotodinâmica (PDT), na qual uma formulação theranostics conjugada com um agente fotossensível promove acção terapêutica, através da produção de espécies oxigenadas reactivas após foto-activação, tendo esta abordagem sido já aplicada com sucesso na eliminação de agentes patogénicos (Dai et al., 2012) (Huh & Kwon, 2011) (Rai et al., 2010) (Pissuwan et al., 2010). A produção de espécies oxigenadas reactivas após foto-activação, como o superóxido ou o peróxido de hidrogénio, têm múltiplos alvos celulares. Zeina et al. comprovou a eliminação cutânea de várias espécies microbianas utilizando azul de metileno e luz visível, constatando através de um grupo

controlo constituído por queratinócitos (células responsáveis pela síntese de queratina e de maior prevalência na epiderme humana), que estas células resistiram ao tratamento nas mesmas condições, não tendo sido observados quaisquer fenómenos de toxicidade associados, tanto inicialmente, como de forma tardia. Um outro estudo protagonizado por *Dai et al.* demonstrou eficácia no tratamento de uma infecção dérmica de MRSA num modelo animal. O sistema PDT utilizado, incorporou a polietilenoamina como agente fotossensível, e que foi activado por luz vermelha, verificando-se uma aceleração do processo de cicatrização das feridas dérmicas em 8,6 dias, comparando com os modelos em que não se aplicou este método (Rai et al., 2010).

*Rai et al.* aplicou a abordagem *theranostic* em condições *in vitro* na distribuição selectiva da ampicilina em agentes patogénicos resistentes, através de um sistema PDT conjugado com dois agentes fotossensíveis. Procurando aproveitar o mecanismo de resistência das bactérias em seu benefício, os agentes fotossensíveis utilizados são activados pela presença de enzimas bacterianas específicas e responsáveis pela ruptura do anel  $\beta$ -lactâmico presente em alguns antibióticos como a ampicilina, as  $\beta$ -lactamases. Esta formulação apresentou, quando em contacto com uma estirpe específica de *Staphylococcus aureus* e depois de iluminada, uma elevada intensidade de fluorescência, constatando-se posteriormente uma taxa de eliminação superior à da penicilina G para esta mesma estirpe. Atendendo à actividade demonstrada por este tipo de formulação, a sua associação aos antibióticos tradicionalmente utilizados para a eliminação de agentes patogénicos com, ou sem, mecanismos de resistência associados, pode vir a ser uma importante mais valia no combate às resistências a agentes antimicrobianos. Visto a formulação estudada ter sido desenvolvida também com o propósito de desempenhar uma função de diagnóstico, a emissão de fluorescência pode vir a ser um exemplo de identificação de agentes patogénicos resistentes (Huh & Kwon, 2011) (Rai et al., 2010) (Pissuwan et al., 2010).

A abordagem da terapêutica fotodinâmica tem sido aplicada com sucesso no tratamento da Leishmaniose, uma patologia causada por protozoários do género *Leishmania* e que pode manifestar-se tanto a nível cutâneo como a nível visceral, podendo causar lesões ulceradas, danos ao nível dos nervos e dos vasos sanguíneos, sendo capaz de possibilitar uma infecção secundária. *Akilov et al.* aplicou de forma efectiva um sistema PDT em condições *in vitro* utilizando um modelo animal, tendo sido, no entanto, necessária uma aplicação

sucessiva do tratamento para que se verificasse uma total eliminação deste parasita (Rai et al., 2010) (Akilov et al., 2006).

Também no tratamento de infecções fúngicas e virais, a aplicação da abordagem PDT tem sido bem sucedida. *Smijs et al.* utilizou com sucesso um sistema PDT na remoção do *Trichophyton rubrum*, um fungo dermatófito que se assume como a maior causa do pé de atleta. Marotti et al. empregou um sistema PDT com recurso ao azul de metileno como agente fotossensível, demonstrando a sua eficácia no tratamento de pacientes com infecções causadas por herpes vírus (Rai et al., 2010).

A incorporação específica de agentes fotossensíveis em nanopartículas de ouro tem ampliado, no contexto da abordagem PDT, a capacidade de eliminação celular em agentes patogénicos. *Perni et al.* utilizou um sistema PDT constituído por nanopartículas de ouro com revestimento polimérico, e azul de metileno como agente fotossensível, tendo obtido uma taxa de eliminação significativa de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* após uma curta exposição a uma radiação luminosa com um comprimento de onda de 660nm (Dai et al., 2012) (Huh & Kwon, 2011) (Rai et al., 2010).

### **3.2.1.2. TERAPÊUTICA FOTOTÉRMICA**

Na sequência do êxito registado na aplicação da Terapêutica Fotodinâmica (PDT), surgiu de forma mais recente a Terapêutica Fototérmica (PTT). Esta abordagem *theranostic* está ainda numa fase precoce do seu desenvolvimento, verificando-se que a larga maioria dos estudos publicados reflectem a obtenção de resultados em condições *in vitro*. Durante os últimos anos, diversos estudos têm sido realizados no contexto das doenças infecciosas com o intuito de verificar o resultado da aplicação de calor localizado em tecido biológico e em bactérias, as quais recorream maioritariamente à utilização de nanopartículas de ouro (Sosnik & Carcaboso, 2014) (Rai et al., 2010). O interesse nas nanopartículas de ouro devem-se às suas propriedades ópticas resultantes da absorção de ressonância plasmónica. Ao absorverem radiação luminosa, os electrões das nanopartículas de ouro tendem a acumular-se numa região da nanopartícula, ao invés de estarem uniformemente distribuídos pela sua superfície (este estado excitado é designado por *plasmon*). Assim, estas nanopartículas têm sido construídas com o propósito de provocar uma deslocação da banda de absorção para um comprimento de onda de gama próxima do infravermelho para consequente operacionalidade, actuando como

agentes de contraste fototérmicos. Uma outra vantagem associada à indução de calor nestas nanopartículas, deve-se ao facto dos efeitos que causam a destruição celular estarem confinados, numa escala nanométrica, em torno das nanopartículas (Sosnik & Carcaboso, 2014) (Rai et al., 2010).

Uma das primeiras iniciativas no contexto da PTT, utilizou nanopartículas de ouro esféricas de 40nm na eliminação de *Staphylococcus aureus*, depois de activação através de radiação pulsada. Este sistema *theranostic* recorreu a anticorpos contra a proteína A como ligandos, existentes na parede celular das bactérias. Na sequência da exposição à radiação e com a alteração da temperatura, verificou-se a formação de bolhas de cavitação em redor do aglomerado de nanopartículas, fenómeno que promoveu a eliminação da bactéria. *Huang et al.* promoveu a utilização de nanopartículas multifuncionais de óxido de ferro e ouro para incorporar superficialmente a vancomicina, fármaco capaz de se ligar selectivamente a algumas bactérias. Após sujeitar as formulações a uma radiação com luz próxima do infravermelho durante 3 minutos, verificou-se um aumento na temperatura de 55°C que causou a eliminação de várias estirpes bacterianas (Sosnik & Carcaboso, 2014) (Rai et al., 2010).

No contexto da PTT, têm-se realizado abordagens semelhantes com outros nanoveículos, nomeadamente com nanotubos de carbono, que actuam como agentes de contraste fototérmicos quando expostos a luz próxima do infravermelho, com o objectivo de promover o diagnóstico e o tratamento de infecções causadas por agentes patogénicos. *Kim et al.* verificou a elevada afinidade na ligação a bactérias por parte dos nanotubos de carbono, num estudo onde o agente patogénico seleccionado foi uma estirpe específica de *Escherichia coli*. Não só demonstraram potencial para lesar bactérias de forma irreversível, ao promoverem uma redução significativa da viabilidade das bactérias na sequência de duas exposições, ambas com a duração de um nanosegundo, de radiação luminosa próxima do infravermelho e comprimentos de onda de 532nm e 1064nm, como podem ser utilizados simultaneamente como agentes de contraste quando expostos a este tipo de radiação. Além do potencial impacto no tratamento e diagnóstico no âmbito das patologias infecciosas, os autores deste estudo evidenciaram ainda a potencial aplicação que este tipo de sistemas pode vir a ter na purificação de água potável, no processamento de produtos alimentares, ou ainda na desinfecção de dispositivos médicos (Sosnik & Carcaboso, 2014) (Rai et al., 2010).

Os sistemas *theranostic* activáveis por radiação luminosa revelam potencial para superar os fenómenos de resistência a antibióticos podendo, por isso, vir a causar um impacto dramático no tratamento das doenças infecciosas. Com efeito, a abordagem PDT tem a capacidade de diferenciar as células do agente patogénico das do organismo humano, promovendo a especificidade e a efectividade da terapêutica, estando talhada para activação através dos próprios mecanismos de resistência bacterianos. A abordagem PTT enquadra-se como um tratamento antimicrobiano selectivo dada a afinidade das nanoplataformas para a ligação a bactérias alvo. Apesar das diferenças registadas entre estas abordagens *theranostic*, verifica-se que ambas têm potencial para promover um diagnóstico rápido e preciso, o que as torna num recurso especialmente valioso neste contexto clínico (Kojima et al., 2015) (Sosnik & Carcaboso, 2014) (Rai et al., 2010).

### 3.2.2. THERANOSTIC NAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES

As doenças do foro cardiovascular apresentam uma taxa de mortalidade associada muito superior às homologas verificadas nas doenças infecciosas ou em qualquer tipo de doença oncológica, sendo responsáveis pelo maior número de mortes a nível mundial. A sua prevalência global e a sua taxa de mortalidade associada, evidenciam a necessidade de se desenvolverem e optimizarem protocolos terapêuticos, constatando-se um enorme potencial no âmbito de *theranostics* para intervir neste tipo de patologia (Kojima et al., 2015) (Lu, 2014) (Rai et al., 2010).

Embora a progressão da doença possa acontecer de forma latente durante décadas, verificando-se tipicamente um quadro de ausência de sintomatologia, as formulações *theranostic* teriam possibilidade de responder em conformidade tanto aos casos onde a sintomatologia se verifique, como aos casos assintomáticos. A aplicação de uma abordagem *theranostic* na sequência da divisão em subpopulações, consoante o risco cardiovascular, assumir-se-ia como uma medida preponderante para a detecção de casos onde a sintomatologia não se verifique, e onde a patologia se encontre numa fase ainda precoce (Kojima et al., 2015) (Lu, 2014) (Rai et al., 2010).

A investigação científica no âmbito de *theranostic* tem dedicado esforços na procura de potenciais soluções terapêuticas para patologias como a aterosclerose ou a degeneração

macular (Kojima et al., 2015) (Lu, 2014) (Rai et al., 2010). A degeneração macular relacionada com a idade (DMRI), exhibe-se como a principal causa de perda de visão em indivíduos de idade avançada, nas populações dos países mais desenvolvidos. A sua degeneração é frequentemente assintomática numa fase precoce, sendo esta patologia caracterizada de duas formas, a atrófica ou não neo-vascular, a mais frequente e causada por um envelhecimento dos tecidos da mácula, e a exsudativa ou neo-vascular, onde a proliferação de células endoteliais conduz à formação de vasos sanguíneos coroidais localizados atrás da retina e que, em última instância e devido a derrames ou hemorragias, podem causar uma perda total da visão (Rai et al., 2010) (Gryziewicz, 2005) (Schmidt-Erfurth & Hasan, 2000). A terapêutica adoptada no tratamento da degeneração macular neovascular recorre à utilização de verteporfina. A utilização de verteporfina, um fármaco fotossensível, que actua sobre o tecido alvo após foto-activação e através da formação de espécies oxigenadas reactivas, como o superóxido ou o peróxido de hidrogénio, que ao acumular-se preferencialmente nos neo-vasos coroidais provoca a sua oclusão, e evita assim o comprometimento da retina. A utilização combinada da fluoresceína, agente de contraste em angiografia, e de terapêutica foto sensível, a verteporfina, em lipossomas foto-activáveis contribuem para uma gestão efectiva desta patologia em contexto clínico (Rai et al., 2010) (Gryziewicz, 2005) (Schmidt-Erfurth & Hasan, 2000).

A arteriosclerose, a variante mais severa da aterosclerose, é uma doença inflamatória na qual se verifica o aparecimento de lesões resultantes do espessamento e endurecimento das paredes das artérias de médio e grande calibre. Esta perda de elasticidade está associada à formação de depósitos na parede das artérias maioritariamente constituídos por lípidos, fibrina, cálcio e células de músculo liso que podem, com a progressão da doença, levar à formação de placas. Esta patologia pode perdurar durante décadas e surgir em qualquer faixa etária, sendo que quando ocorre na infância, as lesões iniciais são provocadas exclusivamente por macrófagos e linfócitos T. Caracterizando-se por ser uma patologia instável, a formação de placas é de difícil diagnóstico por angiografia, sendo a ruptura de placas a causa de 75% dos casos de síndrome coronário agudo e de 60% dos casos de estenose da artéria carótida (Schiener et al., 2014) (Rai et al., 2010). Na génese da arteriosclerose, os macrófagos tendem a acumular-se nas placas e direccionam a resposta inflamatória através da secreção de citocinas, que promovem o recrutamento de outras células imunitárias para o local da lesão. Ao acumularem-se nas placas formadas no revestimento interno das artérias, os macrófagos assumem-se como potenciais alvos para a acção de formulações *theranostic*, permitindo não

só a detecção como o tratamento destas lesões. A evidência científica verificou a existência de receptores de dextrano na superfície celular dos macrófagos, sendo este facto a premissa para a aposta no desenvolvimento de nanoformulações revestidas com dextrano para promover a distribuição selectiva de fármacos em macrófagos, visto que o revestimento com dextrano induz a fagocitose das nanoplateformas. Estudos *in vitro* utilizando fármacos citotóxicos incorporados por nanoplateformas de óxido de ferro revestidas com dextrano e conjugadas com um agente fotossensível e um agente de fluorescência num sistema foto-activável, alcançaram efectivamente o alvo terapêutico, causando morte celular e assumindo-se como um potencial futuro sistema *theranostic* (Schiener et al., 2014) (Rai et al., 2010).

### 3.2.3. THERANOSTIC NAS DOENÇAS AUTO-IMUNES

A artrite reumatóide é uma patologia auto-imune sistémica que promove inflamação de articulações, podendo nos casos mais severos, levar à destruição de tecido articular. A resposta inflamatória verificada na artrite reumatóide inclui a maioria dos agentes celulares implicados na resposta inflamatória que ocorre na arteriosclerose. A inflamação da articulação é então causada pela activação de macrófagos que direccionam a resposta inflamatória através de citocinas que recrutam outras células do sistema imunitário. Como resultado, existe um aumento da angiogénese, onde se formam novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes, acompanhada de hiperplasia ao longo da membrana sinovial, responsável pela lubrificação das articulações através da secreção de liquido sinovial (Rai et al., 2010) (Gabriel et al., 2009) (K. Park, 2009).

A utilização de sistemas terapêuticos fotodinâmicos na redução da membrana sinovial hiperplásica é uma abordagem não invasiva para o tratamento da artrite reumatóide. A selectividade de qualquer tratamento é importante devido ao potencial para danificar tecido saudável. Estudos *in vitro* que utilizaram um nanoveículo polimérico fotossensível, o feoforbídeo, e um pró-fármaco activado na presença da proteína trombina, cujo aumento é regulado pelo tecido sinovial de pacientes com artrite reumatóide, conduziram à observação de fluorescência entre as articulações artríticas, que tinham níveis 4 vezes superiores aos observados em articulações sem a patologia. A fluorescência obtida pela activação do pró-fármaco na presença de trombina foi posteriormente correlacionada com a classificação clínica da doença, o que poderá vir a ser útil no diagnóstico desta patologia. Este tipo de

formulação pode ser uma ferramenta útil para detectar os níveis de trombina ou a agressividade da inflamação, permitindo ainda o tratamento da artrite numa fase precoce (Rai et al., 2010) (Gabriel et al., 2009) (K. Park, 2009) .

A psoríase é uma doença auto-imune que afecta a pele, mucosas, unhas e nos casos mais severos articulações, manifestando-se através do aparecimento de lesões descamativas e bem delimitadas que podem aparecer em qualquer região corporal, ocorrendo a formação de uma placa psoriática, lesões ovais simetricamente distribuídas, na grande maioria dos casos. O diagnóstico de fluorescência é utilizado na prática clínica para visualizar a placa psoriática e a extensão das lesões. Ao promover a administração tópica do ácido 5-aminolevulínico, este é absorvido pelo tecido lesionado onde é convertido em protoporfirina IX (PPIX), decorrente da actividade metabólica. A fluorescência emitida pela PPIX é tanto maior quanto menor a espessura do estrato córneo, o que permite observar a heterogeneidade da lesão. A utilização da PPIX numa nanoformulação como agente fotossensível, permitiria não só o diagnóstico de lesões como poderia direccionar selectivamente a terapêutica. O design de uma futura formulação theranostics fotossensível para a psoríase, pode depender dos resultados da investigação da regulação endógena que permite a conversão do ácido 5-aminolevulínico para PPIX (Pinto et al., 2014) (Carrascosa et al., 2011) (Rai et al., 2010).

Os agentes foto-activáveis prometem uma estratégia de terapêutica e diagnóstico com o mínimo de invasão, assim como promover a sua monitorização durante o tratamento. Estes agentes oferecem a possibilidade de refinar os agentes fotossintéticos disponíveis para o direccionamento da terapêutica ou a utilização de novas metodologias para diagnosticar patologias. Atendendo ao desenvolvimento de *theranostic* é expectável que muitas terapêuticas existentes sejam revistas num futuro próximo, tal como o seu diagnóstico (Kojima et al., 2015) (Sosnik & Carcaboso, 2014) (Rai et al., 2010).

## Capítulo

# 4. CONCLUSÕES

O conceito de medicina personalizada procura a individualização da prática clínica, adequando a terapêutica e o diagnóstico às necessidades específicas de cada indivíduo. Ao considerar a susceptibilidade do indivíduo para uma determinada patologia, assim como a resposta a um determinado agente terapêutico, a medicina personalizada procura racionalizar os recursos disponíveis, direccionando-os exclusivamente para os indivíduos em que se verifique uma utilização

Ao invés de utilizar uma mesma opção terapêutica para a mesma população, e recorrendo a ferramentas oriundas da genética e da genómica, a medicina personalizada promove a divisão em subpopulações com base em polimorfismos, e promove uma utilização da terapêutica orientada para o perfil genético do indivíduo.

Torna-se claro que apesar do esforço registado na promoção da farmacogenómica, deve tornar-se prioritário o processo de identificação de todas as variações ao nível dos nucleótidos das quais resulte uma maior susceptibilidade para uma determinada patologia e diferenças significativas na resposta a uma determinada terapêutica. Tal facto fomenta um design de fármacos orientado para o perfil genético do indivíduo, sendo especialmente relevante nas patologias de maior prevalência.

O crescente interesse na utilização de biomarcadores pode constituir um recurso valioso para a Indústria Farmacêutica e para o processo de desenvolvimento de fármacos. Ao assumirem-se como indicadores moleculares de uma propriedade biológica específica, os biomarcadores têm a capacidade de prever, medir, e avaliar a resposta a uma determinada terapêutica assim como a ocorrência de efeitos adversos. Assim sendo, o recurso aos biomarcadores pode vir a traduzir-se na diminuição dos custos inerentes ao processo de desenvolvimento de um fármaco, na diminuição do tempo de duração todo este processo, e ainda no reaproveitamento de princípios activos outrora descartados no decorrer do processo e em que se verifique o seu benefício para uma determinada subpopulação.

No âmbito da medicina personalizada e graças ao progresso tecnológico registado na nanomedicina ao longo dos tempos, *theranostic* assume-se como uma abordagem com potencial para revolucionar a prática clínica, tal como é hoje conhecida. Ao fundir os conceitos de terapêutica e diagnóstico, *theranostic* incorpora um agente com actividade

farmacológica e um agente com actividade terapêutica numa mesma entidade polivalente, sendo especialmente relevante a capacidade de alcançar um determinado alvo terapêutico na maximização da efectividade terapêutica, na diminuição de efeitos secundários, na possibilidade de diagnóstico de patologias em fase precoce, e ainda na monitorização de tratamentos.

Tendo sido concebida com base na adopção de processos não invasivos e derivados da prática actual em imagiologia médica, assim como a utilização de nanomateriais biocompatíveis e bioestáveis, a abordagem *theranostic* tem, como prioritária, a minimização de riscos decorrentes da sua aplicação para o paciente.

Ao promover a utilização de nanoplataformas como veículos de distribuição de fármacos, a abordagem *theranostic* procura tomar partido das vantagens da utilização destes nanomateriais relativamente aos modelos tradicionais de distribuição de fármacos. Entre as suas vantagens, destacam-se a capacidade para ultrapassarem com distinção diversas barreiras fisiológicas, redução da excreção renal, promovendo um maior tempo de circulação, a redução do volume de distribuição o que implica uma menor acumulação em tecidos saudáveis, e a capacidade de acumulação num determinado alvo terapêutico, ampliando a concentração de fármaco no alvo e reduzindo a sua acumulação em tecidos saudáveis, promovendo assim uma maior efectividade da terapêutica e uma diminuição significativa da ocorrência de efeitos adversos sistémicos. A utilização de nanoveículos em modelos de distribuição selectiva de fármacos, como se verifica no caso das nanoformulações utilizadas actualmente no tratamento de patologias oncológicas, ao promoverem uma maior efectividade da terapêutica associada a uma menor incidência de efeitos secundários, contribuem para um melhor prognóstico, assim como aumentam a tolerância e aceitação dos pacientes à terapêutica.

A utilização concomitante de nanoplataformas com os agentes de contraste utilizados em imagiologia médica também se tem revelado vantajosa, já que com a utilização destes nanoveículos é obtida uma imagem com melhor resolução o que permite a detecção de pequenas lesões cuja detecção não seria possível através da utilização exclusiva dos agentes de contraste mais tradicionais.

No contexto do nanodiagnóstico, verifica-se ainda que a aplicação directa de nanoveículos como agentes de contraste promove uma razão sinal-ruído mais elevada no tecido alvo, comparativamente com a razão obtida num tecido saudável circundante.

Entre as nanoplataformas utilizadas na veiculação de formulações, destacam-se as nanopartículas de ouro (GNPs), as nanopartículas magnéticas (SPIONs) e os nanotubos de carbono (CNTs), que atendendo às suas propriedades ópticas intrínsecas assumem especial relevância no processo de diagnóstico de patologias, sendo adequadas para inclusão em sistemas de distribuição selectiva de fármacos activáveis.

Entre os sistemas de distribuição selectiva de fármacos investigados em *theranostic*, assumem especial relevância os sistemas activáveis por estímulos externos. Sendo considerados modalidades avançadas de distribuição de fármacos, estes permitem uma utilização mais efectiva da formulação, ampliando o seu efeito terapêutico no alvo seleccionado e diminuindo a ocorrência de efeitos secundários, já que a libertação da terapêutica ocorre apenas nas proximidades do alvo terapêutico.

Atendendo à sua polivalência e grau de especificidade, a abordagem *theranostic* tem sido investigada tendo em vista a sua aplicação numa vasta diversidade de patologias, assumindo especial relevância nas doenças com maior prevalência e maiores taxas de mortalidade associadas, como se verifica no caso das patologias do foro oncológico, das infecciosas, das cardiovasculares e das auto-imunes. Verifica-se que as doenças oncológicas têm merecido um maior destaque por parte da comunidade científica.

No entanto, a investigação científica de nanoformulações com propriedades de diagnóstico e de terapêutica ainda não é uma prática recorrente, verificando-se ainda uma elevada percentagem de estudos relativos a nanoformulações que investigam isoladamente as propriedades de diagnóstico e de terapêutica, encontrando-se muitos destes estudos ainda longe da introdução em ensaios clínicos. Assim sendo, apesar de se observar um crescimento inequívoco ao nível da investigação no contexto da nanomedicina ao longo da última década, a abordagem *theranostic* encontra-se numa fase embrionária do seu desenvolvimento, estando a sua introdução na prática clínica ainda longe de ser uma realidade. Não obstante de a sua inclusão na prática médica estar ainda longe de ser uma realidade, é possível constatar o número crescente de nanoformulações, quer no mercado, quer na introdução em ensaios clínicos.

Quando se verificar a introdução desta abordagem na prática clínica em patologias de elevada prevalência, com uma taxa de sucesso condizente com a expectativa que tem sido criada em seu redor, a implementação de *theranostic* pode vir a conduzir a um aumento substancial na esperança média de vida, desconhecendo-se por esta altura o seu potencial

impacto ético, económico e político nas mais diversas sociedades, podendo inclusivamente vir a levantar questões relacionadas com a sustentabilidade social.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akilov, O. E., Kosaka, S., O'Riordan, K., Song, X., Sherwood, M., Flotte, T. J., ... Hasan, T. (2006). The role of photosensitizer molecular charge and structure on the efficacy of photodynamic therapy against Leishmania parasites. *Chem Biol*, 13(8), 839–847. <http://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.06.008>
- Allmeroth, M., Moderegger, D., Gündel, D., Buchholz, H.-G., Mohr, N., Koynov, K., ... Zentel, R. (2013). PEGylation of HPMA-based block copolymers enhances tumor accumulation in vivo: A quantitative study using radiolabeling and positron emission tomography. *Journal of Controlled Release*, 172(1), 77–85. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.07.027>
- Amir-Aslani, A., & Mangematin, V. (2010). The future of drug discovery and development: Shifting emphasis towards personalized medicine. *Technological Forecasting and Social Change*, 77(2), 203–217. <http://doi.org/10.1016/j.techfore.2009.09.005>
- Bates, S. (2010). Progress towards personalized medicine. *Drug Discovery Today*, 15(3-4), 115–20. <http://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.11.001>
- Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N., & Farokhzad, O. C. (2014). Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 66, 2–25. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2013.11.009>
- Boncel, S., Müller, K. H., Skepper, J. N., Walczak, K. Z., & Koziol, K. K. K. (2011). Tunable chemistry and morphology of multi-wall carbon nanotubes as a route to non-toxic, theranostic systems. *Biomaterials*, 32(30), 7677–7686. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.06.055>
- Borgman, M. P., Coleman, T., Kolhatkar, R. B., Geyser-Stoops, S., Line, B. R., & Ghandehari, H. (2008). Tumor-targeted HPMA copolymer-(RGDfK)-(CHX-A"-DTPA) conjugates show increased kidney accumulation. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 132(3), 193–9. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.07.014>
- Carlson, B. (2012). Next Generation Sequencing: The Next Iteration of Personalized Medicine: Next generation sequencing, along with expanding databases like The Cancer Genome Atlas, has the potential to aid rational drug discovery and streamline clinical trials. *Biotechnology Healthcare*, 9(2), 21–5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3411229&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Carrascosa, J. M., López-Estebarez, J. L., Carretero, G., Daudén, E., Ferrándiz, C., Vidal, D., ... Puig, L. (2011). Narrowband UV-B, monochromatic excimer laser, and photodynamic therapy in psoriasis: a consensus statement of the Spanish Psoriasis Group. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 102(3), 175–186. [http://doi.org/10.1016/S1578-2190\(11\)70782-X](http://doi.org/10.1016/S1578-2190(11)70782-X)
- Chen, W.-H., Xu, X.-D., Jia, H.-Z., Lei, Q., Luo, G.-F., Cheng, S.-X., ... Zhang, X.-Z. (2013). Therapeutic nanomedicine based on dual-intelligent functionalized gold nanoparticles for cancer imaging and therapy in vivo. *Biomaterials*, 34(34), 8798–807. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.084>
- Chen, X. S. (2011). Introducing Theranostics Journal - From the Editor-in-Chief. *Theranostics*, 1, 1–2. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3086620&tool=pmcentrez&rendertype>

=abstract

- Chen, Z. (2012). Applications of Functionalized Fullerenes in Tumor Theranostics. *Theranostics*, 2(3), 238. <http://doi.org/10.7150/thno.3509>
- Cho, W. C. S. (2007). Proteomics Technologies and Challenges. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 5(2), 77–85. [http://doi.org/10.1016/S1672-0229\(07\)60018-7](http://doi.org/10.1016/S1672-0229(07)60018-7)
- Clemente-Casares, X., & Santamaria, P. (2014). Nanomedicine in autoimmunity. *Immunology Letters*, 158(1-2), 167–74. <http://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.12.018>
- Cohen, Y., & Shoushan, S. Y. (2013). Magnetic nanoparticles-based diagnostics and theranostics. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(4), 672–81. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.01.006>
- Crielaard, B. J., Lammers, T., Schiffelers, R. M., & Storm, G. (2012). Drug targeting systems for inflammatory disease: One for all, all for one. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 225–234. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.12.014>
- Dai, T., Gupta, A., Murray, C. K., Vrahas, M. S., Tegos, G. P., & Hamblin, M. R. (2012). Blue light for infectious diseases: Propionibacterium acnes, Helicobacter pylori, and beyond? *Drug Resistance Updates*, 15(4), 223–236. <http://doi.org/10.1016/j.drup.2012.07.001>
- DeNardo, G. L., & DeNardo, S. J. (2012). Concepts, consequences, and implications of theranosis. *Seminars in Nuclear Medicine*, 42(3), 147–50. <http://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2011.12.003>
- Dianzani, C., Zara, G. P., Maina, G., Pettazzoni, P., Pizzimenti, S., Rossi, F., ... Barrera, G. (2014). Drug Delivery Nanoparticles in Skin Cancers. *BioMed Research International*, 2014, 895986. <http://doi.org/10.1155/2014/895986>
- Dos Santos, N., Allen, C., Doppen, A.-M., Anantha, M., Cox, K. A. K., Gallagher, R. C., ... Bally, M. B. (2007). Influence of poly(ethylene glycol) grafting density and polymer length on liposomes: Relating plasma circulation lifetimes to protein binding. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(6), 1367–1377. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.12.013>
- EiBayoumi, T., & Torchilin, V. (2007). Enhanced cytotoxicity of monoclonal anticancer antibody 2C5-modified doxorubicin-loaded PEGylated liposomes against various tumor cell lines. *Eur J Pharm Sci*, 32(3), 159–168. [http://doi.org/S0928-0987\(07\)00255-2](http://doi.org/S0928-0987(07)00255-2) [pii]10.1016/j.ejps.2007.05.113
- Fan, Z., Fu, P. P., Yu, H., & Ray, P. C. (2014). Theranostic nanomedicine for cancer detection and treatment. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(1), 3–17. <http://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.001>
- Fang, J., Nakamura, H., & Maeda, H. (2011). The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(3), 136–151. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2010.04.009>
- Felber, A. E., Dufresne, M. H., & Leroux, J. C. (2012). PH-sensitive vesicles, polymeric micelles, and nanospheres prepared with polycarboxylates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(11), 979–992. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2011.09.006>
- Gabriel, D., Busso, N., So, A., van den Bergh, H., Gurny, R., & Lange, N. (2009). Thrombin-sensitive photodynamic agents: A novel strategy for selective synovectomy in rheumatoid arthritis. *Journal of Controlled Release*, 138(3), 225–234. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.05.012>
- Gillies, E. R., & Fréchet, J. M. J. (2005). Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discovery Today*, 10(1), 35–43. [http://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03276-3](http://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03276-3)
- Gonzalez-Garay, M. L. (2014). The road from next-generation sequencing to personalized medicine.

*Personalized Medicine*, 11(5), 523–544. <http://doi.org/10.2217/PME.14.34>

- Gryziewicz, L. (2005). Regulatory aspects of drug approval for macular degeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(14), 2092–8. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2005.09.009>
- Gupta, a, & Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18), 3995–4021. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.012>
- Heo, D. N., Yang, D. H., Moon, H.-J., Lee, J. B., Bae, M. S., Lee, S. C., ... Kwon, I. K. (2012). Gold nanoparticles surface-functionalized with paclitaxel drug and biotin receptor as theranostic agents for cancer therapy. *Biomaterials*, 33(3), 856–866. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.09.064>
- Huh, A. J., & Kwon, Y. J. (2011). “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*, 156(2), 128–145. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.002>
- Jain, K., Mehra, N. K., & Jain, N. K. (2014). Potentials and emerging trends in nanopharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*, 15, 97–106. <http://doi.org/10.1016/j.coph.2014.01.006>
- Janib, S. M., Moses, A. S., & MacKay, J. A. (2010). Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(11), 1052–63. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2010.08.004>
- Joh, D. Y., Kao, G. D., Murty, S., Stangl, M., Sun, L., Al Zaki, A., ... Dorsey, J. F. (2013). Theranostic gold nanoparticles modified for durable systemic circulation effectively and safely enhance the radiation therapy of human sarcoma cells and tumors. *Translational Oncology*, 6(6), 722–31. <http://doi.org/10.1593/tlo.13433>
- Katagiri, K., Imai, Y., & Koumoto, K. (2011). Variable on-demand release function of magneto-responsive hybrid capsules. *J Colloid Interface Sci*, 361(1), 109–114. [http://doi.org/S0021-9797\(11\)00615-1](http://doi.org/S0021-9797(11)00615-1) [pii] <http://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.05.035>
- Kataoka, K., Harada, a, & Nagasaki, Y. (2001). Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(1), 113–131. [http://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00124-1](http://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00124-1)
- Kim, C. S., Duncan, B., Creran, B., & Rotello, V. M. (2013). Triggered nanoparticles as therapeutics. *Nano Today*, 8(4), 439–447. <http://doi.org/10.1016/j.nantod.2013.07.004>
- Kim, P. S., Djazayeri, S., & Zeineldin, R. (2011). Novel nanotechnology approaches to diagnosis and therapy of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 120(3), 393–403. <http://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.11.029>
- Kojima, R., Aubel, D., & Fussenegger, M. (2015). Novel theranostic agents for next-generation personalized medicine: small molecules, nanoparticles, and engineered mammalian cells. *Current Opinion in Chemical Biology*, 28, 29–38. <http://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.05.021>
- Kopeček, J., & Kopečková, P. (2010). HEMA copolymers: Origins, early developments, present, and future☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(2), 122–149. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2009.10.004>
- Kumar, A., Zhang, X., & Liang, X.-J. (2013). Gold nanoparticles: Emerging paradigm for targeted drug delivery system. *Biotechnology Advances*, 31(5), 593–606. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.10.002>
- Langreth, R., & Waldholz, M. (1999). New era of personalized medicine: targeting drugs for each

- unique genetic profile. *The Oncologist*, 4(5), 426–7. Retrieved from <http://theoncologist.alphamedpress.org/content/4/5/426.full>
- Lee, S. Y., Park, H. S., Lee, K. H. K. Y., Kim, H. J., Jeon, Y. J., Jang, T. W., ... Kim, S. Y. (2013). Paclitaxel-loaded polymeric micelle (230 mg/m<sup>2</sup>) and cisplatin (60 mg/m<sup>2</sup>) vs. paclitaxel (175 mg/m<sup>2</sup>) and cisplatin (60 mg/m<sup>2</sup>) in advanced non-small-cell lung cancer: a multicenter randomized phase IIB trial. *Clinical Lung Cancer*, 14(3), 275–82. <http://doi.org/10.1016/j.clc.2012.11.005>
- Leung, S., & Romanowski, M. (2011). Spectrally Selective Light Induced Release from Gold Coated Liposomes. *Biophysical Journal*, 100(3), 471a–472a. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.12.2765>
- Lim, E.-K., Jang, E., Lee, K., Haam, S., & Huh, Y.-M. (2013). Delivery of cancer therapeutics using nanotechnology. *Pharmaceutics*, 5(2), 294–317. <http://doi.org/10.3390/pharmaceutics5020294>
- Limaye, N. (2013). Pharmacogenomics, Theranostics and Personalized Medicine - the complexities of clinical trials: challenges in the developing world. *Applied & Translational Genomics*, 2, 17–21. <http://doi.org/10.1016/j.atg.2013.05.002>
- Liu, M., & Fréchet, J. M. J. (1999). Designing dendrimers for drug delivery. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 2(10), 393–401. [http://doi.org/10.1016/S1461-5347\(99\)00203-5](http://doi.org/10.1016/S1461-5347(99)00203-5)
- Liu, X.-M., Miller, S. C., & Wang, D. (2010). Beyond oncology — Application of HPMA copolymers in non-cancerous diseases☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(2), 258–271. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2009.10.006>
- Liu, Z., Robinson, J. T., Tabakman, S. M., Yang, K., & Dai, H. (2011). Carbon materials for drug delivery & cancer therapy. *Materials Today*, 14(7-8), 316–323. [http://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70161-4](http://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70161-4)
- Lu, Z.-R. (2014). Theranostics: fusion of therapeutics and diagnostics. *Pharmaceutical Research*, 31(6), 1355–7. <http://doi.org/10.1007/s11095-014-1343-1>
- Lukyanov, A., Gao, Z., & Torchilin, V. (2003). Micelles from polyethylene glycol/phosphatidylethanolamine conjugates for tumor drug delivery. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 91(1-2), 97–102. <http://doi.org/S0168365903002177> [pii]
- Mäder, K., & Mehnert, W. (2001). Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(2-3), 165–96. [http://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00105-3](http://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00105-3)
- MAHMUD, A., XIONG, X., & LAVASANIFAR, A. (2008). Development of novel polymeric micellar drug conjugates and nano-containers with hydrolyzable core structure for doxorubicin delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(3), 923–934. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.02.021>
- Makhlof, A., Tozuka, Y., & Takeuchi, H. (2009). pH-Sensitive nanospheres for colon-specific drug delivery in experimentally-induced colitis rat model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 72(1), 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.12.013>
- Maruyama, K. (2011). Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(3), 161–169. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2010.09.003>
- Min, S. Y., Byeon, H. J., Lee, C., Seo, J., Lee, E. S., Shin, B. S., ... Youn, Y. S. (2015). Facile one-pot

- formulation of TRAIL-embedded paclitaxel-bound albumin nanoparticles for the treatment of pancreatic cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, 494(1), 506–515. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.08.055>
- Mody, V. V., Nounou, M. I., & Bikram, M. (2009). Novel nanomedicine-based MRI contrast agents for gynecological malignancies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(10), 795–807. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2009.04.020>
- Mura, S., & Couvreur, P. (2012). Nanotheranostics for personalized medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(13), 1394–416. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2012.06.006>
- Muthu, M., & Feng, S. (2010). Nanopharmacology of liposomes developed for cancer therapy Editorial. *Nanomedicine*, 5(7), 1017–1019. <http://doi.org/10.2217/nnm.10.75>
- Muthu, M. S., Kulkarni, S. a, Raju, A., & Feng, S.-S. (2012). Theranostic liposomes of TPGS coating for targeted co-delivery of docetaxel and quantum dots. *Biomaterials*, 33(12), 3494–501. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.036>
- Muthu, M. S., Kulkarni, S. A., Xiong, J., & Feng, S.-S. (2011). Vitamin E TPGS coated liposomes enhanced cellular uptake and cytotoxicity of docetaxel in brain cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 421(2), 332–340. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.09.045>
- Muthu, M. S., Leong, D. T., Mei, L., & Feng, S.-S. (2014). Nanotheranostics - application and further development of nanomedicine strategies for advanced theranostics. *Theranostics*, 4(6), 660–77. <http://doi.org/10.7150/thno.8698>
- Otsuka, H., Nagasaki, Y., & Kataoka, K. (2003). PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(3), 403–419. [http://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00226-0](http://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00226-0)
- Park, J. W., Kirpotin, D. B., Hong, K., Shalaby, R., Shao, Y., Nielsen, U. B., ... Benz, C. C. (2001). Tumor targeting using anti-her2 immunoliposomes. *Journal of Controlled Release*, 74(1-3), 95–113. [http://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00315-7](http://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00315-7)
- Park, K. (2009). Selective synovectomy using thrombin-sensitive photodynamic agents. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 138(3), 224. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.07.004>
- Paulos, C. (2004). Folate receptor-mediated targeting of therapeutic and imaging agents to activated macrophages in rheumatoid arthritis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(8), 1205–1217. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2004.01.012>
- Pinto, M. F., Moura, C. C., Nunes, C., Segundo, M. A., Costa Lima, S. A., & Reis, S. (2014). A new topical formulation for psoriasis: Development of methotrexate-loaded nanostructured lipid carriers. *International Journal of Pharmaceutics*, 477(1-2), 519–526. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.10.067>
- Pissuwan, D., Cortie, C. H., Valenzuela, S. M., & Cortie, M. B. (2010). Functionalised gold nanoparticles for controlling pathogenic bacteria. *Trends in Biotechnology*, 28(4), 207–213. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.12.004>
- Rai, P., Mallidi, S., Zheng, X., Rahmanzadeh, R., Mir, Y., Elrington, S., ... Hasan, T. (2010). Development and applications of photo-triggered theranostic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(11), 1094–124. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2010.09.002>
- Rizzo, L. Y., Theek, B., Storm, G., Kiessling, F., & Lammers, T. (2013). Recent progress in nanomedicine: therapeutic, diagnostic and theranostic applications. *Current Opinion in*

- Biotechnology*, 24(6), 1159–66. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.02.020>
- Ryu, J. H., Lee, S., Son, S., Kim, S. H., Leary, J. F., Choi, K., & Kwon, I. C. (2014). Theranostic nanoparticles for future personalized medicine. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.027>
- Sadee, W. (2011). Genomics and personalized medicine. *International Journal of Pharmaceutics*, 415(1-2), 2–4. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.04.048>
- Schiener, M., Hossann, M., Viola, J. R., Ortega-Gomez, A., Weber, C., Lauber, K., ... Soehnlein, O. (2014). Nanomedicine-based strategies for treatment of atherosclerosis. *Trends in Molecular Medicine*, 20(5), 271–281. <http://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.12.001>
- Schmidt-Erfurth, U., & Hasan, T. (2000). Mechanisms of action of photodynamic therapy with verteporfin for the treatment of age-related macular degeneration. *Survey of Ophthalmology*, 45(3), 195–214. [http://doi.org/10.1016/S0039-6257\(00\)00158-2](http://doi.org/10.1016/S0039-6257(00)00158-2)
- Schuster, S. C. (2007). Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature Methods*, 5(1), 16–18. <http://doi.org/10.1038/nmeth1156>
- Shmeeda, H., Tzemach, D., Mak, L., & Gabizon, A. (2009). Her2-targeted pegylated liposomal doxorubicin: Retention of target-specific binding and cytotoxicity after in vivo passage. *Journal of Controlled Release*, 136(2), 155–160. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.02.002>
- Singh, A., & Sahoo, S. K. (2014). Magnetic nanoparticles: a novel platform for cancer theranostics. *Drug Discovery Today*, 19(4), 474–481. <http://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.10.005>
- Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, a R., & Rudzinski, W. E. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 70(1-2), 1–20. [http://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00339-4](http://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00339-4)
- Sosnik, A., & Carcaboso, A. M. (2014). Nanomedicines in the future of pediatric therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2014.05.004>
- Stylianopoulos, T., & Jain, R. K. (2015). Design considerations for nanotherapeutics in oncology. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11(8), 1893–1907. <http://doi.org/10.1016/j.nano.2015.07.015>
- Tang, Y., Wang, J., Scollard, D. A., Mondal, H., Holloway, C., Kahn, H. J., & Reilly, R. M. (2005). Imaging of HER2/neu-positive BT-474 human breast cancer xenografts in athymic mice using <sup>111</sup>In-trastuzumab (Herceptin) Fab fragments. *Nuclear Medicine and Biology*, 32(1), 51–58. <http://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2004.08.003>
- Tietze, R., Lyer, S., Dürr, S., Struffert, T., Engelhorn, T., Schwarz, M., ... Alexiou, C. (2013). Efficient drug-delivery using magnetic nanoparticles — biodistribution and therapeutic effects in tumour bearing rabbits. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 9(7), 961–971. <http://doi.org/10.1016/j.nano.2013.05.001>
- Tietze, R., Zaloga, J., Unterweger, H., Lyer, S., Friedrich, R. P., Janko, C., ... Alexiou, C. (2015). Magnetic nanoparticle-based drug delivery for cancer therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.08.022>
- Tomalia, D. a., & Fréchet, J. M. (2005). Introduction to “dendrimers and Dendritic Polymers.” *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 30(3-4), 217–219. <http://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2005.03.003>
- Tomuleasa, C., Braicu, C., Irimie, A., Craciun, L., & Berindan-Neagoe, I. (2014). Nanopharmacology in translational hematology and oncology. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 3465–3479.

<http://doi.org/10.2147/IJN.S60488>

- Torchilin, V. (2011). Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(3), 131–5. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2010.03.011>
- Unterweger, H., Tietze, R., Janko, C., Zaloga, J., Lyer, S., Dürr, S., ... Alexiou, C. (2014). Development and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles with a cisplatin-bearing polymer coating for targeted drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 3659–76. <http://doi.org/10.2147/IJN.S63433>
- Urban, C., Urban, A. S., Charron, H., & Joshi, A. (2013). Externally modulated theranostic nanoparticles. *Translational Cancer Research*, 2(4), 292–308. <http://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2013.08.05>
- Vonarbourg, A., Passirani, C., Saulnier, P., & Benoit, J.-P. (2006). Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials*, 27(24), 4356–4373. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.03.039>
- Wang, M., & Thanou, M. (2010). Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacological Research*, 62(2), 90–99. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.03.005>
- Wang, X., Ishida, T., & Kiwada, H. (2007). Anti-PEG IgM elicited by injection of liposomes is involved in the enhanced blood clearance of a subsequent dose of PEGylated liposomes. *Journal of Controlled Release*, 119(2), 236–244. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.02.010>
- Wissing, S. ., Kayser, O., & Müller, R. . (2004). Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(9), 1257–1272. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2003.12.002>
- Xie, J., Lee, S., & Chen, X. (2010). Nanoparticle-based theranostic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(11), 1064–79. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2010.07.009>
- Zhang, S. Y., Zhang, S. Q., Nagaraju, G. P., & El-Rayes, B. F. (2015). Biomarkers for personalized medicine in GI cancers. *Molecular Aspects of Medicine*, 1–14. <http://doi.org/10.1016/j.mam.2015.06.002>
- Zhao, J., Mi, Y., & Feng, S. S. (2013). Targeted co-delivery of docetaxel and siPIk1 by herceptin-conjugated vitamin E TPGS based immunomicelles. *Biomaterials*, 34(13), 3411–3421. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.009>