

DANIELA ALEXANDRA COELHO SERRANO

**AVANÇOS RECENTES DAS ABORDAGENS
NANOTECNOLÓGICAS PARA DIAGNÓSTICO E
TRATAMENTO DO CANCRO COLORRETAL**

Orientadora: Prof^a. Doutora Catarina Pereira Leite

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Ciências e Tecnologias de Saúde

Lisboa

2021

DANIELA ALEXANDRA COELHO SERRANO

**AVANÇOS RECENTES NAS ABORDAGENS
NANOTECNOLÓGICAS PARA DIAGNÓSTICO E
TRATAMENTO DO CANCRO COLORRETAL**

Dissertação defendida em provas públicas na
Universidade Lusófona de Humanidades no dia
15 de Novembro de 2021, perante o júri,
nomeado pelo Despacho de Nomeação n.º:
287/2021 de 22 de Outubro de 2021, com a
seguinte composição:

Presidente:

Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente:

Prof. Doutor Nuno Saraiva

Orientador:

Prof.^a Doutora Catarina Pereira Leite

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Ciências e Tecnologias de Saúde

Lisboa

2021

Agradecimentos

Antes de mais, gostaria de agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Catarina Leite, por toda a dedicação, incentivo, apoio, disponibilidade, orientação e confiança depositada em mim.

Com carinho especial, gostaria de agradecer aos melhores pais do mundo e ao irmão mais exigente do mundo. Por acreditarem sempre em mim, por nunca duvidarem, por desejarem sempre o melhor e ajudarem a conquistar. É do fundo do coração que gratifico toda a força transmitida ao longo destes anos de estudo. Por aceitarem a minha decisão de continuar a estudar e serem o pilar de tudo o que conquistei, ficarei para sempre grata.

A toda a família, que é enorme, não restam palavras. A todos os tios, primos, cunhados, avó e namorado agradeço por toda a alegria partilhada. Sem o vosso amor incondicional, alegria diária e apoio excecional, não seria possível.

A todos, o meu enorme obrigada!

Resumo

O cancro colorretal (CCR) é o terceiro cancro mais comum do mundo e a quarta principal causa de morte associada ao cancro. A quimioterapia convencional apresenta enormes desvantagens, devido à sua baixa especificidade e aos consequentes efeitos adversos. O CCR é também uma das maiores preocupações a nível mundial devido ao seu diagnóstico invasivo e tardio. A endoscopia é a técnica de diagnóstico mais frequente e está associada a desconforto e a várias complicações, que levam o paciente a evitar este tipo de exames. Com a finalidade de melhorar o diagnóstico e a terapêutica do cancro, a nanomedicina tem suscitado interesse crescente no âmbito da oncologia. Esta área centra-se no desenvolvimento de nanoformulações direcionadas, de forma a alcançar uma terapia mais eficaz, mais segura e/ou um diagnóstico mais eficiente.

Neste contexto, esta dissertação tem como objetivo compilar os avanços recentes das abordagens nanotecnológicas para diagnóstico, tratamento e teranóstico do CCR. Para tal, foram recolhidas informações quanto a estudos pré-clínicos entre 2015-2021 e a ensaios clínicos entre 2006-2021. Por último, os resultados obtidos foram discutidos quanto ao tipo de nanopartícula mais utilizada, ao tipo de fármaco encapsulado e à estratégia de funcionalização empregue.

No geral, as nanopartículas mais exploradas para o tratamento do CCR foram as à base de lípidos e as poliméricas, enquanto as nanopartículas metálicas e de sílica foram mais exploradas para diagnóstico e teranóstico. Relativamente aos fármacos veiculados, os estudos pré-clínicos têm-se dedicado a veicular essencialmente 5-Fluorouracilo (5-FU), curcumina (CUR) e doxorrubicina (DOX), enquanto que nos ensaios clínicos, as nanoformulações veiculam maioritariamente o irinotecano (IRI), o SN-38 e a DOX. Relativamente à funcionalização das nanopartículas, a maioria dos estudos pré-clínicos foram realizados com nanossistemas sem funcionalização. Ainda assim, os ligandos mais utilizados foram: ácido fólico (AF), aptâmeros, ácido hialurónico e anticorpos.

Até ao momento, os estudos pré-clínicos e os ensaios clínicos recentes quanto à aplicação da nanomedicina no diagnóstico e na terapêutica do CCR indicam que esta é uma abordagem bastante promissora, que poderá ser uma mais-valia para ultrapassar as limitações do diagnóstico e do tratamento convencional do CCR.

Palavras-chave: cancro colorretal, nanopartículas, nanotratamento, nanodiagnóstico e nanoteranóstico.

Abstract

Colorectal cancer (CCR) is the third most common type of cancer worldwide and is also the fourth main cause of death associated to cancer. Conventional chemotherapy has enormous disadvantages, due to the lack of specificity and the resulting adverse effects. CCR is also one of the main concerns around the world because of the invasive and late diagnosis. The usual technique for CCR diagnosis is the endoscopy, which is associated to discomfort and several complications, that leads the patients to avoid this type of exam. There has been a raising interest in nanomedicine in the field of oncology with the purpose of improving diagnosis and therapeutics of cancer. This field focuses on the development of targeting nanoformulations to develop safer and more efficacious therapies and/or more efficient diagnosis.

In this context, this dissertation's main goal is to collect the recent advances in the nanotechnological approaches for diagnosis, treatment, and theranostic of CCR. For this, information about pre-clinical studies between 2015-2021 and clinical trials between 2006-2021 were gathered. Lastly, the results obtained were discussed regarding the types of nanoparticles used, the type of encapsulated compounds used and the strategies for targeting employed.

Overall, for the treatment of CCR, the nanoparticles (NPs) more explored were lipid-based and polymeric NPs and for the diagnosis and theranostic, were the metallic and silica ones. Concerning the delivery of encapsulated drugs, pre-clinical studies have been focusing on 5-fluorouracil (5-FU), curcumin and doxorubicin, while clinical trials have been centred in delivering irinotecan (IRI), SN-38 and doxorubicin. Regarding the targeting of nanoparticles, the majority of pre-clinical studies report studies on nanosystems without functionalization. Nevertheless, the most used ligands were folic acid, aptamers, hyaluronic acid, and antibodies.

Up to now, recent pre-clinical studies and clinical trials about the application of nanomedicine in the diagnosis and therapeutics of CCR show that this approach is very promising and may contribute to overcome the limitations of the conventional CCR diagnosis and therapeutics.

Keywords: colorectal cancer, nanoparticles, nanotreatment, nanodiagnosis and nanotheranostic

Abreviaturas

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AF	Ácido Fólico
APC	Gene Supressor de Tumor da Polipose Adenomatosa
CAPEOX	Capecitabina + Oxaliplatina
CEA	Antigénio Carcinoembrionário
CCR	Cancro Colorretal
CUR	Curcumina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
EGFR	Recetor do Fator de Crescimento Epidérmico
ESMO	<i>European Society for Medical Oncology</i>
5-FU	5-Fluorouracilo
FOLFOX	Oxaliplatina + 5-Fluorouracilo + Leucovorina
FR- α	Recetor de Folatos
IRI	Irinotecano
LV	Leucovorina
MMR	Sistema de Reparação Deficiente
NLC	Transportador Lipídico nanoestruturado
MSI	Alta Instabilidade de Microssatélites
NHS	<i>National Health Service</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NP	Nanopartícula
OP	Oxaliplatina
PAMAM	Poliamidoamina
PEG	Polietilenoglicol
PCL	Policaprolactona
PLGA	Ácido polilático-co-glicólico
RM	Ressonância Magnética Nuclear
SLN	Nanopartícula Lipídica Sólida
SPION	Nanopartícula de Óxido de Ferro Superparamagnéticas
TAG-72	Recetor de glicoproteína-72
TC	Tomografia Computorizada

Índice

1.	Introdução	8
1.1.	Cancro Colorretal	8
1.1.1.	Epidemiologia.....	8
1.1.2.	Carcinogénese colorretal.....	9
1.1.3.	Fatores de risco	11
1.1.4.	Estadiamento.....	13
1.1.5.	Manifestações clínicas	16
1.1.6.	Rastreio e Diagnóstico	17
1.1.7.	Tratamento	22
1.2.	Nanotecnologia.....	28
1.2.1.	Funcionalização de nanopartículas	31
1.3.	Motivação e Objetivos	34
2.	Métodos.....	38
3.	Resultados e Discussão	41
3.1.	Estudos pré-clínicos	41
3.1.1.	Nanopartículas baseadas em lípidos	42
3.1.2.	Nanopartículas poliméricas.....	46
3.1.3.	Nanopartículas metálicas.....	54
3.1.4.	Nanopartículas de sílica.....	57
3.1.5.	Nanopartículas de carbono	60
3.2.	Ensaio Clínicos	62
3.3.	Discussão integrada	69
3.3.1.	Distribuição por aplicação e ano de publicação	69
3.3.2.	Distribuição por fármaco veiculado	71
3.3.3.	Distribuição por tipo de nanopartícula.....	76
3.3.4.	Distribuição por tipo de ligando utilizado na funcionalização.....	77
3.3.5.	Distribuição por tipo de nanopartícula e aplicação	80

4.	Conclusão	84
5.	Bibliografia.....	87

Índice de figuras

Figura 1 - Sequência adenoma-carcinoma. Adaptado de: (Armaghany et al., 2012).	10
Figura 2 - Estádios do CCR de acordo com AJCC Adaptado de:(Vinchhi & Patel, 2021).	14
Figura 3 - Recomendações para Quimioterapia Adjuvante para o estadio II de CCR. Adaptado de: (Al B. Benson et al., 2021).	25
Figura 4 - Combinações de quimioterapia para quimioterapia adjuvante para o estadio IV de CCR. Adaptado de: (Anticancer Fund, 2016).	27
Figura 5 - Tipos de nanossistemas poliméricos. Adaptado de: (Conniot et al., 2014).	30
Figura 6 - Estratégias de funcionalização de NPs para tratamento do CCR. CEA: antígeno carcinoembrionário; FR- α : recetor de folatos; EGFR: recetor do fator de crescimento epidérmico; TAG-72: recetor de glicoproteína-72. Adaptado de: (Cisterna et al., 2016).	33
Figura 7 - Distribuição dos estudos pré-clínicos por aplicação e ano de publicação.	70
Figura 8 - Distribuição dos ensaios clínicos por aplicação e ano de publicação.	70
Figura 9 - Distribuição percentual quanto ao fármaco veiculado nas NPs em fase pré-clínica para tratamento da CCR.	72
Figura 10 - Distribuição percentual quanto ao fármaco veiculado nos ensaios clínicos para tratamento da CCR.	74
Figura 11 - Distribuição percentual por ligando utilizado na funcionalização das NPs direcionadas ao CCR.	78
Figura 12 - Distribuição percentual por tipo de aplicação e por tipo de nanopartícula quanto aos estudos pré-clínicos em desenvolvimento no âmbito do CCR.	81
Figura 13 - Distribuição percentual por tipo de aplicação e por tipo de nanopartícula quanto aos ensaios clínicos a decorrer no âmbito do CCR.	82

Índice de tabelas

Tabela 1 - Classificação TNM para CCR. Adaptado de: (Al B. Benson et al., 2021; NIH, 2015).	13
Tabela 2 - Estádios de CCR e Classificação TNM. Adaptado de: (Al B. Benson et al., 2021).	15
Tabela 3 - Plano de tratamento para estadio III em doentes de baixo e alto risco. Adaptado de: (Al B. Benson et al., 2021).	26
Tabela 4 - Estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de nanopartículas lipossomais em desenvolvimento para o tratamento e teranóstico do CCR.	42
Tabela 5 - Estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de nanopartículas lipídicas (SLNs e NLCs) em desenvolvimento para o diagnóstico e tratamento do CCR.....	44
Tabela 6 - Estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de nanopartículas poliméricas constituídas por PLGA em desenvolvimento para o tratamento do CCR.	47
Tabela 7 - Estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de nanopartículas poliméricas constituídas por quitosano (e seus derivados) em desenvolvimento para o tratamento do CCR.	48
Tabela 8 - Estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de micelas em desenvolvimento para o tratamento e teranóstico do CCR.....	50
Tabela 9 - Estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de dendrímeros em desenvolvimento para o diagnóstico, tratamento e teranóstico do CCR.	52
Tabela 10 - Estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de nanopartículas metálicas em desenvolvimento para o tratamento e teranóstico do CCR.	54
Tabela 11 - Estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de nanopartículas de sílica em desenvolvimento para o diagnóstico, tratamento e teranóstico do CCR.....	57
Tabela 12 - Estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de nanopartículas de carbono em desenvolvimento para o diagnóstico e o tratamento do CCR.....	60
Tabela 13 - Ensaio clínico de nanoformulações para o tratamento do CCR.	63
Tabela 14 - Ensaio clínico de nanoformulações para o diagnóstico do CCR.	67
Tabela 15 - Distribuição dos estudos <i>pré-clínicos</i> e <i>dos ensaios clínicos</i> por tipo de aplicação no CCR.....	69
Tabela 16 - Distribuição dos estudos <i>pré-clínicos</i> e dos ensaios clínicos quanto ao tipo de nanopartícula.	76
Tabela 17 – Distribuição dos estudos <i>pré-clínicos</i> (EP) e dos ensaios clínicos (EC) por tipo de nanopartícula e por aplicação. Os dados estão apresentados como número de EP + número de EC.	80

Capítulo I – Introdução

1. Introdução

O cancro colorretal (CCR) é considerado o terceiro cancro mais comum e a quarta causa de morte por cancro em todo o mundo (Rawla et al., 2019). Apesar de toda a evolução na compreensão da etiologia do cancro e no desenvolvimento de fármacos citotóxicos (Gonçalves et al., 2012), este continua a ser responsável por mais de 1,2 milhões de novos casos e por cerca de 600.000 mortes por ano (Brenner et al., 2014, Rawla et al., 2019).

A quimioterapia convencional tem sido considerada cada vez mais ineficaz no tratamento do cancro devido à sua baixa especificidade, aos seus consequentes efeitos adversos indesejados e à baixa concentração de fármaco no tecido tumoral (Gonçalves et al., 2012; Sebastian, 2017). Os tratamentos *standard* disponíveis devem ser administrados durante longos períodos de tempo de forma a se obter efeito terapêutico, o que geralmente provoca multirresistência aos fármacos pelas células tumorais. Assim, inovações baseadas na nanotecnologia têm sido exploradas como potenciais alternativas (Gonçalves et al., 2012). A aplicação de nanopartículas (NPs) na área da oncologia é considerada vantajosa, pois apresenta alta especificidade para o tumor e elevada concentração em tecidos tumorais. A melhoria da seletividade proporcionada pelas NPs resulta num aumento da eficácia dos fármacos e numa diminuição da ocorrência de efeitos adversos (Carvalho et al., 2020).

1.1. Cancro Colorretal

1.1.1. Epidemiologia

Na prática clínica, o cancro retal e o cancro do cólon são considerados uma única entidade tumoral denominada CCR, que se desenvolve no intestino grosso (Paschke et al., 2018). O cancro do cólon desenvolve-se na parte mais longa do intestino grosso, o cólon, enquanto o cancro retal afeta a última secção do intestino grosso, o reto (Anticancer Fund, 2016).

Em Portugal, o CCR é um tipo de cancro bastante comum. É o segundo mais frequente nas mulheres, depois do cancro da mama, e nos homens, depois do cancro da próstata (SPED, 2021a). Apesar dos avanços terapêuticos e das inovações no diagnóstico, o CCR é o terceiro cancro mais comum em todo o mundo. Com cerca de 600 mil mortes estimadas por

ano, este cancro é a quarta principal causa de morte em todo o mundo (NIH, 2020b; Pan et al., 2017). A principal causa de morte relacionada com este tipo de cancro é a presença de metástases à distância. Em 25% dos pacientes diagnosticados, os mesmos apresentam metástases à distância principalmente no fígado (Kotelevets et al., 2016). Em situações de CCR localizado a probabilidade de sobrevivência a 5 anos é de 90%, em casos de serem identificadas metástases a taxa de sobrevivência a 5 anos desce para 12% (Naeem et al., 2020).

1.1.2. Carcinogénese colorretal

O início da carcinogénese é determinado pelo desenvolvimento de pólipos neoplásicos na mucosa do cólon, estas alterações são pequenos crescimentos no revestimento interno do intestino grosso (NHS, 2020a). Para a determinação do potencial maligno dos pólipos, o estudo da histologia é de extrema importância. Existem dois tipos histológicos de pólipos, os hiperplásicos e os adenomatosos. Os pólipos hiperplásicos são constituídos por células glandulares com muco citoplasmático reduzido, enquanto os núcleos adenomatosos são hipercromáticos e aumentados (Cappell, 2008). Conforme vários estudos epidemiológicos, clínicos e patológicos comprovaram (Aceto et al., 2020; Munding & Tannapfel, 2014; Strum, 2016), a maioria dos CCR surgem de adenomas. O risco de desenvolver CCR é maior com o aumento do número de pólipos adenomatosos. Em casos de doentes com polipose adenomatosa familiar, que desenvolvem milhares de pólipos adenomatosos no cólon, a condição progride para CCR se não realizarem colectomia (Cappell, 2005). Assim, os pólipos adenomatosos são considerados os precursores displásicos do CCR (G. Smith et al., 2002).

1.1.2.1 Patogénese molecular

O aparecimento de CCR, resultante da instabilidade genética, pode seguir diferentes vias moleculares, nomeadamente, instabilidade cromossómica; alta instabilidade de microsatélites (MSI); e fenótipo de metilação de ilhas dinucleótido citosina-guanina (cPg) (Armaghany et al., 2012).

Os CCR causados por instabilidade cromossómica correspondem a 70% dos casos (Cappell, 2008). Esta via também é conhecida como via tradicional de adenoma-carcinoma e segue uma progressão de alterações genéticas e histológicas (Armaghany et al., 2012). Esta

instabilidade pode ocorrer por alterações cromossômicas estruturais e numéricas, por exemplo, alterações que levam à ativação de proto-oncogenes, K-ras, e que levam à inativação de genes supressores de tumores, como os genes APC (gene supressor de tumor da polipose adenomatosa), o MMC (gene supressor de tumor colorrectal), e perda de p53 (Armaghany et al., 2012; Cappell, 2008; Kotelevets et al., 2016). A mutação no gene APC é a mutação mais comum presente no CCR familiar e esporádico. A instabilidade cromossômica pode iniciar a sequência adenoma-carcinoma e/ou surgir durante a evolução para CCR - Figura 1 (Armaghany et al., 2012).

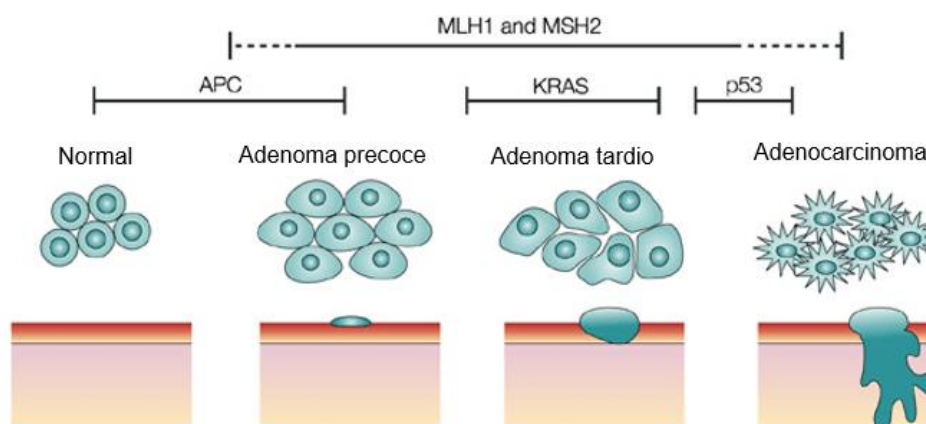


Figura 1 - Sequência adenoma-carcinoma. Adaptado de: (Armaghany et al., 2012).

Apesar da maioria dos casos de CCR estarem associados à via de instabilidade cromossômica, os tumores MSI associados a um sistema de reparação deficiente (MMR) são responsáveis por 12-15% dos casos de CCR esporádicos (Cappell, 2008; Kotelevets et al., 2016). Os tumores MMR/MSI são caracterizados por uma falha no reconhecimento e reparação de bases azotadas durante a replicação do Ácido desoxirribonucleico (DNA) (Cappell, 2008; Kotelevets et al., 2016). Este sistema de reparação é composto por 4 genes e suas proteínas (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2). As mutações no sistema MMR podem provocar a perda de proteínas funcionais e/ou a produção de proteínas não funcionais. Estes dois fatores podem causar deficiência no sistema MMR (Hisato Kawakami, Aziz Zaanani, Frank A. Sinicrope, 2015). As mutações associadas aos genes que codificam as proteínas MSH2 e MLH1 estão associadas à síndrome de Lynch (Pereira, 2013).

Cerca de 10-15% dos casos de CCR têm presente uma proporção bastante elevada de loci CpG com metilação aberrante do DNA (Grady & Markowitz, 2015). O fenótipo de metilação de ilhas CpG pode levar a alteração de expressão genética e provocar silenciamento genético (Klose & Bird, 2006). Nas células normais, as ilhas CpG estão no estado não metilado

e o gene é expresso normalmente. Na presença de metilação, o gene promotor é silenciado. Este silenciamento pode também acontecer a genes supressores de tumores (Armaghany et al., 2012). Nos casos de CCR, o genoma encontra-se globalmente hipometilado. No entanto, ocorre uma hipermetilação da região promotora de alguns genes. Por exemplo, hMLH1 encontra-se metilado neste tipo de carcinoma (Rashid & Issa, 2004).

Todas estas vias de patogénese molecular de CCR estão associadas a uma acumulação gradual de alterações genéticas que provocam ativação ou sobre-expressão de proto-oncogenes e a inativação ou deleção de genes supressores de tumor (Kotelevets et al., 2016; Rashid & Issa, 2004). Assim, a instabilidade genética pode estar presente no início do adenoma e durante a progressão para a malignidade (Armaghany et al., 2012).

1.1.3. Fatores de risco

O aparecimento do CCR está intrinsecamente relacionado com diversos fatores, estes podem ser fatores comportamentais, ambientais, genéticos e podem também estar associados a outras patologias (Argilés et al., 2020). Alguns dos fatores de risco são: idade, etnia, género e predisposição genética (Kotelevets et al., 2016; Naeem et al., 2020). A idade é considerado um fator relevante, uma vez que 70% dos pacientes têm mais de 65 anos e a incidência de CCR é menor em pessoas com menos de 40-45 anos (Argilés et al., 2020). Outros fatores de risco considerados particularmente relevantes são o histórico pessoal ou familiar de CCR e a presença de antecedentes pessoais de pólipos adenomatosos (NIH, 2020b).

Relativamente aos fatores genéticos, cerca de 10-15% dos casos de CCR estão relacionados com síndromes que são causadas por mutações em genes de predisposição para CCR. A predisposição para o desenvolvimento de CCR em famílias com CCR hereditário sem polipose e polipose adenomatosa familiar no cólon é transmissível de forma autossómica dominante (Kotelevets et al., 2016; Pereira, 2013).

As pessoas com a condição polipose adenomatosa familiar apresentam uma mutação no gene APC que provoca o aparecimento de centenas de pólipos no intestino grosso. Assim, num pólipo ou mais pode desenvolver-se um tumor em idade jovem, entre os 20 e 40 anos (Anticancer Fund, 2016).

A síndrome de Lynch ou CCR hereditário sem Polipose é causada por mutações germinais nos genes de reparação de ADN (hMSH2 e hMLH1). Os pacientes com esta

condição têm o risco de a partir de um tumor benigno desenvolver um cancro a um ritmo muito mais acelerado (Anticancer Fund, 2016; Pereira, 2013). O CCR hereditário sem polipose corresponde a 5% dos casos de CCR e a Polipose Adenomatosa Familiar corresponde a 1% dos casos (Kotelevets et al., 2016; Pereira, 2013).

Outras síndromes de CCR com uma incidência mais baixa é a polipose recessiva adenomatosa com mutações no gene *MUTYH* (Kotelevets et al., 2016; Pereira, 2013). Este gene codifica uma enzima que é responsável pela reparação de erros na replicação de DNA, nomeadamente reparação por excisão de bases azotadas. As mutações neste gene levam à produção de enzimas não funcionais e, assim, levam à formação de mutações em outros genes (Sampson et al., 2005).

Outra síndrome de CCR é a síndrome de *Peutz-Jeghers*, que apresenta mutação no gene *STK11* (Kotelevets et al., 2016; Pereira, 2013). Este gene, considerado um gene supressor de tumor, é responsável pela codificação de uma enzima, a serina/treonina quinase 11. Esta enzima é responsável pela regulação da polaridade celular e também promove um tipo de morte programada, a apoptose (NCBI, 2021). As mutações neste gene podem afetar a função supressora de tumor, levando a um crescimento celular descontrolado e, assim, causar a produção de pólipos (MedlinePlus, 2020).

Algumas doenças crónicas estão associadas a um aumento do risco de desenvolver CCR, como a doença inflamatória intestinal, a obesidade e a diabetes (Argilés et al., 2020; Tsilidis et al., 2015).

Os fatores de risco associados ao estilo de vida são, o sedentarismo, o consumo elevado de álcool e de carnes vermelhas, a dieta ocidental rica em gorduras, o tabagismo e os desequilíbrios na microbiota intestinal (Argilés et al., 2020; Cross et al., 2010). A disbiose intestinal e o desequilíbrio na microbiota intestinal podem provocar a produção de espécies reativas de oxigénio, metabolitos e toxinas que podem promover alterações genéticas e epigenéticas que levam a CCR (Kotelevets et al., 2016).

1.1.4. Estadiamento

O estadio do cancro, que descreve a extensão e disseminação do mesmo no corpo humano, é um dos fatores mais significantes na determinação do prognóstico e na avaliação das opções de tratamento (SNS, 2021). Ao longo do tempo foram surgindo várias classificações de estadiamento do CCR. A classificação universal de cancros TNM, desenvolvida pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), é o sistema que considerada três grandes fatores: T - extensão da invasão do tumor primário; N - a invasão de gânglios linfáticos; e M - metástases à distância (NIH, n.d.-b). Na classificação TNM, a descrição do cancro é feita a partir de letras seguidas de números. Esta nomenclatura permite fornecer mais informação sobre o cancro. Na Tabela 1 estão apresentadas as classificações e os respetivos significados (Al B. Benson et al., 2021; NIH, 2015).

Tabela 1 - Classificação TNM para CCR. Adaptado de: (Al B. Benson et al., 2021; NIH, 2015).

TNM		Significado
T	T0	O tumor principal não foi encontrado
	Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
	T1, T2, T3, T4	Extensão do tumor principal **T4a – tumor invade através do peritoneu visceral T4b – tumor invade diretamente ou adere-se a órgãos e estruturas adjacentes
N	N0	O cancro não foi encontrado em gânglios linfáticos
	N1, N2, N3	Quanto maior o número de N maior o número de gânglios linfáticos invadidos ** N1a – 1 gânglio linfático foi invadido N1b – 2 ou 3 gânglios linfáticos foram invadidos N1c – tumor invade tecidos serosos, subserosos, mesentéricos, entre outros N2a – 4 a 6 gânglios linfáticos regionais foram invadidos N2b – 7 ou mais gânglios linfáticos regionais foram invadidos
M	M0	O cancro não se expandiu para outras zonas do corpo
	M1	O cancro apresenta metástases ** M1a – metástase só num órgão, sem metástase peritoneal M1b – metástase em 2 ou mais órgãos, sem metástase peritoneal M1c – metástase na superfície peritoneal

De forma simples, a AJCC criou 5 classificações a partir do sistema TNM, nomeadamente estadio 0, I, II, III e IV - Figura 2 (NIH, 2015). Na Tabela 2 estão representados os estadios e as respetivas características segundo o sistema de classificação TNM. No estadio 0, carcinoma *in situ*, o tumor está delimitado apenas num local, encontra-se apenas na mucosa. No estadio I, o tumor expande-se para a camada submucosa e muscular. O estadio II divide-se nos estadios IIA, IIB e IIC. No estadio IIA, o tumor invade a camada muscular para a camada mais externa da parede do cólon, a serosa; no estadio IIB, o tumor espalha-se através da camada serosa, sem invadir órgãos próximos; no estadio IIC, o tumor invade diretamente outros órgãos. O estadio III apresenta metástases em gânglios linfáticos circundantes. O estadio IV é caracterizado por tumores que têm metástases distantes (Cisterna et al., 2016; NIH, 2015; S. Kim & Lee, 2016).

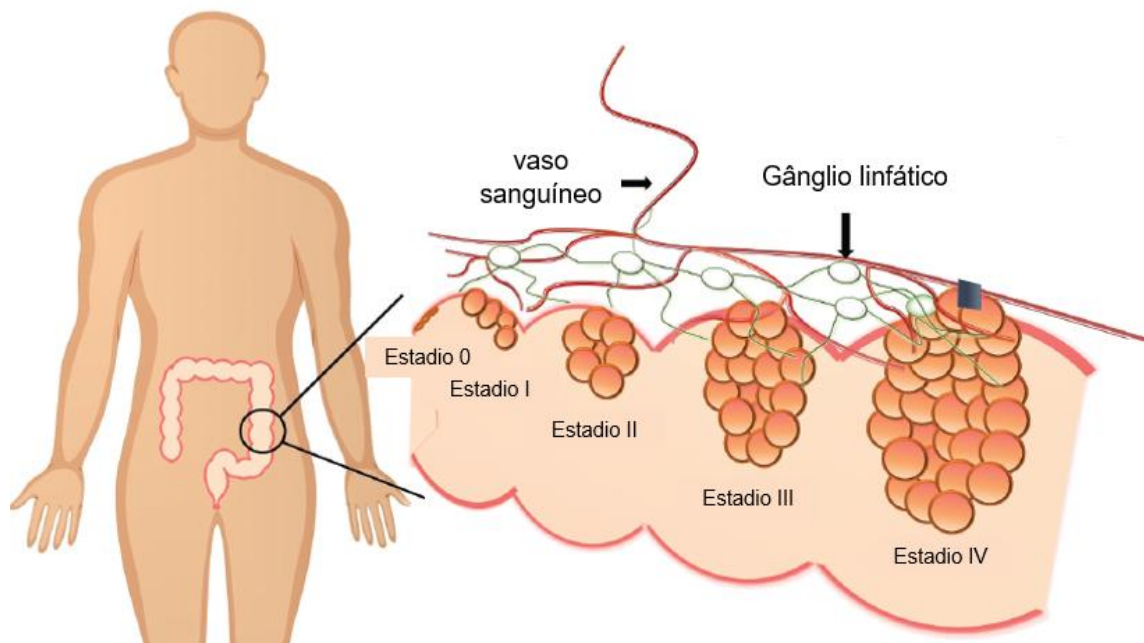


Figura 2 - Estadios do CCR de acordo com AJCC Adaptado de:(Vinchhi & Patel, 2021).

Tabela 2 - Estádios de CCR e Classificação TNM. Adaptado de: (Al B. Benson et al., 2021).

Estádios		T	N	M
Estadio 0		Tis	N0	M0
Estadio I		T1, T2	N0	M0
Estadio II	A	T3	N0	M0
	B	T4a	N0	M0
	C	T4b	N0	M0
Estadio III	A	T1, T2	N1/N1c	M0
		T1	N2a	M0
		T3, T4a	N1/N1c	M0
		T2, T3	N2a	M0
	B	T1, T2	N2b	M0
		T4a	N2a	M0
		T3, T4a	N2b	M0
		T4b	N1, N2	M0
Estadio IV	A	Qualquer T	Qualquer N	M1a
	B	Qualquer T	Qualquer N	M1b
	C	Qualquer T	Qualquer N	M1c

1.1.5. Manifestações clínicas

Num estadio inicial do CCR raramente são observados sintomas (Anticancer Fund, 2016; CDC, 2021). Como o CCR cresce lentamente, este demora até atingir dimensões capazes de causar sintomatologia. Assim, os sintomas observados ocorrem geralmente em fases mais avançadas do cancro (Minhhuyen Nguyen, 2021). As manifestações clínicas geralmente são vagas, pouco específicas, pois podem estar associadas a outras patologias não malignas (Anticancer Fund, 2016).

Existem diversos quadros clínicos resultantes dos sintomas, como alterações nos hábitos intestinais; presença de sangue nas fezes; diarreia ou obstipação intestinal; cólicas persistentes; dor abdominal; perda de peso e anorexia (CDC, 2021). Entre estes sintomas, os menos comuns são náuseas, vómitos e anorexia. As alterações crónicas dos hábitos intestinais não são consideradas sintomas, estão apenas associadas a CCR quando são repentinas e recentes (Cappell, 2008).

O sangue presente nas fezes pode ser de cor viva ou de cor escurecida, sendo que geralmente as fezes parecem normais e não é visível a presença de sangue. Em situações que o sangramento retal é grave, o doente pode apresentar anemia por diminuição de glóbulos vermelhos (American cancer society, 2020). Consequentemente, a anemia pode causar fraqueza, dispneia, fadiga e palpitações (Cappell, 2005).

Em estadios mais avançados, na presença de metástases, o doente pode desenvolver caquexia cancerosa (Cappell, 2005). Esta síndrome é caracterizada por perda de peso corporal, diminuição do músculo esquelético e tecido adiposo, anorexia, astenia e anemia (Raghu Dhanapal, TR Saraswathi, 2011).

1.1.6. Rastreio e Diagnóstico

Segundo a Sociedade Portuguesa de Endoscopia Digestiva, existem duas situações importantes a diferenciar, que são as situações de rastreio na ausência de sintomas e as de diagnóstico na presença de sintomas. O rastreio permite que o tumor seja detetado em fases precoces e que seja possível detetar pólipos previamente ao desenvolvimento do cancro (SPED, 2021a).

O estadio em que é detetado o tumor é um dos fatores mais importantes na determinação do prognóstico (Brenner et al., 2014). Clinicamente, é possível tratar o CCR com sucesso se for diagnosticado precocemente (Pereira, 2013). No entanto, cerca de 90% dos indivíduos com CCR apenas são diagnosticados depois de surgir algum sintoma ou existir alterações laboratoriais e radiográficas. Nos pacientes diagnosticados com sintomas, os tumores têm dimensões maiores e apresentam-se num estadio mais avançado do que os tumores detetados em pacientes assintomáticos. Os dados relativos ao CCR tendem a melhorar com o incremento da implementação de exames complementares ao rastreio de CCR (Moreno et al., 2016).

De acordo com as recomendações de *American Society of Colon*, os métodos de rastreio de 1º linha são a colonoscopia e a pesquisa de sangue oculto por método imunoquímico (Wolf et al., 2018).

1.1.6.1 Exame Físico e historial médico

O médico questiona o paciente sobre possíveis fatores de risco e historial médico. Também é tido em conta a sintomatologia e a duração da mesma. Relativamente ao exame físico propriamente dito, o médico apalpa o abdómen de forma a detetar alguma massa ou órgão dilatado e também inspeciona o resto do corpo.

Outro exame que também pode ser feito nesta fase é o exame retal digital. O procedimento baseia-se na inserção de um dedo indicador lubrificado no interior do reto do paciente com o objetivo de detetar qualquer anomalia (American Cancer Society, 2020c; Anticancer Fund, 2016).

1.1.6.2 Testes de deteção de sangue nas fezes

Entre os testes não invasivos, o método mais comum é a pesquisa de sangue oculto nas fezes (Świdarska et al., 2014). O exame fecal com guáiacó é o teste mais utilizado para detetar sangue oculto nas fezes, esta técnica baseia-se na reação do heme (precursor da hemoglobina) com a peroxidase. Este teste é considerado pouco específico, pois pode reagir com outras peroxidases nas fezes, como as provenientes da dieta, como frutas e vegetais (World Gastroenterology Organisation, 2007). Uma vez que este teste tem apenas uma sensibilidade de 50-60% (World Gastroenterology Organisation, 2007) tem vindo a ser substituído pelo teste imunoquímico das fezes. De acordo com a *European Society for Medical Oncology* (ESMO), este teste tem uma melhor resolução na deteção de adenomas e cancros (Argilés et al., 2020). Nesta técnica, a hemoglobina é detetada através de técnicas mais sensíveis e específicas e o paciente não necessita de ser submetido a restrições alimentares (World Gastroenterology Organisation, 2007).

1.1.6.3 Exames laboratoriais

Um dos exames laboratoriais mais comuns é o hemograma completo, este exame confirma o diagnóstico de anemia causada pelo CCR. As enzimas hepáticas são analisadas para avaliar a função hepática, uma vez que é comum existir metástases do CCR no fígado (American Cancer Society, 2020c).

A deteção de marcadores tumorais é outro exame possível no diagnóstico do CCR. Os marcadores tumorais são substâncias produzidas pelo tumor e são detetáveis nas análises clínicas. O marcador tumoral específico para o CCR é o fator antigénio carcinoembrionário (CEA). Apesar de ser um marcador específico e quando detetado sugerir o diagnóstico de CCR, este teste não é suficiente se feito isoladamente (American Cancer Society, 2020c).

Ainda se pode desenvolver o teste de DNA do CCR, este teste deteta alterações no DNA em adenocarcinomas colorretais (Świdarska et al., 2014) e tem uma sensibilidade de 52%, enquanto o teste de guáiacó apenas tem 13% (World Gastroenterology Organisation, 2007). No entanto, estes testes moleculares no diagnóstico do CCR tem aplicabilidade limitada e estão associados a custos extremamente elevados (Świdarska et al., 2014).

1.1.6.4 Endoscopia

De acordo com as *guidelines* da ESMO, a colonoscopia completa é a técnica recomendada para rastrear CCR em pessoas que apresentem risco médio. É a técnica recomendada pois, comparada com outros métodos, é a que apresenta maior sensibilidade e especificidade. Nos casos negativos, idealmente a técnica deve ser repetida num período de 10 anos (Argilés et al., 2020). Nesta técnica é utilizado o colonoscópio, um instrumento fino, longo e flexível que consegue atravessar todo o intestino grosso (Anticancer Fund, 2016). Este instrumento é iluminado com uma pequena câmara de vídeo na extremidade e é compatível com outros instrumentos de biópsias (American Cancer Society, 2020c). Todavia, esta técnica apresenta desvantagens, destaca-se o desconforto e a possível perfuração ou sangramento do intestino grosso. Estes riscos e complicações levam a que os pacientes evitem estes exames (Świderska et al., 2014).

Outro exame alternativo, caso os pacientes recusem a colonoscopia, é a sigmoidoscopia (Argilés et al., 2020). Neste procedimento, o instrumento utilizado é o sigmoidoscópio, um instrumento flexível que é introduzido na parte distal do intestino grosso, acima do reto (Anticancer Fund, 2016). A preparação intestinal nesta técnica é mais fácil, não é necessário sedação e o tempo do procedimento é menor em comparação com a colonoscopia. Esta técnica é aplicável a indivíduos que não apresentem sintomas para uma deteção precoce (World Gastroenterology Organisation, 2007).

Nas situações em que há suspeita de cancro retal, os médicos optam pelo exame proctoscopia. O instrumento utilizado é o proctoscópio, é fino, mais rígido com a finalidade de analisar a parede interna do reto. A partir das imagens obtidas pela câmara de vídeo, o médico consegue determinar a dimensão e a localização do tumor (American Cancer Society, 2020c).

1.1.6.5 Biópsia

As técnicas endoscópicas anteriormente referidas, apesar de invasivas, apresentam diversas vantagens (Argilés et al., 2020), nomeadamente a possibilidade de realizar biópsias. Durante os procedimentos endoscópicos podem ser removidos pólipos ou amostras de tecido intestinal com suspeita de apresentarem anormalidades. Após esta remoção, o tecido é submetido a um exame histopatológico em laboratório para verificar a presença de células cancerígenas (Anticancer Fund, 2016; Cancer Treatment Centers of America, 2021). A

informação obtida neste exame histopatológico permite verificar características específicas do CCR e confirmar o diagnóstico (Anticancer Fund, 2016).

1.1.6.6 Técnicas de Imagiologia

A imagiologia permite obter informações anatómicas do CCR, por exemplo, a partir de tomografias computadorizadas (TC), e características funcionais, a partir de tomografias por emissão de positrões (Bruening et al., 2014).

A TC utiliza raios-X, que são absorvidos de forma diferente pelos diversos tecidos, e a partir dessa informação fornece imagens tridimensionais da anatomia interna (Bruening et al., 2014). As imagens mostram a presença de quaisquer anormalidades ou tumores. Este teste permite definir o tamanho do tumor e verificar a sua presença nos gânglios linfáticos próximos, nos pulmões, no fígado ou em outros órgãos (American Cancer Society, 2020c). Nos casos em que a colonoscopia é recusada por parte do paciente ou na presença de comorbidades que dificultam a sua realização, como tumores obstrutivos, pode ser utilizada a colonoscopia virtual por TC (Anticancer Fund, 2016; Badea et al., 2016). Esta técnica tendo já a vantagem de ser pouco invasiva, ainda permite examinar o interior do colon e do reto a partir de imagens por raios-X (Badea et al., 2016).

A ultrassonografia utiliza ondas sonoras para obter imagens dos órgãos internos. O instrumento utilizado é o transdutor, que está responsável pela emissão das ondas sonoras e pela captação dos ecos refletidos pelos órgãos (NIH, n.d.-a). Na ultrassonografia endorectal, o transdutor é inserido no reto e é útil para se verificar o crescimento do tumor na parede retal e nos órgãos adjacentes (American Cancer Society, 2020c). Este exame é acessível, indolor e de fácil aceitação pelos pacientes, é assim um dos primeiros métodos a considerar quando os pacientes apresentam alterações dos movimentos intestinais, sintomas ou doenças abdominais (Badea et al., 2016).

A ressonância magnética nuclear (RM) é uma tecnologia não invasiva que utiliza ondas de radiofrequência na presença de um forte campo magnético para obter imagens tridimensionais detalhadas do interior do corpo (NIH, 2016; NHS, 2018). Como diferentes tecidos produzem sinais diferentes, é possível identificar os vários tipos de tecidos (NHS, 2018). Esta técnica pode ser aplicada em várias áreas anatómicas, nomeadamente, fígado, cérebro e medula espinal, possíveis locais de disseminação do CCR (American Cancer Society, 2020c).

Na tomografia por emissão de positrões, um análogo radioativo da glicose é injetado no sangue (NHS, 2021). Este radiomarcador acumula-se em tecidos com maior atividade metabólica e como as células tumorais metabolizam grandes quantidades de glicose, estas áreas podem ser observadas nas imagens obtidas por esta técnica (Bruening et al., 2014). Este tipo de tomografia é realizada para localizar metástases e determinar a natureza maligna de lesões quando associada a outra técnica como a TC (Anticancer Fund, 2016).

Em Portugal, existe um programa de rastreio oncológico do CCR, em que é desenvolvido o teste de pesquisa de sangue oculto nas fezes pelo método imunoquímico entre as idades 50 e 74 anos. O teste deve ser repetido 2 em 2 anos (Gabinete do secretário de estado e adjunto da saúde, 2017). Este programa demonstrou uma diminuição de 20% da mortalidade associada ao CCR (SNS, 2020b).

1.1.7. Tratamento

1.1.7.1. Opções de Tratamento

A escolha do tratamento para o CCR depende de diversos fatores, nomeadamente da extensão de disseminação do cancro (NHS, 2019).

As opções terapêuticas são: cirurgia, quimioterapia, imunoterapia, radioterapia e técnicas endoscópicas. A cirurgia é o tratamento mais comum em todos os estadios do CCR (NIH, 2020a), pode ser aplicada com o objetivo de remover o tumor principal no cólon ou de remover lesões metastáticas (Anticancer Fund, 2016). A colectomia envolve a remoção de uma parte do cólon em que posteriormente as partes saudáveis são unidas através de métodos cirúrgicos (NCCN, 2021). Na cirurgia ao tumor principal, o médico remove o segmento intestinal onde estão localizados o tumor, os gânglios linfáticos regionais e os órgãos adjacentes invadidos pelo tumor. A cirurgia de ressecção das metástases deve ser considerada e pode ter bons resultados se a localização das metástases não representar um elevado risco operatório e se após a ressecção da metástase o tecido restante seja suficientemente funcional (Anticancer Fund, 2016). O estadio clínico do cancro é analisado anteriormente à cirurgia através de exames clínicos e radiológicos. No entanto, depois de se analisar o tecido tumoral ressecado na cirurgia, o estadio definitivo é conhecido e assim o plano de tratamento pode ser ajustado (Anticancer Fund, 2016).

A quimioterapia define-se como a administração de fármacos citotóxicos que destroem as células tumorais, afetando o seu crescimento e a sua divisão. Estes fármacos não atuam de forma seletiva, afetam as células tumorais, mas também as células saudáveis, o que pode causar diversos efeitos secundários (IPO, n.d.). A quimioterapia adjuvante é administrada após um tratamento curativo, por exemplo, após cirurgia e visa prevenir a disseminação de metástases. A quimioterapia neoadjuvante é administrada antes da cirurgia de forma a reduzir o tamanho do tumor para posteriormente ser possível a cirurgia (NHS, 2020b) (SNS, 2020a). A quimioterapia pode ser administrada por via intravenosa ou por vi oral e o tratamento pode consistir apenas num fármaco ou numa combinação de fármacos (NHS, 2020b).

A determinação do plano da quimioterapia depende de diversos fatores, nomeadamente do estadio do cancro, presença de características patológicas de alto risco, presença de MSI e idade do doente (C. Wu, 2018). Os citotóxicos que são utilizados no tratamento do CCR são, as fluoropirimidinas: 5-Fluorouracilo (5-FU), capecitabina ou o

Tegafururacilo, e a leucovorina (LV), oxaliplatina (OP) e irinotecano (IRI). Por norma a LV é utilizada em combinação com o 5-FU, uma vez que melhora a eficácia do mesmo. As fluoropirimidinas possuem interações sinérgicas quando combinadas com outros fármacos citotóxicos, nomeadamente a OP e o IRI (Anticancer Fund, 2016). Este grupo Farmacoterapêutico, como componente da terapia adjuvante e antimetastática, têm aumentado a sobrevida dos doentes diagnosticados com CCR (Chabner B, Lynch T, 2014). O mecanismo de ação das fluoropirimidinas é a inibição da enzima Timidilato sintase, que possui um papel essencial na síntese de DNA. Este grupo de fármacos é dividido em três metabolitos - fluorodeoxiuridina, trifosfato de fluoro-desoxiuridina e trifosfato de fluorouridina - que possuem efeitos farmacodinâmicos através da sua incorporação no DNA (Klein Teri E, 2011). O 5-FU é metabolizado em fluorodeoxiuridina, que se liga e inibe a enzima Timidilato Sintase. A LV, pertencente ao grupo Antifolatos, é convertida em outro folato que estabiliza a ligação do fluorodeoxiuridina à enzima Timidilato Sintase, o que aumenta a inibição desta enzima (FDA, 2011). O mecanismo de ação da OP baseia-se na formação de ligações cruzadas na cadeia de DNA, que provoca a interrupção da síntese do mesmo (Infarmed I.P., 2012). O IRI, sendo um inibidor da topoisomerase I do DNA, o seu mecanismo de ação baseia-se precisamente na inibição desta enzima. Esta inibição induz lesões na cadeia simples de DNA que provoca bloqueios na replicação de DNA (Infarmed I.P., 2009).

Os principais anticorpos monoclonais utilizados na terapia biológica dirigida são: bevacizumab, cetuximab, panitumumab, afibercept e regorafenib. O mecanismo de ação do bevacizumab é inibir o fator de crescimento do endotélio vascular, este fator de crescimento é um dos principais fatores responsáveis pela vasculogénese e angiogénese. As células do CCR produzem grandes quantidades de fatores de crescimento do endotélio vascular, e o bevacizumab bloqueia a formação de novos vasos sanguíneos à volta e no interior do tumor (Anticancer Fund, 2016; EMA, 2010). O cetuximab e panitumumab são anticorpos monoclonais com especificidade para o recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). Este fator encontra-se em altas concentrações na superfície das células colorretais, a sua ligação com estes anticorpos monoclonais interfere com o crescimento das células neoplásicas (EMA, 2009; EMA, 2015).

De acordo com a *American Cancer Society*, a radioterapia pode ser aplicada em determinadas situações, como: antes da cirurgia para diminuir o tamanho do tumor, depois da cirurgia nos casos em que o tumor aderiu a outro órgão interno, em combinação com a quimioterapia e também para aliviar possíveis sintomas nas situações de estadios mais avançados (American Cancer Society, 2020b). A radioterapia é recomendada no cancro retal e deve ser administrada sempre que possível. Os doentes com cancro retal com alto risco de

recidiva devem ser submetidos a radioterapia no pós-operatório caso não tenham sido no pré-operatório (Anticancer Fund, 2016).

Como referido anteriormente, a determinação do plano da terapêutica depende de diversos fatores, nomeadamente do estadio do cancro (C. Wu, 2018), de seguida estarão descritas as recomendações para o plano de tratamento de cada estadio do CCR.

1.1.7.2. Estadio 0

De acordo com as recomendações de prática clínica da ESMO, o plano de tratamento para o estadio 0 do CCR é a remoção do tumor por cirurgia (Anticancer Fund, 2016). O tumor pode ser removido através de uma simples excisão local ou, em casos de lesões maiores, da ressecção de uma parte do cólon (NIH, 2021a). Como neste estadio o cancro está localizado apenas na mucosa intestinal, não é necessário recorrer a outro tratamento adicional (Anticancer Fund, 2016).

1.1.7.3. Estadio I

O tratamento *standard* para o estadio I do CCR é também a cirurgia. Como neste estadio o tumor pode afetar a camada muscular do intestino, a ressecção cirúrgica é mais profunda. O segmento do cólon afetado e os gânglios linfáticos regionais devem ser removidos (NIH, 2021d). Tal como no estadio 0, no estadio I o tumor é local e não requer outro tratamento (Anticancer Fund, 2016).

1.1.7.4. Estadio II

No estadio II, o cancro pode afetar a camada muscular e serosa do intestino e pode ainda, numa fase mais avançada, invadir órgãos adjacentes. O tratamento *standard* para este estadio continua a ser a cirurgia com a finalidade de remover o tumor, os gânglios linfáticos regionais e os órgãos adjacentes afetados (Anticancer Fund, 2016; NIH, 2021b). No caso dos doentes com alto risco de desenvolver recidivas do tumor é recomendado quimioterapia adjuvante. Assim, o tratamento primário e inicial é a cirurgia e a quimioterapia adjuvante é adicionada de forma a prevenir a recidiva do tumor (Anticancer Fund, 2016). Os doentes são

considerados de alto risco se o cancro é de estadio IIb ou se apresentarem alguma das características a seguir mencionadas: tumor obstrutivo, tumor invasivo aos órgãos adjacentes, histologia do tumor pouco diferenciada, invasão do tumor a tecidos linfáticos, vasculares ou perineurais (Anticancer Fund, 2016; NIH, 2021b).

As opções de esquemas terapêuticos na quimioterapia adjuvante no estadio II de CCR estão representadas na Figura 3. A quimioterapia pode consistir em 6 meses de tratamentos com OP e 5-FU/LV por via intravenosa, esta combinação é conhecida por FOLFOX (BC Cancer, 2021a). No entanto, pode ser substituída pela combinação CAPEOX, capecitabina com OP durante 3 meses (BC Cancer, 2021b). Outra opção é um esquema terapêutico de 6 meses com 5-FU/LV (BC Cancer, 2019) ou com capecitabina por via oral (BC Cancer, 2021c). A sobrevivência dos pacientes submetidos ao tratamento com FOLFOX foi demonstrado em doentes que apresentem múltiplos fatores de risco de recidiva no estadio II de CCR, não sendo indicado em pacientes com baixo risco (Al B. Benson et al., 2021).

A taxa de sobrevida relatada em 5 anos após ressecção cirúrgica no estadio II é entre 68% e 83%. No entanto, foi descrito que a quimioterapia adjuvante com o citotóxico 5-FU diminui o risco de morte em 3-5% (Argilés et al., 2020).

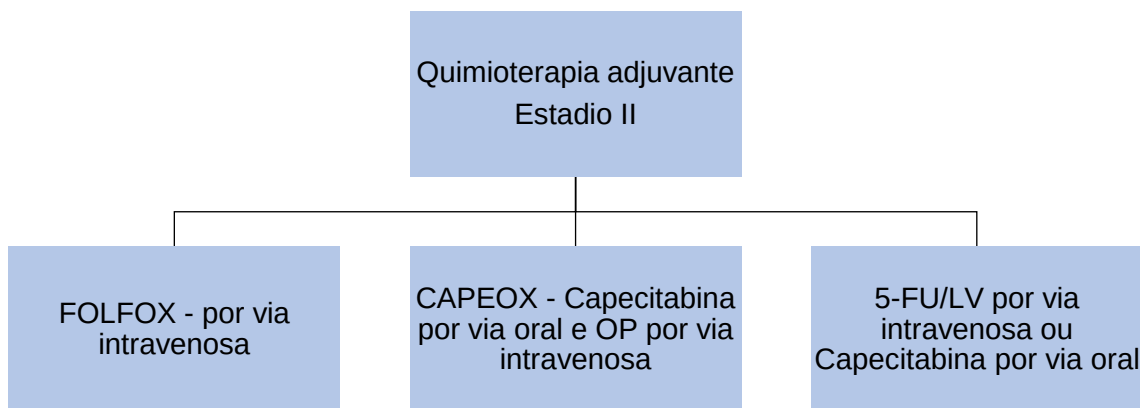


Figura 3 - Recomendações para Quimioterapia Adjuvante para o estadio II de CCR. Adaptado de: (Al B. Benson et al., 2021).

1.1.7.5. Estadio III

Nos casos de CCR de estadio III, o cancro não é local e, por isso, para além da cirurgia é necessário incluir quimioterapia adjuvante de modo a prevenir futuras recidivas. Na cirurgia, o médico remove o segmento intestinal afetado pelo tumor, mas também os gânglios linfáticos regionais e os órgãos adjacentes afetados (Anticancer Fund, 2016). A escolha do tratamento adjuvante depende se o doente é de baixo ou alto risco - Tabela 3. O tratamento preferencial para doentes com baixo risco no estadio III, isto é, T1-3, N1, é 3 meses de CAPEOX (Haller et al., 2011; Schmoll et al., 2007) ou 3-6 meses de FOLFOX (Grothey et al., 2018). Para pacientes em que a terapêutica com OP não é apropriada, existe a hipótese de terapêutica isolada durante 6 meses de Capecitabina ou de 5-FU/LV (Al B. Benson et al., 2021; Haller et al., 2005).

Tabela 3 - Plano de tratamento para estadio III em doentes de baixo e alto risco. Adaptado de: (Al B. Benson et al., 2021).

Fármacos/Combinação	
Estadio III	Preferencial: CAPEOX (3 meses) ou FOLFOX (3-6 meses)
Baixo risco	Alternativa: Capecitabina (6 meses) ou 5-FU/LV (6 meses)
Estadio III	Preferencial: CAPEOX (3 – 6 meses) ou FOLFOX (6 meses)
Alto risco	Alternativa: Capecitabina (6 meses) ou 5-FU/LV (6 meses)

De acordo com as *guidelines* da *National Comprehensive Cancer Network*, o tratamento recomendando para doentes em estadio III de maior risco - nomeadamente com as seguintes características: T4, N1-2 ou qualquer T, N2 - é 6 meses de FOLFOX, ou 3-6 meses de CAPEOX (Al B. Benson et al., 2021). A alternativa para as situações em que o tratamento com OP não é aplicável, consiste em 6 meses de capecitabina isolada ou de 5-FU/LV (Al B. Benson et al., 2021; Twelves et al., 2005).

1.1.7.6. Estadio IV

No estadio IV, o tumor apresenta metástases distantes, pelo que a determinação do tratamento depende dos locais onde se encontra a doença metastática (NIH, 2021c).

Nos casos de doença metastática no fígado, as opções de tratamento são: a cirurgia, quimioterapia neoadjuvante, adjuvante e ablação local. A cirurgia é apropriada num quadro com as seguintes situações: função hepática suficiente, número limitado de lesões, não existir envolvimento vascular e não apresentar doença hepática. Em situações que as metástases hepáticas são consideradas irressecáveis, após uma boa resposta à quimioterapia, são possíveis candidatas à ressecção (NIH, 2021c).

De acordo com as *guidelines* da *National Comprehensive Cancer Network*, o plano de tratamento adjuvante de doentes em estadio IV é bastante semelhante ao descrito anteriormente relativamente ao estadio II e III (Al B. Benson et al., 2021). Neste estadio acresce um fármaco, o IRI, que é integrado em combinações já anteriormente referidas, tal como se especifica na Figura 4 (Anticancer Fund, 2016).

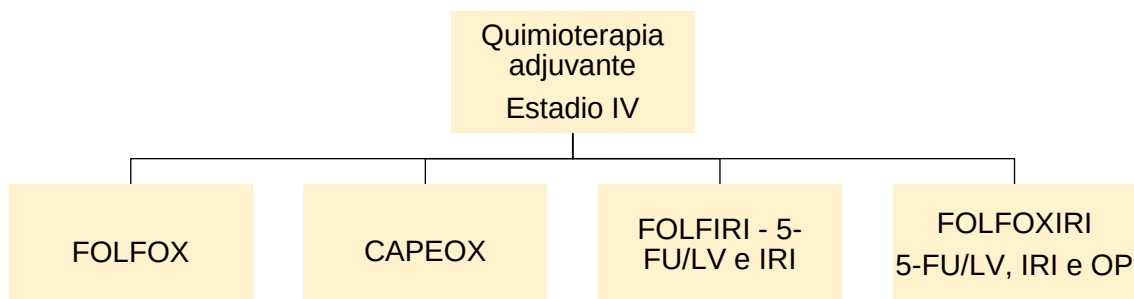


Figura 4 - Combinações de quimioterapia para quimioterapia adjuvante para o estadio IV de CCR. Adaptado de: (Anticancer Fund, 2016).

Os anticorpos monoclonais utilizados na terapia biológica neste estadio são: afibercept, bevacizumab, cetuximab, panitumumab e regorafenib. O afibercept é administrado por via endovenosa e apenas em combinação com FOLFIRI em situações em que o doente já fez terapia com OP. O bevacizumab pode ser administrado com as restantes combinações de quimioterapia, o cetuximab e panitumumab podem ser utilizados em monoterapia ou em conjunto com as combinações de quimioterapia. Por último, o regorafenib é apenas utilizado em monoterapia e em situações em que os doentes já fizeram as outras opções de tratamento (Anticancer Fund, 2016).

1.2. Nanotecnologia

A nanotecnologia define-se como a ciência que estuda abordagens de desenvolvimento de materiais à nanoescala (Ramsden, 2016). Esta tecnologia estuda e desenvolve processos para produzir materiais, estruturas e sistemas a dimensões inferiores a 100 nm (Fatal & Eugénio, 2010). A *National Nanotechnology Initiative* define nanotecnologia como a ciência, engenharia e tecnologia em nanoescala, cuja aplicação pode ser em diversas áreas, nomeadamente, química, física, biologia, eletrónica e medicina (Bayda et al., 2020). A nanotecnologia, no âmbito da saúde, é uma ciência que apresenta inúmeras vantagens, tais como, permitir detetar doenças precocemente, melhorar o tratamento e reduzir os custos associadas à saúde (Satakar et al., 2016).

Os nanomateriais apresentam vantagens face a outros materiais, nomeadamente, uma elevada área de superfície, isto é, apresentam uma grande superfície disponível para possíveis interações, possibilidade de desenvolver dispositivos ultra-pequenos e menos invasivos e para análise, como biópsias, é necessária uma quantidade menor de amostra (Boisseau & Loubaton, 2011).

A nanomedicina define-se como a aplicação da nanotecnologia na medicina. As áreas de aplicação da nanomedicina são, entre outros, sistemas de veiculação de fármacos e sistemas para diagnóstico *in vitro*, *in vivo* e imagiologia (Boisseau & Loubaton, 2011). Esta ciência tem sido alvo de crescente interesse por parte da indústria farmacêutica e diversas entidades financiadoras (Satakar et al., 2016). A nanomedicina divide-se então em duas sub-áreas: a) o nanodiagnóstico, em que a tecnologia é aplicada ao diagnóstico de doenças e b) a nanoterapêutica, em que a tecnologia é aplicada ao desenvolvimento de sistemas de veiculação de agentes terapêuticos.

O nanodiagnóstico centra-se na aplicação de tecnologias mais sensíveis, como a utilização de nanomarcadores avançados que, após a sua ligação a biomarcadores específicos, são detetáveis (Gaurab et al., 2014).

Nos últimos anos, o uso de NPs no âmbito de aplicações biomédicas tem estado em rápido crescimento. Em particular quanto à nanoterapêutica, as NPs são vantajosas, pois são altamente ajustáveis, geralmente biocompatíveis e podem ser funcionalizadas de forma a transportar e aumentar a acumulação de fármaco no alvo terapêutico (Richards et al., 2016). Para além disso, a aplicação da nanotecnologia no desenvolvimento de sistemas de veiculação apresenta inúmeras vantagens, tais como, evitar a degradação de fármacos antes de atingir o alvo terapêutico, aumentar a biodisponibilidade de fármacos e direcionar os

fármacos de forma mais específica. Por exemplo, em terapêuticas com citotóxicos é possível direcionar o fármaco para as células tumorais, evitando os efeitos adversos resultantes da interação do fármaco com células saudáveis (Boisseau & Loubaton, 2011; Omid C. Farokhzad, 2007).

A nanotecnologia pode ser aplicada com um intuito teranóstico. A abordagem teranóstica tem sido largamente utilizada na abordagem terapêutica ao cancro e define-se como a combinação de terapia e diagnóstico. Neste conceito, NPs teranósticas têm como funções: diagnosticar a doença, definir o local exato, determinar o estadio da doença e ainda fornecer informações sobre a resposta ao tratamento. Estas NPs transportam o fármaco e ainda fornecem informações a partir do reconhecimento de estímulos moleculares (Boisseau & Loubaton, 2011; Patra et al., 2018).

Na definição de nanotecnologia, o tamanho dos nanomateriais deve ser inferior a 100 nm. No entanto, na área da nanomedicina, o tamanho da NP pode ser até 1 μm (Thorley & Tetley, 2013). Os sistemas nanoparticulados podem variar desde alguns nanómetros, como micelas, até centenas de nanómetros como lipossomas (Boisseau & Loubaton, 2011). As NPs podem ter diversos tamanhos e formas e podem ser classificadas de acordo com o tamanho, forma e propriedades químicas. A classificação em função das propriedades químicas divide as NPs em orgânicas, inorgânicas e à base de carbono (Jeevanandam et al., 2018).

As NPs orgânicas são constituídas por polímeros ou lípidos e incluem, por exemplo, nanoesferas, nanocápsulas, micelas, dendrímeros e lipossomas - Figura 5 (Conniot et al., 2014; Ealias & Saravanakumar, 2017).

As NPs poliméricas são nanossistemas coloidais sólidos, em que o fármaco é dissolvido, adsorvido ou encapsulado na matriz do polímero constituinte. Os polímeros sintéticos mais utilizados para constituir a matriz polimérica são: ácido polilático-co-glicólico (PLGA), ácido polilático e policaprolactona (PCL). Para além disso, a matriz polimérica pode ser constituída por polímeros naturais, nomeadamente, ácido hialurónico, colagénio, quitosano, albumina e gelatina. Este tipo de NPs pode ainda subdividir-se em nanoesferas ou nanocápsulas. Nas nanoesferas, o fármaco encontra-se disperso na matriz polimérica. As nanocápsulas funcionam como um reservatório, já que o fármaco está confinado a uma cavidade rodeada por material polimérico (E. Wang & Wang, 2014; Gaurab et al., 2014; Prabhu et al., 2015).

Outro tipo de NPs baseadas em polímeros são os dendrímeros. Os dendrímeros são moléculas poliméricas altamente ramificadas de tamanho nanométrico, com uma estrutura bem definida. São compostos por monómeros naturais ou sintéticos, nomeadamente

aminoácidos, açúcares e nucleótidos (E. Wang & Wang, 2014). Estas NPs são amplamente reconhecidas pela sua polivalência, estabilidade química e solubilidade (Abbasi et al., 2014).

As micelas poliméricas são sistemas nanotecnológicos esféricos formados por copolímeros anfífilos, que ao deter duas regiões distintas com afinidades opostas, formam micelas em solventes orgânicos (Garrec et al., 2004). Formam assim, estruturas ramificadas em que a camada externa hidrofílica confere estabilidade à região central hidrofóbica (Gaurab et al., 2014). No núcleo hidrofóbico é possível armazenar diversos fármacos e em quantidades substanciais, e nos casos de fármacos hidrofóbicos, aumentar a sua solubilidade em água. A libertação do fármaco neste tipo de NP pode ser controlado por fatores externos como pH, temperatura, ultrassom, entre outros (Gaurab et al., 2014; Garrec et al., 2004).

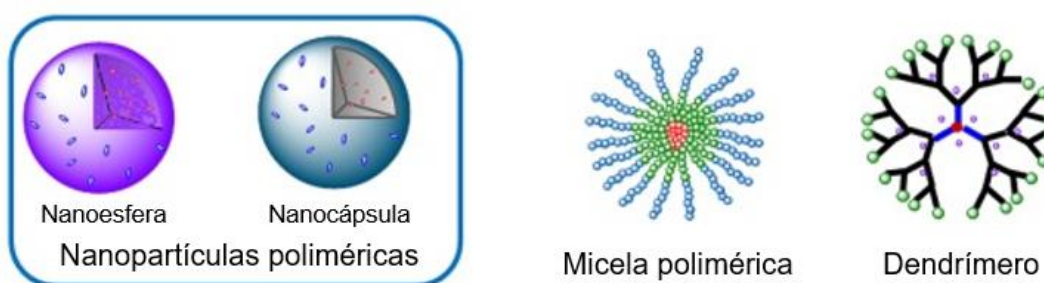


Figura 5 - Tipos de nanossistemas poliméricos. Adaptado de: (Conniot et al., 2014).

As NPs orgânicas podem também ser constituídas por lípidos e, neste caso, subdividem-se em nanossistemas vesiculares como os lipossomas e NPs lipídicas. Os nanossistemas vesiculares mais utilizados são os lipossomas, os quais são esferas à escala nanométrica que compreendem um núcleo revestido por uma bicamada fosfolipídica. Este tipo de NPs aumentam a solubilidade de fármacos e aumentam diversas propriedades, tais como, melhoram o índice terapêutico, reduzem efeitos adversos e aumentam a atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* (Gaurab et al., 2014).

As NPs lipídicas com matriz sólida são de dois tipos: NPs lipídicas sólidas (SLNs) e transportadores lipídicos nanoestruturados (NLCs) (Ganesan & Narayanasamy, 2017). As SLNs, como apresentam matrizes sólidas têm a capacidade de proteger o fármaco de degradação química e libertá-lo de forma controlada (Yang & Merlin, 2020). Uma das limitações deste tipo de NPs é a baixa capacidade de carga de fármaco, devido à sua rede de cristal lipídico densamente compacto. Para superar esta limitação, os NLCs foram desenvolvidos de forma a incorporarem mais moléculas de fármaco. Como são compostos por lípidos líquidos e sólidos, as diferenças estruturais criam imperfeições na matriz, o que permite acomodar mais fármaco (Ganesan & Narayanasamy, 2017).

As NPs inorgânicas são partículas que na sua composição não contêm carbono. Esta categoria inclui as NPs à base de metal e óxido de metal. A classe de NPs à base de metal são maioritariamente compostas por alumínio, ouro, ferro, prata, entre outros (Ealias & Saravanakumar, 2017). As NPs à base de óxidos de metais são projetadas de forma a modificar as características de respetivas NPs à base de metal. Neste grupos estão incluídas as NPs de óxido de ferro superparamagnéticas (SPIONs) (Omid Veisheh, Jonathan Gunn, 2010). Estas últimas exibem superparamagnetismo dependendo do tamanho, o que permite que se tornem magnetizados com a aplicação de um campo magnético externo. Assim, têm sido investigados para agentes de contraste para imagiologia, pois apresentam baixa toxicidade e alta especificidade de imagem (E. Wang & Wang, 2014).

As NPs à base de carbono são compostas unicamente de carbono. Incluem nanotubos de carbono, fulerenos, grafenos, entre outros (Ealias & Saravanakumar, 2017). Este tipo de NP tem vindo a mostrar um crescente desenvolvimento na prática clínica. O diâmetro máximo da NP de carbono é de 150 nm, que é exatamente o tamanho adequado para os vasos linfáticos - entre 120 e 500 nm. Assim, as NPs podem seletivamente entrar apenas nestes. A retenção das NPs permite localizar os vasos linfáticos e linfonodos, o que permite determinar a extensão da dissecação (Zhang et al., 2016).

1.2.1. Funcionalização de nanopartículas

Para direcionar de forma mais seletiva o fármaco para o alvo terapêutico é possível funcionalizar as NPs de forma passiva, ativa ou física. O tipo de funcionalização ativa define-se como a utilização de ligandos na superfície das NPs que apresentam elevada afinidade e especificidade ao alvo terapêutico (Naeem et al., 2020). Os ligandos presentes na superfície das NPs facilitam a sua ligação a recetores sobre-expressos na superfície da célula alvo e, assim, facilita a internalização do fármaco mediada pelo recetor. Os ligandos usados para este tipo de vetorização são anticorpos ou fragmentos específicos de anticorpos, proteínas, pequenas moléculas e aptâmeros. As vantagens deste tipo de funcionalização incluem a diminuição de interações não específicas e consequente diminuição da concentração de fármaco em tecidos não alvo e, ainda, a melhoria da distribuição do fármaco e da eficácia da terapêutica (Wakaskar, 2018).

Em certas condições, o endotélio dos vasos sanguíneos torna-se mais permeável comparativamente ao tecido saudável, como é o caso da vasculatura de um tumor. A elevada permeabilidade e a fraca capacidade de drenagem do sistema linfático do tumor permitem a

permeação seletiva de algumas macromoléculas e nanossistemas para o estroma tumoral (Attia et al., 2019). A encapsulação de fármacos em nanossistemas fornece alguma seletividade tumoral e diminui efeitos adversos. Este tipo de funcionalização é denominada funcionalização passiva e depende de diversos fatores, nomeadamente do tamanho da NP, da vasculatura e fluidez do tumor, do tempo de semi-vida e do tempo de circulação do fármaco no tumor (Fang et al., 2011; Gholami & Engel, 2018).

A funcionalização física é uma estratégia adotada na técnica de fabrico das NPs, inclui a utilização do tamanho, forma, carga e rigidez, entre outros parâmetros, de forma a aumentar a sua acumulação no tecido, aumentar a sua adesão e captação celular (Morachis et al., 2012). Este tipo de funcionalização baseia-se em estímulos internos e/ou externos que direcionam a nanoformulação para o tecido alvo. Os estímulos podem ser diversos, tais como, pH, radiações, campo magnético ou temperatura.

Um dos problemas mais comuns entre os diferentes tipos de NPs é o efeito do sistema reticuloendotelial. Este efeito provoca uma rápida absorção das NPs por macrófagos, que geralmente provocam a sua eliminação da circulação (Gholami & Engel, 2018). Existem diversas estratégias possíveis de aplicar para ultrapassar esta limitação, tais como: perfeita conjugação entre tamanho e forma da NP, pois quando adequada, possibilita um aumento no tempo de semi-vida na corrente sanguínea (Taurin et al., 2012); PEGuilação, com Polietilenoglicol (PEG) ou derivados, uma vez que este tipo de polímeros possuem cadeias hidrófilas provocam impedimento estérico e assim diminuem a opsonização das NPs (Otsuka et al., 2003).

A modificação e inserção de ligandos na superfície das NPs, como: anticorpos, fragmentos de anticorpos, peptídeos ou aptâmeros, tem como objetivo reconhecer células de forma mais específica. Este processo criou uma nova geração de NPs para o tratamento do cancro com especificidade *in vivo*. A funcionalização das NPs na oncologia baseia-se na expressão e/ou sobre-expressão de alguns biomarcadores nos tumores, que podem ser usados como alvos (Cisterna et al., 2016). Os biomarcadores do CCR mais comumente sobre-expressos na membrana celular são: recetor de folatos (FR- α), EGFR, recetor de glicoproteína-72 (TAG-72) e CEA, representados na Figura 6. Segundo um estudo desenvolvido por Tiernan et al., o biomarcador mais sobre-expresso em CCR é o CEA, sendo que o tecido do CCR apresentou uma expressão de 98,8% a mais do que no tecido normal, seguido por 79% de TAG-72, 37,1% de FR- α e 32,8% de EGFR (J. P. Tiernan et al., 2013).

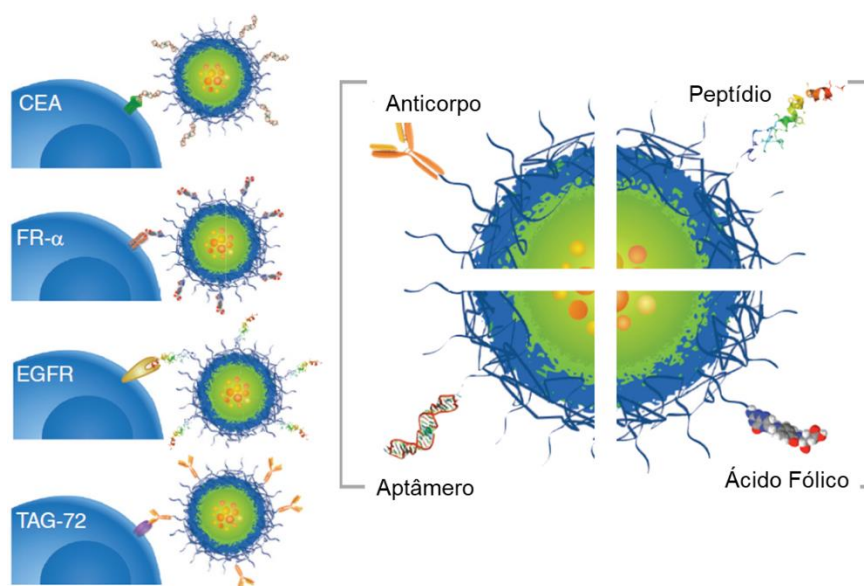


Figura 6 - Estratégias de funcionalização de NPs para tratamento do CCR. CEA: antígeno carcinoembrionário; FR- α : recetor de folatos; EGFR: recetor do fator de crescimento epidérmico; TAG-72: recetor de glicoproteína-72. Adaptado de: (Cisterna et al., 2016).

1.3. Motivação e Objetivos

A eficácia do tratamento do CCR com quimioterapia continua limitada por diversos fatores, como: 1) distribuição inespecífica de agentes citotóxicos que provoca citotoxicidade; 2) reincidência e desenvolvimento de resistência das células tumorais aos citotóxicos e 3) monitorização limitada da resposta terapêutica (Rampado et al., 2019; Sebastian, 2017).

Apesar da quimioterapia ser a estratégica mais utilizada no tratamento do cancro, está associada a inúmeros efeitos adversos (Jalilzadeh et al., 2020). Um dos maiores desafios na eficácia dos tratamentos de quimioterapia é precisamente a baixa especificidade do fármaco citotóxico e os consequentes efeitos adversos graves (Thorley & Tetley, 2013). A baixa especificidade na distribuição do medicamento provoca baixas concentrações do mesmo no tecido tumoral e efeitos adversos nos tecidos saudáveis, o que leva a um decréscimo da qualidade de vida do doente (Bartoş et al., 2016). Os efeitos adversos da quimioterapia estão diretamente relacionados com os fármacos administrados e respetivas doses. No geral, os efeitos mais frequentes são: alopecia, perda de apetite, perda de peso, úlceras na boca, diarreia, alterações nas unhas e na pele, diminuição nas contagens de células sanguíneas e, como consequência, anemia, hemorragia ou infeções (American Cancer Society, 2020a).

Com a finalidade de melhorar os resultados da terapêutica, bem como diminuir os efeitos adversos observados, a nanomedicina tem sido uma área de interesse na área da oncologia (Jin et al., 2019). A nanomedicina e os sistemas de veiculação nanotecnológicos permitem o desenvolvimento de novas opções terapêuticas direcionadas. O principal objetivo dos sistemas de veiculação com NPs é alcançar uma terapia mais eficaz e com menos efeitos adversos associados (Jalilzadeh et al., 2020)

Um outro problema substancial no sucesso dos tratamentos com quimioterapia é a multirresistência das células tumorais a diferentes fármacos (Casalta-Lopes et al., 2011). A multirresistência ocorre por meio de mecanismos de efluxo, como a glicoproteína-P. A partir da aplicação da nanotecnologia na oncologia, é possível ultrapassar esta limitação, pois as NPs têm a potencialidade de evitar estes mecanismos e tornar o tratamento mais eficiente. As propriedades bio-físico-químicas das NPs funcionalizadas permitem que haja um aumento do tempo de circulação e, assim, um aumento da concentração de fármaco no tecido tumoral (Bartoş et al., 2016).

Além das limitações a nível da terapêutica descritas anteriormente, o tratamento cirúrgico do CCR é considerado bastante invasivo, pois implica a remoção de grandes porções

do intestino, do sistema linfático e vasculatura, de modo a evitar recidivas tumorais e metástases (Rentsch et al., 2016). Uma melhor identificação do tecido tumoral poderia levar a resseções de menor tamanho, sem aumentar o risco de desenvolver recidivas. Com esta mesma preocupação, a nanomedicina, em sinergia com técnicas endoscópicas, tem potencial para obter uma maior precisão neste processo (Rampado et al., 2019).

Para além das limitações apresentadas quanto ao tratamento, outra razão pela qual o CCR continua a ser uma das maiores preocupações a nível mundial é o diagnóstico invasivo e tardio.

Apesar de todas as vantagens descritas acerca da endoscopia, este método é considerado invasivo e está associado a diversas complicações, como: i) reações adversas referentes à preparação intestinal, como náuseas, vômitos e dor abdominal; ii) perfuração ou laceração do cólon; iii) hemorragia, podendo estar associada à realização de biópsias ou remoção de pólipos; iv) rutura maciça do cólon, entre outros (SPED, 2021b). O risco de desenvolver este tipo de complicações e o desconforto associado à preparação do exame leva os doentes a evitar este exame (Świdarska et al., 2014). Para diminuir a incidência do CCR, são necessários métodos que fácil e precocemente detetem pólipos adenomatosos colorretais, antes da sua transformação maligna (Liang et al., 2012). Infelizmente, os métodos utilizados atualmente, como sigmoidoscopia, colonoscopia, TC, detetam pólipos e cancros a partir da sua forma/morfologia (N. T. Chen et al., 2017). Esta característica torna estes métodos limitados, pois pólipos mais planos ou de menor tamanho podem não ser detetados durante a colonoscopia (Hetzel et al., 2010; N. T. Chen et al., 2017).

As potencialidades da nanotecnologia incluem a deteção precoce de tumores e o desenvolvimento de abordagens terapêuticas que não poderiam ser alcançadas com as abordagens convencionais já existentes (Laroui et al., 2013). De facto, em determinados tipos de cancro, as NPs com diversas composições e formas têm-se vindo a mostrar como ferramentas promissoras e importantes no diagnóstico, estadiamento e tratamento do CCR (Jena et al., 2017).

Esta dissertação teve como objetivo geral a compilação dos avanços recentes quanto a abordagens nanotecnológicas quanto ao diagnóstico e ao tratamento do CCR. Em particular, os objetivos específicos desta dissertação foram:

- a) Compilar os estudos pré-clínicos com abordagens nanotecnológicas em desenvolvimento para o diagnóstico, tratamento e teranóstico do CCR entre 2015-2021.

- b) Compilar os ensaios clínicos com abordagens nanotecnológicas em desenvolvimento para o diagnóstico, tratamento e teranóstico do CCR entre 2006-2021.
- c) Discutir de forma integrada quais as estratégias nanotecnológicas mais utilizadas no desenvolvimento de nanoformulações para o diagnóstico e/ou tratamento do CCR, nomeadamente quanto ao tipo de NP mais utilizada, ao tipo de fármaco encapsulado e à estratégia de funcionalização empregue.

Capítulo II - Métodos

2. Métodos

A revisão bibliográfica apresentada neste trabalho centrou-se na pesquisa em diversas plataformas, como bases de dados, motores de busca e bibliotecas *online* em função do tipo de informação a consultar.

No caso de definições e *guidelines* de tratamento recorreu-se às plataformas Google (<https://www.google.pt/>), Google Scholar (<https://scholar.google.com/>), *National Institutes of Health* (NIH - <https://www.nih.gov/>), *Food and Drug Administration* (FDA - <https://www.fda.gov/>), *National Health Service* (NHS - <https://www.nhs.uk/>) e *American Cancer Society* (<https://www.cancer.org/>). Estas plataformas foram utilizadas para a definição dos conceitos base essenciais para o desenvolvimento da dissertação.

No caso da pesquisa quanto a estudos *in vitro* e *in vivo* com abordagens nanotecnológicas para diagnosticar e/ou tratar o CCR, foram utilizadas as plataformas PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) e B-on (<https://www.b-on.pt/>), sendo que a mais utilizada foi a PubMed, já que esta plataforma é particularmente dedicada à literatura biomédica. Devido à extensa quantidade de estudos existentes e tendo em conta que o objetivo desta dissertação se prende com a compilação dos avanços recentes quanto ao diagnóstico e o tratamento do CCR, a pesquisa bibliográfica foi filtrada para incluir estudos *in vitro* e *in vivo* publicados entre 2015 e 2021.

Quanto à pesquisa de ensaios clínicos quanto à utilização de nanotecnologias para diagnosticar e/ou tratar o CCR, foi utilizada a plataforma *Clinical Trials* (<https://clinicaltrials.gov/>), visto ser uma base de dados de ensaios clínicos, privados e públicos, realizados mundialmente. Uma vez que existe uma quantidade muito menor de ensaios clínicos em relação aos estudos *in vitro* e *in vivo*, foi considerado um período mais alargado neste caso, nomeadamente entre 2006 e 2021.

Grande parte da pesquisa foi realizada em inglês, visto que a grande maioria dos estudos foram publicados nesta língua. Assim, as palavras-chave utilizadas nas diversas pesquisas incluíram: *colorectal cancer*, *rectal cancer*, *colon cancer*, *nanotreatment*, *nanodiagnosis*, *nanotheranostic*, *nanoparticle*, *polymeric nanoparticles*, *micelles*, *dendrimers*, *metallic nanoparticles*, *lipid nanoparticles*, *silica nanoparticles*, *nanotechnology* e *targeted nanoparticles*. Foram também utilizadas algumas combinações das palavras-chave mencionadas como: *targeted nanoparticles AND colorectal cancer*, *polymeric nanoparticles AND colorectal cancer*, *metallic nanoparticles AND colorectal cancer* entre outras.

Na discussão de resultados, irão ser apresentados gráficos para uma visão integrada dos estudos analisados, de forma a avaliar os avanços na nanotecnologia no diagnóstico, tratamento e teranóstico do CCR. O programa utilizado para a obtenção dos gráficos, tanto circulares, como de barras, foi o Excel.

Capítulo III – Resultados e Discussão

3. Resultados e Discussão

As abordagens convencionais quanto ao diagnóstico e ao tratamento do CCR têm diversas desvantagens, o que tem despoletado a procura de estratégias nanotecnológicas aprimoradas para ultrapassar as dificuldades atuais e estabelecer novas abordagens no sentido do diagnóstico mais precoce e de uma terapia mais eficaz e mais segura para o CCR (Preksha Vinchhi, 2021).

Assim, os avanços recentes de 2015 a 2021, quanto à publicação de estudos pré-clínicos relativos ao diagnóstico e/ou tratamento do CCR serão apresentados de seguida.

3.1. Estudos pré-clínicos

Nas últimas décadas, foram desenvolvidas as bases da nanotecnologia para o fabrico de NPs como agentes de diagnóstico e terapêuticos de forma mais organizada (Jena et al., 2017). A aplicação da nanotecnologia na oncologia tornou-se mais real quando aumentou do número de abordagens nanotecnológicas para diagnóstico e tratamento em fase clínica e mais ainda quando estes começaram a ser comercializados (Bertrand et al., 2014).

Inúmeras NPs estão a ser desenvolvidas e estudadas de forma a direcionar uma maior quantidade de fármaco, com maior especificidade para o CCR (Ghosn et al., 2015). De acordo com a pesquisa elaborada, diversos tipos de NPs têm sido explorados no âmbito do CCR, nomeadamente lipossomas e NPs lipídicas, NPs metálicas, NPs poliméricas, micelas, dendrímeros, NPs de sílica e de carbono, entre outras (Ghosn et al., 2015; Kotelevets et al., 2016).

De acordo com Kotelevets et al., mais de cem estudos sobre avaliação pré-clínica da aplicação da nanomedicina para o tratamento do CCR foram publicados. A grande maioria destes artigos baseiam-se no estudo de NPs para se obterem imagens de células tumorais usando RM, fluorescência, entre outras técnicas. Outra grande parte estuda diferentes oportunidades que as NPs podem oferecer como abordagem terapêutica através de fotossensibilização ou destruição térmica de células tumorais (Kotelevets et al., 2016).

Os diversos estudos pré-clínicos publicados entre 2015 e 2021 serão, de seguida, apresentados com base no tipo de NP desenvolvida para o diagnóstico, tratamento e teranóstico do CCR.

3.1.1. Nanopartículas baseadas em lípidos

3.1.1.1. Nanopartículas vesiculares

Existem diversas NPs vesiculares passíveis de serem aplicadas no tratamento de CCR, sendo os lipossomas o exemplo primordial, já que se trata do primeiro tipo de NPs a ser utilizado na terapêutica oncológica. Na Tabela 4 estão apresentados estudos em fase pré-clínica de nanoformulações lipossomais em desenvolvimento para o tratamento e teranóstico de CCR.

Tabela 4 - Estudos *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas lipossomais em desenvolvimento para o tratamento e teranóstico do CCR.

Nanopartícula	Funcionalização	Fármaco	Aplicação	Ref.
Lipossoma	Manose	DOX + Di- hidroartemisinina	Tratamento	(Kang et al., 2017)
	Manose	Paclitaxel	Tratamento	(Xiong et al., 2017)
	AF	5-FU	Tratamento	(Moghimpour et al., 2018)
	AF	5-FU	Tratamento	(Handali et al., 2018)
	-	5-FU + apigenina	Tratamento	(Sen et al., 2019)
	-	Rapamicina	Tratamento	(Y. Q. Chen et al., 2021)
Lipossoma- PEGuilado	-	DOX + CUR	Tratamento	(Sesarman et al., 2019)
Lipossoma revestido com quitosano	-	5-FU	Tratamento	(Alomrani et al., 2019)
Lipossoma ultra- magnético	-	-	Teranóstico	(Thébault et al., 2019)

De acordo com o estudo de Chen et al., os lipossomas podem ser uma estratégia para administrar o fármaco rapamicina, que é um agente com aplicação clínica limitada devido às suas características, nomeadamente, baixa solubilidade em água e baixa biodisponibilidade.

A rapamicina lipossomal obteve uma captação celular *in vitro* maior que a rapamicina isolada. E nas experiências *in vivo* constatou-se que teve uma maior acumulação no tumor. Os autores constataram que o recurso a lipossomas permite atingir uma maior inibição da proliferação tumoral, com superior citotoxicidade e indução da apoptose comparativamente à rapamicina isolada (Y. Q. Chen et al., 2021). Apesar dos resultados positivos, os autores mencionaram que futuras modificações da superfície do lipossoma, como, por exemplo, com ácido fólico (AF) ou ácido hialurónico, como estratégias de funcionalização ativa, poderiam melhorar mais pronunciadamente o efeito antitumoral da rapamicina (Y. Q. Chen et al., 2021; Zhao et al., 2020).

Os lipossomas funcionalizados com AF para veicular 5-FU, desenvolvidos por Moghimipour et al., mostraram uma maior inibição do tumor comparativamente ao fármaco 5-FU isolado (Moghimipour et al., 2018). Os resultados do estudo hemolítico e histopatológico foram positivos, pois a nanoformulação mostrou-se hemo-compatível, sendo possível a sua administração por via intravenosa. Apresentou também uma maior absorção celular e maior citotoxicidade em células tumorais, comparativamente à formulação de 5-FU isolado e 5-FU lipossomal não funcionalizado. Os valores de IC50 para a nanoformulação em estudo foi de 12,02 μ M, para 5-FU isolado foi de 39,81 μ M e para 5-FU lipossomal foi de 37,15 μ M, pelo que os lipossomas funcionalizados são captados mais eficientemente pelas células tumorais do que os lipossomas não funcionalizados. Assim, os autores concluíram que estes lipossomas poderão constituir um método eficaz e seguro para a terapêutica do CCR (Moghimipour et al., 2018). É de notar que para além do AF, também foi explorada a manose como funcionalização ativa para aumentar a acumulação das nanoformulações lipossomais nas células tumorais (Kang et al., 2017; Xiong et al., 2017).

Apesar de muitos dos estudos desenvolvidos - Tabela 4 - serem no âmbito da terapêutica do CCR, Thébault et al. desenvolveram um lipossoma com vista a uma abordagem teranóstica. Este estudo tinha como objetivo investigar a eficiência da vetorização magnética, utilizando lipossomas ultra-magnéticos. A vetorização magnética foi avaliada através de vários métodos, nomeadamente, através de RM e quantificação por espectrometria de emissão atómica. A partir desta última técnica concluiu-se que os tumores com acumulação de lipossomas ultra-magnéticos apresentavam 3x mais ferro. O aumento das concentrações de ferro e lípidos nos tumores sugerem que a nanoformulação estaria estabilizada durante a circulação. Como são de fácil manuseamento e de baixo custo, os autores consideraram esta tecnologia de projeção simples para a aplicação teranóstica (Thébault et al., 2019).

3.1.1.2. Nanopartículas lipídicas sólidas e transportadores lipídicos nanoestruturados

A biocompatibilidade dos lípidos está na origem da sua utilização generalizada para produzir NPs para aplicações biomédicas. Na tabela seguinte estão compilados os estudos em fase pré-clínica quanto a nanoformulações lipídicas (SLNs e NLCs) para o diagnóstico e tratamento do CCR.

Tabela 5 - Estudos *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas lipídicas (SLNs e NLCs) em desenvolvimento para o diagnóstico e tratamento do CCR

Nanopartícula	Funcionalização	Fármaco	Aplicação	Ref.
SLNs	-	5-FU + compostos nutracêuticos	Tratamento	(Kamel et al., 2017)
	-	Docetaxel	Tratamento	(K. S. Kim et al., 2019)
	AF	OP	Tratamento	(Rajpoot & Jain, 2018)
	AF e Eudragit S100	OP	Tratamento	(Rajpoot & Jain, 2020)
	Pectina	CUR	Tratamento	(Mohamed et al., 2021)
	-	Agente de contraste com gadolínio e isotiocianato de fluoresceína	Diagnóstico	(H. Wang et al., 2020)
SLNs	-	5-FU	Tratamento	(T. Smith et al., 2020)
PEGuiladas	Péptideo H	IRI + micro RNA (miR-200)	Tratamento	(Juang et al., 2019)
NLCs	-	Glucosídeo de orcinol	Tratamento	(Nahak et al., 2018)
	-	Gefitinib	Tratamento	(Makeen et al., 2020)
	-	Resveratrol	Tratamento	(Elgizawy et al., 2021)

Dois dos estudos apresentados foram desenvolvidos por Rajpoot & Jain e tiveram como objetivo a libertação controlada de OP num SLN funcionalizado com AF. No primeiro estudo em 2018, os autores concluíram que as células HT-29 apresentaram maior sensibilidade à nanoformulação desenvolvida em relação ao fármaco isolado (Rajpoot & Jain, 2018). No estudo seguinte, os autores revestiram a nanoformulação acima descrita com Eudragit S100. Este revestimento resultou no direcionamento da nanoformulação através de dois métodos: com AF e com o revestimento Eudragit S100 - dissolução acima de pH=7. Esta nanoformulação permitiu acumular 8,83 vezes mais fármaco no tumor comparativamente a outra nanoformulação não funcionalizada com AF. Assim, concluíram que a dupla funcionalização aplicada é vantajosa (Rajpoot & Jain, 2020).

Um estudo recente de Elgizawy et al. descreve o desenvolvimento de NLCs peguillados para veicular o resveratrol. O NLC foi aplicado com o objetivo de melhorar a estabilidade e biodisponibilidade deste composto de origem natural. A nanoformulação apresentou atividade antitumoral em diversas linhas celulares tumorais, entre elas, HCT-116 do cólon. As NPs desenvolvidas mostraram ser eficazes na diminuição da viabilidade destas células, o que demonstra a potencialidade desta nova abordagem para o tratamento do CCR (Elgizawy et al., 2021). É de salientar que outros compostos de origem natural - curcumina (CUR), glucosídeo de orcinol - têm também sido encapsulados em NPs lipídicas de forma a explorar a sua potencialidade como agentes anticancerígenos e simultaneamente evitando os seus desafios quanto à estabilidade e biodisponibilidade (Mohamed et al., 2021; Nahak et al., 2018).

3.1.2. Nanopartículas poliméricas

As NPs poliméricas biodegradáveis podem ser aplicadas na veiculação de fármacos antitumorais devido ao seu pequeno diâmetro hidrodinâmico, que favorece a sua acumulação no tumor através de funcionalização passiva (Cerqueira et al., 2015). Podem ser utilizados diversos materiais para preparar NPs biodegradáveis, como por exemplo, ácido polilático, PCL, polissacarídeos e proteínas (Chevalier et al., 2015). O polímero PLGA, comparado com outros tipos de sistemas de veiculação, apresenta várias vantagens, como: biodegradabilidade, libertação controlada do fármaco, capacidade de armazenar moléculas hidrofílicas e/ou hidrofóbicas e várias opções de funcionalização (B. Zheng et al., 2018).

A encapsulação de fármacos em polímeros naturais é uma estratégia capaz de tornar NPs resistentes ao sistema imunológico, aumentando o seu tempo de circulação e aumentando o efeito antitumoral dos fármacos (Yusefi et al., 2021). Os polissacarídeos são os materiais poliméricos mais populares para a preparação de NPs. Particularmente, as NPs baseadas em quitosano foram estudadas para uma vasta lista de aplicações, como veiculação de fármacos citotóxicos por várias vias de administração, como oral e intravenosa (Abruzzo et al., 2016). O quitosano apresenta diversas características vantajosas: é biodegradável, não tóxico, biocompatível e apresenta mucoadesividade (Dutta et al., 2004).

Nas tabelas seguintes, estarão apresentados vários estudos *in vitro* e *in vivo* quanto a NPs poliméricas à base de PLGA - Tabela 6 - e quitosano - Tabela 7 - em desenvolvimento para o tratamento do CCR.

Tabela 6 - Estudos *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas poliméricas constituídas por PLGA em desenvolvimento para o tratamento do CCR.

Nanopartícula	Funcionalização	Fármaco	Aplicação	Ref.
NPs de PLGA	-	CUR	Tratamento	(Akl et al., 2016)
	-	CUR	Tratamento	(Klippstein et al., 2015)
	Ácido hialurónico	CUR + Camptotecina	Tratamento	(Xiao et al., 2015)
	AF	5-FU	Tratamento	(Yichao Wang et al., 2015)
	Anti-EGFR	5-FU + Perfluorocarbono	Tratamento	(P. Wu, Zhou, et al., 2020)
NPs de PLGA-PEGuiladas	-	Quercetina + ácido elágico + ácido gálico	Tratamento	(Abd-Rabou & Ahmed, 2017)
	AF	micro RNA (miR-204-5p)	Tratamento	(B. Zheng et al., 2018)
	-	5-FU + Cetuximab + Iodo-131	Tratamento	(P. Wu, Zhu, et al., 2020)
	Anti-EGFR	5-FU	Tratamento	(Bhattacharya, 2021)
	-	Cloro (trietilfosfina) ouro (I)	Tratamento	(Menconi et al., 2021)
NPs de PLGA/PCL/PEG	-	5-FU	Tratamento	(Ashour et al., 2019)

Como se pode observar na Tabela 6, têm vindo a ser utilizadas várias estratégias de funcionalização em NPs à base de PLGA, como, por exemplo, ácido hialurónico, AF e anti-EGFR (Bhattacharya, 2021; B. Zheng et al., 2018; P. Wu, Zhou, et al., 2020; Xiao et al., 2015; Yichao Wang et al., 2015).

Outra estratégia bastante comum é a PEGuilação das NPs, isto é, a adição de PEG, que como referido anteriormente, melhora a eficiência de encapsulação, aumenta o tempo de circulação e protege as NPs do efeito do sistema imunológico (Grimaldi et al., 2017).

Uma estratégia particularmente inovadora foi desenvolvida por Zheng et al. através da combinação da nanotecnologia com a terapia com micro RNAs (B. Zheng et al., 2018). Os micro RNAs são reguladores de genes importantes, capazes de regular simultaneamente

vários genes. Foi demonstrado que o miR-204-5p é um supressor de tumor em diversos tumores, entre eles, o CCR. Neste estudo, o miR-204-5p foi encapsulado numa NP à base de PLGA-PEGuilada e funcionalizada com AF. Nos ensaios de captação celular, os autores observaram que as NPs desenvolvidas eram eficientemente absorvidas por linhas celulares tumorais HT-29 e HCT-116 e, por consequência, observaram uma maior inibição da proliferação celular e um efeito promotor quanto à apoptose celular. Assim, concluiu-se que a terapia baseada em micro RNAs com este tipo de sistemas de veiculação pode ser uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento do CCR (B. Zheng et al., 2018).

Tabela 7 - Estudos *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas poliméricas constituídas por quitosano (e seus derivados) em desenvolvimento para o tratamento do CCR.

Nanopartícula	Funcionalização	Fármaco	Aplicação	Ref.
NPs de Quitosano	-	Imatinib	Tratamento	(Bhattacharya, 2020)
	-	CUR	Tratamento	(Alkhader et al., 2018)
	-	CUR/SN-38	Tratamento	(Han et al., 2019)
NPs de Quitosano-ácido hialurónico-ciclodextrina	-	CUR	Tratamento	(Abruzzo et al., 2016)
Bionanocompósito de quitosano-celulose	-	5-FU	Tratamento	(Yusefi et al., 2021)
NPs de carboximetilquitosano	-	OP	Tratamento	(Yaowen Wang et al., 2021)
NPs de pectina- quitosano cítrico	-	CUR	Tratamento	(Sabra et al., 2018)
	Cetuximab	CUR	Tratamento	(Sabra et al., 2019)
NPs de quitosano-condroitina	AF	Bortezomib	Tratamento	(Soe et al., 2019)

Sabra et al. depois de desenvolverem com sucesso um estudo de NPs de pectina-quitosano cítrico para encapsular CUR para o tratamento do CCR (Sabra et al., 2018), desenvolveram outro trabalho com as mesmas NPs funcionalizadas com cetuximab. O cetuximab foi adsorvido à superfície das NPs e, segundo análises *in vitro*, as NPs eram esféricas, com uma capacidade de encapsulação adequada e um perfil de libertação de fármaco inteligente. As NPs funcionalizadas revelaram efeito antitumoral mais potente nas linhas celulares CaCo-2 comparativamente às NPs não funcionalizadas. Esta diferença justifica-se pelo facto destas linhas celulares apresentarem alta expressão de EGFR e haver maior internalização de NPs nas células mediadas pelo cetuximab (Sabra et al., 2019). Os autores concluíram que tanto a CUR livre como a encapsulada provoca a diminuição da proliferação celular *in vitro* em células CaCo-2 e HCT-116 mas o efeito é mais pronunciado quando há encapsulação do fitoquímico em NPs e ainda mais acentuado quando estas são funcionalizadas com cetuximab (Sabra et al., 2019).

É ainda de salientar que vários outras NP constituídas por quitosano e derivados foram exploradas para veicular a CUR (Abruzzo et al., 2016; Alkhader et al., 2018; Sabra et al., 2018; Sabra et al., 2019), mas também outros compostos com atividade antitumoral (Bhattacharya, 2020; Soe et al., 2019; Yaowen Wang et al., 2021; Yusefi et al., 2021).

3.1.2.1. Micelas

Entre diversas NPs passíveis de serem aplicadas no tratamento, diagnóstico e teranóstico do CCR, encontram-se também as micelas. Na Tabela 8 estão listados alguns estudos recentes quanto ao desenvolvimento pré-clínico destes sistemas de veiculação.

Tabela 8 - Estudos *in vitro* e *in vivo* de micelas em desenvolvimento para o tratamento e teranóstico do CCR.

Nanopartícula	Funcionalização	Fármaco	Aplicação	Ref.
Micela	AF	CUR	Tratamento	(Hu et al., 2020)
	Ácido Hialurónico	DOX	Tratamento	(Debele et al., 2018)
	-	IRI + micro RNA	Teranóstico	(Yunhao Li et al., 2020)
	-	SN-38 (metabolito ativo de IRI)	Tratamento	(Sadat et al., 2020)
	Fragmento de anticorpo para CD44v6	Niclosamida	Tratamento	(Andrade et al., 2021)
Micela PEGuilada	-	3,5,4'-Trimetoxi- <i>trans</i> -estilbeno	Tratamento	(J.-Y. Wu et al., 2019)
Micelplexo: micela + SPIONs	RNA de transferência + PEG	SN-38 (metabolito ativo de IRI)	Teranóstico	(Lee et al., 2016)

Um dos exemplos de aplicação de micelas para o tratamento do CCR são as micelas PEGuiladas desenvolvidas por Wu et al. (J.-Y. Wu et al., 2019). Os investigadores referiram que o fármaco 3,5,4'-trimetoxi-*trans*-estilbeno, apesar de apresentar uma eficácia antitumoral potente, apresentava baixa solubilidade em água, tempo de semi-vida curto e baixa biodisponibilidade. As micelas PEGuiladas permitiram prolongar a circulação do composto, aumentar a biodisponibilidade do fármaco e aumentar o seu efeito antitumoral. Por fim, a nanoformulação mostrou captação celular melhorada, libertação controlada do fármaco e ainda danos mínimos nos tecidos saudáveis (J.-Y. Wu et al., 2019).

Outro exemplo de aplicação de micelas para o tratamento do CCR são as micelas funcionalizadas com AF desenvolvidas por Hu et al. para veicular a CUR (Hu et al., 2020). Neste estudo foram comparadas 3 formas de tratamento, CUR livre, micela não funcionalizada com CUR e micela funcionalizada com AF encapsulada com CUR. Entre todos, o tratamento com micelas funcionalizadas causou a maior diminuição do número de células em proliferação, pelo que exerceu o efeito antitumoral mais pronunciado quanto ao tratamento do CCR (Hu et al., 2020).

É ainda de salientar que foram reportados dois estudos quanto ao desenvolvimento de abordagens teranósticas baseadas em micelas (Lee et al., 2016; Yunhao Li et al., 2020). Uma delas trata-se de uma estratégia combinada de micelas e NPs metálicas com propriedades superparamagnéticas. A atividade antitumoral *in vivo* foi estudada em ratos com tumores induzidos e os autores observaram que os micelplexos apresentaram maior efeito supressor no crescimento tumoral comparativamente às micelas apenas com SN-38. O volume do tumor nos ratos tratados com as micelas apenas com SN-38 foi de $1150 \pm 362 \text{ mm}^3$ e o volume do tumor nos ratos tratados com os micelplexos foi de $591 \pm 125 \text{ mm}^3$. O efeito supressor dos micelplexos funcionalizados com o siRNA-PEG capazes de silenciar os fatores de crescimento do endotélio vascular, foi ainda superior, revelou uma diminuição ainda maior no volume do tumor para $340 \pm 52 \text{ mm}^3$. Estes micelplexos funcionalizados ao exibir melhor atividade antitumoral específica demonstra a potencial eficácia da sinergia entre as diferentes estratégias utilizadas: siRNA-PEG+SPIONs+SN-38 (Lee et al., 2016).

3.1.2.2. Dendrímeros

Os dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) têm sido alvo de especial atenção devido às suas aplicações e propriedades únicas, como: uniformidade, biocompatibilidade e estrutura ramificada (Xie et al., 2015). No entanto, as aplicações clínicas podem ser limitadas principalmente devido à sua toxicidade (Yan Li et al., 2017).

Tem vindo a ser desenvolvidas diversas estratégias de forma a reduzir a citotoxicidade destes sistemas, como, por exemplo, através da funcionalização da superfície do dendrímero com ligandos, nomeadamente PEG, AF, entre outros (Pishavar et al., 2019). Na Tabela seguinte, estão apresentados estudos recentes quanto à caracterização *in vivo* e *in vitro* de dendrímeros em desenvolvimento para o diagnóstico, tratamento e teranóstico do CCR.

Tabela 9 - Estudos *in vitro* e *in vivo* de dendrímeros em desenvolvimento para o diagnóstico, tratamento e teranóstico do CCR.

Nanopartícula	Funcionalização	Fármaco	Aplicação	Ref.
Dendrímero PAMAM-G4	-	Capecitabina	Tratamento	(Nabavizadeh et al., 2016)
	AF	OP	Tratamento	(Narmani et al., 2018)
Dendrímero PAMAM-PEG	Aptâmeros anti-nucleolina AS1411	Camptotecina	Tratamento	(Alibolandi et al., 2017)
Dendrímero PAMAM-Au PEGuilado	Aptâmero MUC-1	CUR	Teranóstico	(Alibolandi et al., 2018)
Dendrímero PAMAM-alquil-carboxilato-PEG-colesterol	-	TRAIL	Tratamento	(Pishavar et al., 2018)
Dendrímero PAMAM-alquil-PEG-colesterol	-	DOX + TRAIL	Tratamento	(Pishavar et al., 2019)
Dendrímero de L-lisina	-	SN-38 (metabolito ativo do IRI)	Tratamento	(England et al., 2017)
Dendrímero anfifílico	-	-	Diagnóstico	(Garrigue et al., 2018)

Como referido anteriormente, a Capecitabina está presente no esquema de quimioterapia no tratamento do CCR. No entanto, este fármaco apresenta diversos efeitos adversos (Carvalho et al., 2020). Neste sentido, Nabavizadeh et al. induziram adenocarcinoma no cólon de ratos com o objetivo de estudar o índice terapêutico de capecitabina conjugada com um dendrímero PAMAM-G4 não modificado. Apesar desta nanoformulação não apresentar vetorização ativa, a equipa de investigadores comparou os efeitos da capecitabina livre e conjugada no tamanho do tumor e nas anormalidades das células sanguíneas. Os resultados mostraram uma diminuição dos efeitos adversos no fígado e no sangue e ainda diminuição do tamanho do tumor comparativamente ao tratamento com capecitabina livre (Nabavizadeh et al., 2016).

O estudo *in vivo*, desenvolvido por Alibolandi et al., em ratos portadores de tumor C26 revelou que os dendrímeros-PEGuilados carregados com camptotecina e funcionalizados com o aptâmero AS1411 melhoraram a atividade antitumoral do fármaco e a taxa de sobrevivência dos animais. A conjugação com o aptâmero AS1411 na superfície do dendrímero PEGuilado forneceu à nanoestrutura especificidade para o tumor, o que causou a inibição do crescimento tumoral *in vivo* e a diminuição significativa da toxicidade sistémica (Alibolandi et al., 2017).

Outro estudo desenvolvido por Alibolandi et al. teve como objetivo investigar a capacidade teranóstica de estruturas híbridas de dendrímero-ouro com CUR, funcionalizadas com aptâmero MUC-1. Os resultados obtidos confirmaram que as nanoestruturas funcionalizadas apresentaram maior captação e internacionalização celular e citotoxicidade aumentada em linhas celulares de CCR, C26 e HT29. A nanoestrutura para além de ter apresentado efeito antitumoral eficaz, também favoreceu a obtenção de imagens de TC mais precisas devido à acumulação de ouro nos tecidos tumorais (Alibolandi et al., 2018).

3.1.3. Nanopartículas metálicas

As NPs metálicas têm vindo a ser alvo de interesse crescente ao longo do tempo nas ciências biomédicas. Estes nanomateriais podem ser sintetizados e modificados de forma a serem conjugados com anticorpos, ligandos e fármacos de interesse de forma a melhor se adaptarem a potenciais aplicações. Entre elas, a biotecnologia, a vetorização magnética, a funcionalização e obtenção de imagens de diagnóstico (Mody et al., 2010). Os estudos em fase pré-clínica de NPs metálicas para diagnóstico e/ou tratamento de CCR estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Estudos *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas metálicas em desenvolvimento para o tratamento e teranóstico do CCR.

Nanopartícula	Funcionalização	Fármaco	Aplicação	Ref.
NPs de ouro	-	CUR	Tratamento	(Sanoj Rejinold et al., 2015)
	Ácido hialurónico	SN-38 (metabolito ativo do IRI)	Tratamento	(Hosseinzadeh et al., 2017)
SPIONs	Copolímero INU-LA-PEG- AF	DOX	Tratamento	(Licciardi et al., 2019)
	Aptâmero MUC1	DOX	Teranóstico	(Nosrati et al., 2021)
SPIONs-PEGuiladas	-	DOX	Teranóstico	(Näkki et al., 2019)
SPIONs-PLGA	Aptâmero AS1411	DOX	Teranóstico	(Mosafer et al., 2017)
NPs de óxido de ferro e ouro	-	-	Teranóstico	(Abed et al., 2019)
	Anticorpos anti-MG1+PEG	-	Teranóstico	(White et al., 2017)

As SPIONs têm mostrado um grande potencial para aplicação clínica devido ao seu perfil de toxicidade baixo (Lewinski et al., 2008) e às suas possíveis e diversas aplicações, nomeadamente, administração de medicamentos e imagem por RM (Laurent et al., 2008; Yu et al., 2012).

No estudo descrito por Licciardi et al., SPIONs com revestimento de copolímero INU-LA-PEG-FA e funcionalizado com AF foram utilizados para direccionar a doxorubicina (DOX) para o tratamento de tumores sólidos como o CCR. De acordo com os resultados observados

in vivo, esta preparação exibiu uma inibição significativa do crescimento do tumor. Para além desta preparação, foram estudadas preparações sem aplicação de campo magnético externo e sem o ligando AF. A preparação com ambos os elementos apresentou melhores resultados, o que indica uma ação sinérgica das estratégias, tanto da presença de AF, como da aplicação do campo magnético. Apesar dos efeitos adversos conhecidos do fármaco DOX, não foi observada toxicidade significativa *in vivo* (Licciardi et al., 2019).

As NPs magnéticas podem ser aplicadas tanto para o diagnóstico como para a terapêutica e, assim, são consideradas como precursores teranósticos bastante promissores (Näkki et al., 2019; Nosrati et al., 2021; Paz et al., 2012). O facto das NPs poderem ser quimicamente modificadas e conjugadas com anticorpos permite que haja uma deteção mais específica dos tumores (Cheng et al., 2012). Um estudo desenvolvido neste âmbito, no entanto de anos anterior aos estabelecidos para este trabalho, foi desenvolvido por Paz et al. quanto a um fluído magnético composto por NPs de maguemite - óxido de ferro - suspensas de forma estável e conjugadas a anti-CEA. O anticorpo anti-CEA foi conjugado com sucesso às partículas nanométricas e, por fim, concluíram que as NPs desenvolvidas são uma ferramenta teranóstica com potencial para tumores que expressam CEA, como o CCR, micrometástases e células tumorais circulantes (Paz et al., 2012).

As SPIONs são um exemplo claro da possível utilização de nanotecnologia no teranóstico do CCR - Tabela 10 -, já que a maioria dos estudos desenvolvidos com este tipo de NPs são com o intuito de desenvolver uma abordagem teranóstica. Isto deve-se ao facto destas NPs terem uma alta capacidade de resposta a campos magnéticos e, por conseguinte, podem acumular-se localmente por aplicação externa de campos magnéticos. As SPIONs podem ainda ser utilizados como agentes de contraste na RM e, como são biocompatíveis e biodegradáveis, são boas candidatas para aplicações teranósticas (Kandasamy & Maity, 2015; Rampado et al., 2019). Outro material metálico nanométrico também de especial interesse é o ouro. NPs de ouro são consideradas de fácil síntese, baixa toxicidade e de fácil funcionalização através da utilização de ligandos (Rampado et al., 2019; Yi-Cheun Yeh, Brian Creran, 2012).

Os últimos estudos apresentados na Tabela 10 dizem respeito a nanoformulações multifuncionais na área do teranóstico em que se combinou ouro e óxido de ferro. O óxido de ferro permite a deteção por RM e o ouro ao absorver energia tem capacidade de convertê-la em calor, o que provoca a ablação das células tumorais, destruindo membranas celulares (Ling et al., 2007), uma propriedade essencial na realização de Terapia Fototérmica (Abed et al., 2019; White et al., 2017). No estudo de Abed et al., após a injeção da nanoformulação, um íman foi colocado no local do tumor durante o período de 3 horas de forma a concentrar

as NPs e, posteriormente, ocorreu a irradiação de laser infravermelho próximo. Os estudos *in vivo* compararam as temperaturas obtidas entre os tumores com NPs ativadas através do campo magnético e não ativadas, tendo-se concluído que os valores de temperatura eram significativamente mais elevados nos tumores tratados com NPs ativadas, 12°C vs 8,5°C. A atividade antitumoral da nanoformulação óxido de ferro + ouro, em combinação com a vetorização magnética e a irradiação de infravermelho próximo revelou remissão completa do crescimento tumoral. Assim, esta nanoformulação multifuncional pode ser uma estratégia válida para terapia fototérmica vetorizada em combinação com RM (Abed et al., 2019).

3.1.4. Nanopartículas de sílica

A utilização de NPs de sílica na biomedicina tem sido extensa devido à sua capacidade de veicular fármacos, à sua capacidade de resposta a diferentes estímulos e ainda a possíveis aplicações teranósticas (Mebert et al., 2017). Na tabela 11 estão apresentados diversos exemplos da aplicação de NPs de sílica para o diagnóstico, tratamento e teranóstico do CCR.

Tabela 11 - Estudos *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas de sílica em desenvolvimento para o diagnóstico, tratamento e teranóstico do CCR

Nanopartícula	Funcionalização	Fármaco	Aplicação	Ref.
NPs de sílica fluorescentes	Anti-CEA	-	Diagnóstico	(J. Tiernan et al., 2015)
	Lectina	-	Diagnóstico	(N. T. Chen et al., 2017)
NPs de sílica magnéticas	Peptídeo-1 específico de placa aterosclerótica	DOX	Tratamento	(Kuo et al., 2016)
NPs de sílica PEGuiladas	-	Genisteína	Tratamento	(Pool et al., 2018)
NPs de sílica mesoporosas	-	IRI	Tratamento	(Liu et al., 2019)
	Quitosano + Ácido Glucurónico	Capecitabina	Tratamento	(Narayan et al., 2021)
	AF	Quercetina	Teranóstico	(Mishra et al., 2020)

Os estudos desenvolvidos por Tiernan et al. e Chen et al. tiveram como objetivo desenvolver nanossistemas para serem aplicados como agentes de contraste endoscópico direcionados para a deteção precoce de pólipos colorretais e CCR (J. Tiernan et al., 2015; N. T. Chen et al., 2017). O estudo de Chen et al. reportou estudos celulares *in vitro*, análise histopatológica *ex vivo* e colonoscopia e endoscopia *in vivo* em modelos de murino com CCR. As NPs funcionalizadas com lectina demonstraram especificidade, podendo servir como contraste endoscópico promissor para diagnóstico (N. T. Chen et al., 2017). Estas equipas de investigação concluíram que este tipo de NPs fluorescentes poderão ser uma estratégia inovadora e eficaz para a translação clínica no contexto de imagens intra-operatórias. A tecnologia é aplicável em qualquer tipo de tecido ou patologia desde que sejam aplicados os

anticorpos direcionados para biomarcadores específicos apropriados à patologia em estudo. As imagens fluorescentes obtidas a partir desta tecnologia melhora a identificação da localização concreta do tumor, o estadiamento intra-operatório e ainda facilita a execução de ressecções cirúrgicas (J. Tiernan et al., 2015; N. T. Chen et al., 2017).

Um estudo semelhante, mas publicado anteriormente por Cho et al., diz respeito a NPs de sílica magneto-fluorescentes conjugadas com cetuximab que foram desenvolvidas tendo como alvo específico células de CCR que expressam EGFR nas suas membranas celulares. Estas NPs tinham como objetivo produzir fluorescência detetável e induzir alterações na RM *in vivo*. A concentração das NPs no local do tumor foi aumentada pela aplicação de um campo magnético. Como resultados, os autores descreveram que a fluorescência específica foi detetada e que este tipo de nanotecnologia poderá ser uma futura estratégia de diagnóstico não invasivo, mas também uma forma de monitorização da resposta terapêutica em tumores que expressam EGFR (Cho et al., 2010). Vários estudos desenvolvidos para outras situações, nomeadamente cancro do pulmão e cancro da mama, demonstraram a potencialidade de conjugar agentes de contraste de imagem ou NPs com um anticorpo monoclonal dirigido contra EGFR *in vitro* (Ke et al., 2003; Tseng et al., 2007).

O estudo mais recente que envolve NPs de sílica foi desenvolvido por cientistas da *Manipal Academy of Higher Education*, *The Indian Institute of Science* e *The University of South Australia* (Narayan et al., 2021). Teve como propósito desenvolver NPs de sílica mesoporosas glicosiladas sensíveis ao pH para veicular a capecitabina. A superfície das NPs foi conjugada com quitosano + ácido glucurónico. O quitosano é um polissacarídeo que possui a capacidade de modular uma libertação dependente de pH e foi conjugado ao ácido glucurónico, que ao formar um complexo glicosilado, é preferencialmente absorvido pelos recetores de lectina sobre-expressos na superfície da célula tumoral. Esta conjugação permitiu combinar duas estratégias: sensibilidade ao pH e captação mediada pelo recetor de lectina. Após o desenvolvimento de estudos de farmacodinâmica, os autores constataram que nos modelos animais houve diminuição do diâmetro e número de tumores e melhoria dos parâmetros sanguíneos, havendo uma redução na toxicidade de outros órgãos. Concluíram, assim, que este tipo de sistema nanotecnológico parece ser eficaz para o tratamento do CCR (Narayan et al., 2021).

Tendo em conta os artigos apresentados para este tipo de NPs pode-se constatar que existe um interesse ao longo dos anos no desenvolvimento de NPs de sílica mesoporosas. Isto deve-se ao facto de materiais porosos apresentarem características vantajosas, tais como, maior capacidade de encapsulação, alta estabilidade, biocompatibilidade, disposição ordenada dos poros, possível ajuste do tamanho, volume e química dos poros, o que auxilia

nos processos de funcionalização da NP. Assim, as NPs de sílica mesoporosas têm sido amplamente exploradas para aplicações biomédicas (Mishra et al., 2020; Narayan et al., 2018; Natarajan & Selvaraj, 2014).

3.1.5. Nanopartículas de carbono

As NPs à base de carbono são de grande interesse na prática clínica (J. Li et al., 2020). Na tabela seguinte estão apresentados alguns exemplos de estudos pré-clínicos quanto a NPs de carbono para o tratamento e diagnóstico do CCR.

Tabela 12 - Estudos *in vitro* e *in vivo* de nanopartículas de carbono em desenvolvimento para o diagnóstico e o tratamento do CCR.

Nanopartícula	Funcionalização	Fármaco	Aplicação	Ref.
NPs de Carbono	-	-	Tratamento	(Q. Wang et al., 2016)
	-	-	Tratamento	(Zhang et al., 2016)
	-	-	Tratamento	(L. Y. Wang et al., 2017)
	-	-	Tratamento	(C. Lin et al., 2017)
	-	-	Tratamento	(Tang et al., 2018)
	-	-	Tratamento	(N. Lin et al., 2019)
	-	-	Teranóstico	(R. Wang et al., 2020)
	-	-	Diagnóstico	(Ge et al., 2021)

Segundo o estudo desenvolvido por Q. Wang et al., NPs de carbono foram aplicadas de forma a marcar a localização do tumor colorretal antes da cirurgia laparoscópica (Q. Wang et al., 2016). Os investigadores referem que as lesões durante o período intraoperatório são facilmente detetadas sem ser necessário o auxílio de outro equipamento, e que o método não apresenta contra-indicações significativas. Concluíram, que esta técnica poderia ser aplicada em todos os pacientes com CCR com necessidade de ressecção colorretal (Q. Wang et al., 2016).

O estudo desenvolvido por Ge et al. teve como objetivo avaliar se as NPs de carbono ajudam no processo de estadiamento do CCR. Os investigadores observaram linfonodos afetados após a injeção de suspensão com NPs de carbono e concluíram que com este método é possível definir o estadio da doença de forma mais precisa, facilitando o prognóstico (Ge et al., 2021).

Por último, Wang et al. concluíram que a marcação com NPs de carbono é uma técnica segura e confiável para a localização do tumor colorretal. Esta técnica permite: localizar lesões durante a cirurgia após tratamento neoadjuvante; diminuir o tempo das cirurgias e auxiliar na colonoscopia, na identificação e marcação precisa das lesões (R. Wang et al., 2020).

3.2. Ensaios Clínicos

Existe um elevado número de ensaios clínicos a serem desenvolvidos para avaliar a segurança e a eficácia de abordagens nanotecnológicas para diagnóstico e/ou tratamento de cancro. Apesar de já existirem alguns medicamentos baseados em nanotecnologia aprovados para o tratamento de doenças oncológicas, nomeadamente, DOX lipossomal - Doxil® - (FDA, 1995), Marqibo® desde 2012 (FDA, 2012) e a DOX lipossomal termossensível - Thermodox® -, o número de ensaios clínicos quanto ao nanodiagnóstico e ao nanotratamento aplicado em casos de CCR é mais limitado (Cabeza et al., 2020). Na Tabela 13 estão compilados vários ensaios clínicos recentes quanto a nanoformulações para o tratamento do CCR.

Tabela 13 - Ensaios clínicos de nanoformulações para o tratamento do CCR.

Tipo de Nanoformulação	Fármaco	Aplicação	Fase	Identificação	Ano de registo	Referência
Lipossoma	IRI + trifluridina + cloridrato de tipiracilo	Adenocarcinoma CCR; CCR estadio III – IVB	1 e 2	NCT03368963	2017	(Alese, 2017)
	LE-SN-38 (metabolito ativo do IRI)	CCR	2	NCT00311610	2006	(Ocean, 2006)
	IRI	Adenocarcinoma CCR; CCR estadio IV – IVB	1 e 2	NCT03337087	2017	(Bekaii-Saab, 2017)
	IRI	Cancro avançado irresecável CCR	1	NCT02640365	2015	(Chibaudel, 2015)
	CPX-1: IRI + floxuridina	CCR	2	NCT00361842	2006	(Batist & Marshall, 2006)
	ThermoDox: DOX termicamente sensível	CCR com metástases no fígado	2	NCT01464593	2011	(Borys, 2011)
	DOX	CCR com metástases no fígado	1	NCT03203525	2017	(Fu, 2017)
	NALIRINOX: 5-FU/LV + OP + IRI	CCR avançado	2	NCT04009876	2019	(Cubillo, 2019)
	MM-151 + IRI + 5-FU	CCR metastático	1 e 2	NCT02785068	2016	(Merrimack Pharmaceuticals, 2016)

Tabela 13 (cont.) - Ensaio clínicos de nanoformulações para o tratamento do CCR.

Tipo de Nanoformulação	Fármaco ou Descrição	Aplicação	Fase	Identificação	Ano de registo	Ref.
NP Polimérica de etilcelulose	Cetuximab	CCR	1	NCT03774680	2018	(Abdellatif, 2018)
NP Lipídica	TKM-080301:siRNA, que inibe a expressão génica do gene PLK1 (<i>polo-like kinase-1</i>)	CCR com metástases no fígado	1	NCT01437007	2011	(Rudloff, 2011)
NP não definida	CRLX101:camptotecina em combinação com capecitabina e radioterapia	Cancro retal	1 e 2	NCT02010567	2013	(A. Wang, 2013)
	SNB-101: SN-38 (metabolito ativo do IRI)	CCR	1	NCT04640480	2020	(J. Kim, 2020)
	ADI-PEG 20 + FOLFOX	CCR	1 e 2	NCT02102022	2014	(Harding, 2014)
	AZD4635	Carcinoma Colorretal	1	NCT02740985	2016	(Bendell, 2016)
NP de carbono	Localização do tumor para cirurgia laparoscópica	CCR	/	NCT03350945	2017	(M. Zheng, 2017)

De entre os ensaios clínicos a decorrer quanto a formulações lipossomais para o tratamento do CCR, os ensaios quanto às formulações CPX-1, LE-SN38 e ThermoDox, encontram-se na fase 2 (Batist & Marshall, 2006; Borys, 2011; Ocean, 2006). O ensaio quanto à formulação CPX-1 teve como objetivo verificar se o sistema lipossomal era eficaz em pacientes com CCR avançado, que já tivessem recebido quimioterapia de OP ou IRI (Batist & Marshall, 2006). Os resultados recentemente publicados, em 2021, foram relativamente aos participantes que foram submetidos a tratamento anterior com IRI. Neste estudo houve dois grupos participantes, o grupo A, em que foi administrado CPX-1 e não houve tratamento anterior com IRI, e o grupo B em que foi administrado CPX-1 mas foi necessário tratamento com IRI e a condição de progressão da doença dentro de 6 meses após o tratamento inicial com IRI. De acordo com os resultados publicados, 9,5% dos participantes do grupo A apresentaram uma diminuição de 30% do diâmetro da maior lesão e 52,4% dos participantes alcançaram um estado estacionário da doença, enquanto 38,1% dos participantes revelaram doença progressiva, em que houve um aumento de 20% do diâmetro das lesões maiores. Relativamente ao grupo B, 50% dos pacientes alcançaram o estado estacionário e 45,8% apresentaram a doença em fase progressiva (Batist & Marshall, 2006).

Os estudos pré-clínicos apresentados por Lei et al., quanto à eficácia dos lipossomas LE-SN38 em ratos com tumor HT-29 foram inicialmente promissores. Observaram que o crescimento do tumor foi inibido em 51, 79 e 90% após 10 dias de tratamento com doses de 10, 20 e 40 mg/Kg, respetivamente (Lei et al., 2004). No entanto, a avaliação da eficácia de LE-SN38 no ensaio clínico em pacientes com CCR metastático após tratamento com OP não demonstrou eficácia quanto ao atraso da progressão do cancro (Ocean, 2006).

O ThermoDox é outra nanoformulação lipossomal em ensaios clínicos para o tratamento de CCR metastático e baseia-se num lipossoma termicamente sensível para veicular a DOX (Borys, 2011). A tecnologia utilizada é denominada como LTSL '*Lysolipid Thermally Sensitive Liposome*', em que o lipossoma é sensível ao calor. Os tratamentos baseados em calor podem ser aplicados por ablação térmica por radiofrequência, hipertremia por micro-ondas ou ultrassom focalizado de alta intensidade. Esta tecnologia potencializa duas facetas da biologia tumoral: i) os tumores apresentam vasculatura com vazamento que é permeável aos lipossomas e permite que haja uma acumulação dos mesmos no tumor; ii) quando aquecidos, há um aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos e, assim, um aumento da acumulação dos lipossomas nos tumores. O lipossoma sendo sensível ao calor muda rapidamente de estrutura quando submetido a temperaturas entre 40-45 °C. Esta mudança de estrutura permite que a DOX seja libertada diretamente em redor do tumor. Em modelos animais, o ThermoDox demonstrou direccionar especificamente 25 vezes mais DOX

em comparação com a administração de DOX livre e 5 vezes mais do que formulações lipossomais padrão (Celsion Corporation, 2018). Apesar da tecnologia ThermoDox apresentar evidências a nível pré-clínico, os resultados do ensaio clínico ainda não estão disponíveis (Borys, 2011).

Relativamente ao diagnóstico, na Tabela 14 estão compilados ensaios clínicos recentes quanto à aplicação de nanoformulações no diagnóstico do CCR.

Tabela 14 - Ensaios clínicos de nanoformulações para o diagnóstico do CCR.

Nanoformulação	Descrição	Aplicação	Fase	Identificação	Ano de registo	Ref.
SPIONs	Ferumoxtran-10: nanopartícula de óxido de ferro superparamagnético	CCR	3	NCT02751606	2016	(Scheenen, 2016)
Nanopartícula não definida	Nanosensor com capacidade de detetar compostos orgânicos voláteis	CCR	-	NCT03228095	2017	(Lauka & Cīrule, 2017)
	Nanopartícula com capacidade de detetar compostos orgânicos voláteis	CCR	-	NCT01292369	2011	(Galimidi & Hovers, 2011)
Nanopartícula de carbono	Nanopartícula de carbono com capacidade de localizar linfonodos	CCR	-	NCT03550001	2018	(Ye, 2018)
Micela	ONM-100: micela polimérica covalentemente conjugada com indocianina verde, um fluoróforo aprovado pela FDA	CCR	2	NCT03735680	2018	(OncoNano Medicine, 2018)

Como se pode observar, os tipos de NPs para o diagnóstico do CCR em ensaios clínicos são, em geral, diferentes, como, micelas, NPs de carbono, SPIONs e outras não definidas, em relação aos tipos de NPs em fase clínica para tratamento do CCR, maioritariamente em lípidos e polímeros.

No capítulo 3.1.3. estão apresentados diversos SPIONs, cuja aplicação é maioritariamente nanoteranóstica. No entanto, em fase clínica, encontra-se uma nanoformulação baseada em SPIONs desde 2016, cuja aplicação é o nanodiagnóstico.

Apesar de não terem sido descritos recentemente estudos pré-clínicos cujo objetivo fosse a aplicação de micelas na área do nanodiagnóstico, na Tabela 14 encontra-se um ensaio clínico de fase 2 quanto a uma micela nanopolimérica, ONM-100, cuja aplicação é o nanodiagnóstico do CCR (OncoNano Medicine, 2018).

Mais recentemente, desde 2018, está a ser desenvolvido o ensaio clínico NCT03550001, cujo objetivo é a avaliação de uma formulação de NPs de carbono com o intuito de localizar linfonodos. Este tipo de NP, como descrito anteriormente, é maioritariamente usada pré-tratamento cirúrgico, de forma a marcar a localização do tumor colorretal antes da cirurgia laparoscópica. Neste ensaio clínico, as NPs estão a ser exploradas no âmbito do diagnóstico de forma a definir os linfonodos afetados para melhor estabelecer o estadiamento do CCR (Ye, 2018).

Outra nanotecnologia em estudo para o diagnóstico do CCR, são os estudos de Lauka & Cīrule et al., e Galimidi et al. Estes estudos foram feitos com o intuito de fazer uma avaliação da capacidade de deteção de compostos voláteis no ar exalado por dispositivos baseados em nanosensores (Galimidi & Hovers, 2011; Lauka & Cīrule, 2017). No estudo de Glimidi et al., o sistema em estudo é denominado sistema NaNose, e tem o objetivo de discriminar participantes doentes e saudáveis. Os investigadores defendem que o cancro é acompanhado por um aumento do stress oxidativo e de indução de enzimas oxidase mistas polimórficas do citocromo P-450. Estes processos afetam a abundância de compostos orgânicos voláteis na respiração, pois o stress oxidativo causa peroxidação lipídica de ácidos gordos nas membranas, e produz alcanos e metilalcanos que são catabolizados pelo citocromo. Neste estudo pacientes com CCR e da mama serão identificados através de amostras de ar expirado e serão discriminados dos participantes saudáveis (Galimidi & Hovers, 2011).

3.3. Discussão integrada

Neste capítulo pretende-se apresentar uma discussão integrada quanto aos estudos pré-clínicos e os ensaios clínicos recentemente desenvolvidos quanto à aplicação de abordagens nanotecnológicas para o diagnóstico e/ou tratamento do CCR.

3.3.1. Distribuição por aplicação e ano de publicação

A distribuição dos estudos pré-clínicos e dos ensaios clínicos compilados neste trabalho por aplicação está apresentada na Tabela 15. Tendo em conta os estudos analisados, a aplicação predominante é no tratamento, seguido do teranóstico e a aplicação menos frequente é no diagnóstico do CCR. Relativamente aos ensaios, a aplicação que se destaca é o tratamento, e o diagnóstico encontra-se em menor quantidade. Ainda não existe estudos em fase clínica no âmbito do teranóstico.

Tabela 15 - Distribuição dos estudos *pré-clínicos* e dos *ensaios clínicos* por tipo de aplicação no CCR.

Tipo de aplicação	Nº de estudos pré-clínicos	Nº de ensaios clínicos
Tratamento	63	16
Diagnóstico	5	5
Teranóstico	10	0

Um dos pontos bastante interessante de se estudar é a distribuição dos estudos pré-clínicos de cada aplicação ao longo do tempo, desde 2015. Para facilitar a interpretação desta informação, a distribuição dos estudos pré-clínicos por aplicação e por ano de publicação estão representados na Figura 7. Como se pode observar, em todos os anos considerados a aplicação predominante é o tratamento do CCR, com a presença minoritária de aplicação quanto ao diagnóstico.

A partir de 2016, surgem estudos quanto à abordagem nanoteranóstica, que ao longo do tempo foi aumentando até atingir o seu máximo em 2019. Como nos últimos anos, a utilização de NPs teranósticas como ferramentas mistas para diagnóstico e terapêutica têm recebido crescente interesse, é compreensível que os estudos apenas de diagnóstico sejam de menor número. De facto, a comunidade científica tende a inovar e desenvolver ferramentas cada vez mais eficientes na área do nanoteranóstico.

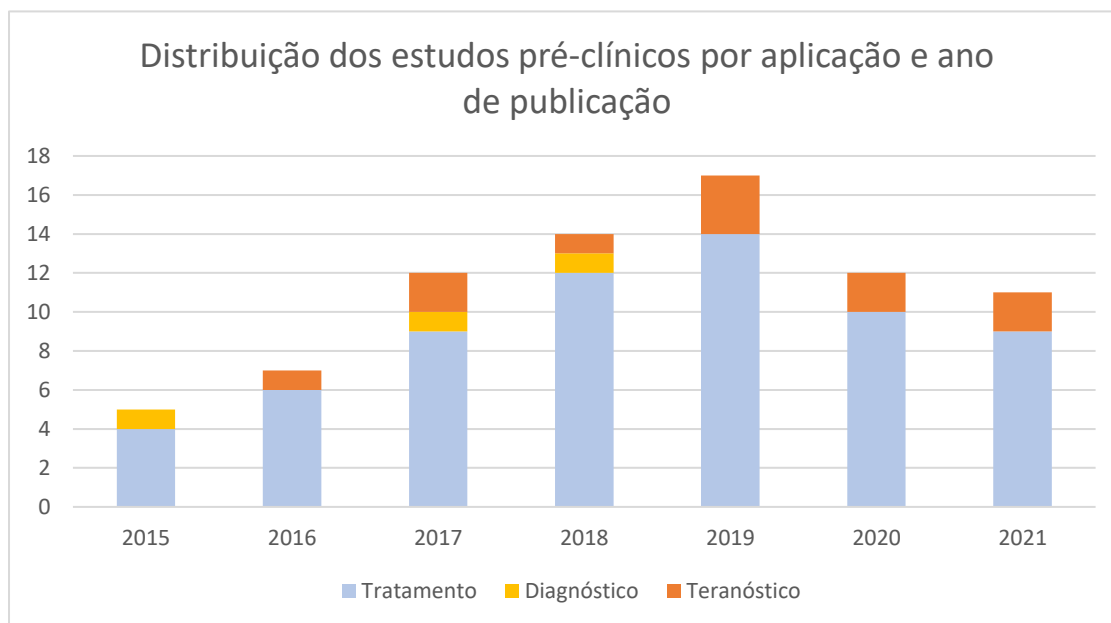


Figura 7 - Distribuição dos estudos pré-clínicos por aplicação e ano de publicação.

Relativamente à distribuição dos ensaios clínicos por aplicação e ano de publicação, pode-se observar na Figura 8, que a aplicação predominante é o tratamento. O diagnóstico, tal como observado nos estudos pré-clínicos, é apenas uma minoria dos ensaios clínicos referidos. Os ensaios clínicos no âmbito do nanotratamento mantêm-se em valores semelhantes ao longo dos anos desde 2006 até 2020, sendo que se observa um pico bastante pronunciado no ano de 2017. Por outro lado, os ensaios clínicos no âmbito do nanodiagnóstico são em menor número, sendo que existe um do ano 2011 e mais a partir de 2016. Em relação ao ano de publicação, o ano com o maior número de registos de ensaios clínicos é 2017.

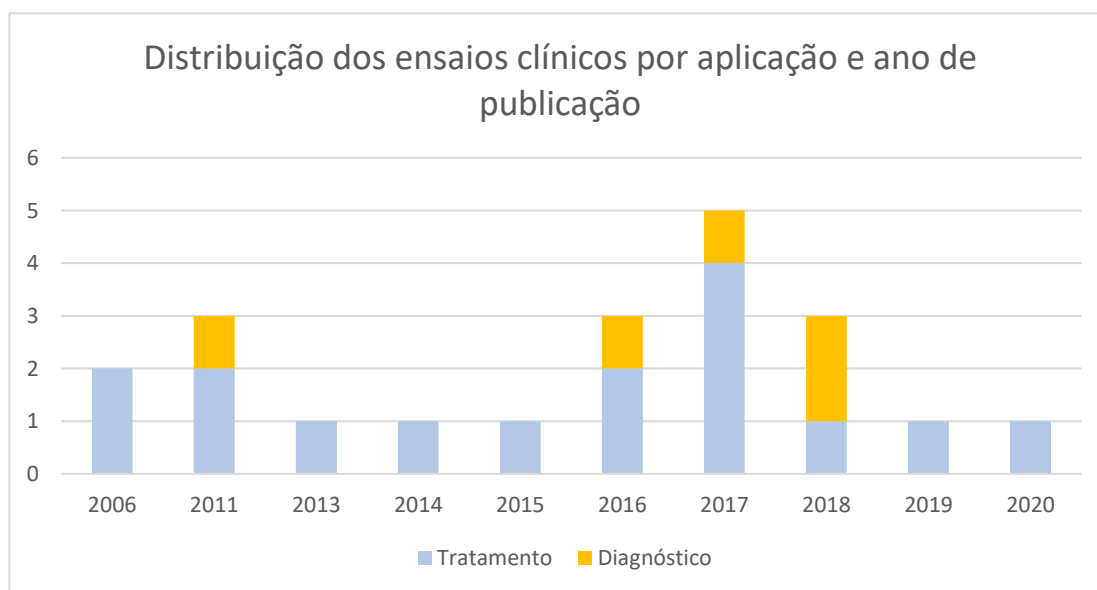


Figura 8 - Distribuição dos ensaios clínicos por aplicação e ano de publicação.

Tendo em conta a Tabela 15, é notório que o número de ensaios clínicos é bastante reduzido em comparação com o número de ensaios pré-clínicos, ainda que tenha sido considerado um período de tempo superior no primeiro caso. A aplicação da nanomedicina na prática clínica e sua comercialização requer bastante tempo e esforços excecionalmente extensos desde os estudos *in vitro* e *in vivo* desenvolvidos em laboratório. O facto de existirem poucos exemplos de nanoformulações comercializadas para o tratamento do cancro demonstra a enorme lacuna no processo de evolução de estudos laboratoriais para a aplicação clínica e sua produção em larga escala (Ferrari, 2005). Algumas lacunas identificadas consistem na falta de conhecimento das entidades científicas relativamente: às complexidades fisiopatológicas; à heterogeneidade dos locais do tumor que podem afetar a seleção do doente e ao comportamento das NPs *in vivo*, visto que esses dados estão restritos a dados animais e esses modelos não mimetizam completamente as condições reais *in vivo*.

Um dos fatores que influencia a eficácia das NPs é o efeito do sistema reticuloendotelial. Este efeito depende de inúmeros fatores, nomeadamente, interação NP-proteína, circulação sanguínea, internalização celular e penetração no tecido tumoral. Todos estes processos biológicos que afetam o comportamento de NPs *in vivo* são movidos por efeitos do sistema reticuloendotelial que não se consegue prever a partir de dados animais para humanos. Até ao momento não existe um modelo que replique de forma completa todas as características de um tumor maligno nos humanos (Alshehri et al., 2021), pelo que os resultados dos ensaios clínicos são fundamentais para caraterizar a segurança e a eficácia das formulações baseadas em abordagens nanotecnológicas.

3.3.2. Distribuição por fármaco veiculado

Ao longo da pesquisa bibliográfica efetuada, foi notório que vários compostos bioativos eram eleitos repetidamente para desenvolver nanoformulações para tratamento do CCR. Excluindo os casos em que as NPs não continham fármacos, como os casos para aplicação diagnóstica e alguns para teranóstica, os fármacos mais utilizados foram: 5-FU - isolado e/ou em combinação-, CUR e DOX - isolada e/ou em combinação-, seguidos em menor extensão de utilização: OP, capecitabina, SN-38, IRI e quercetina - Figura 9.

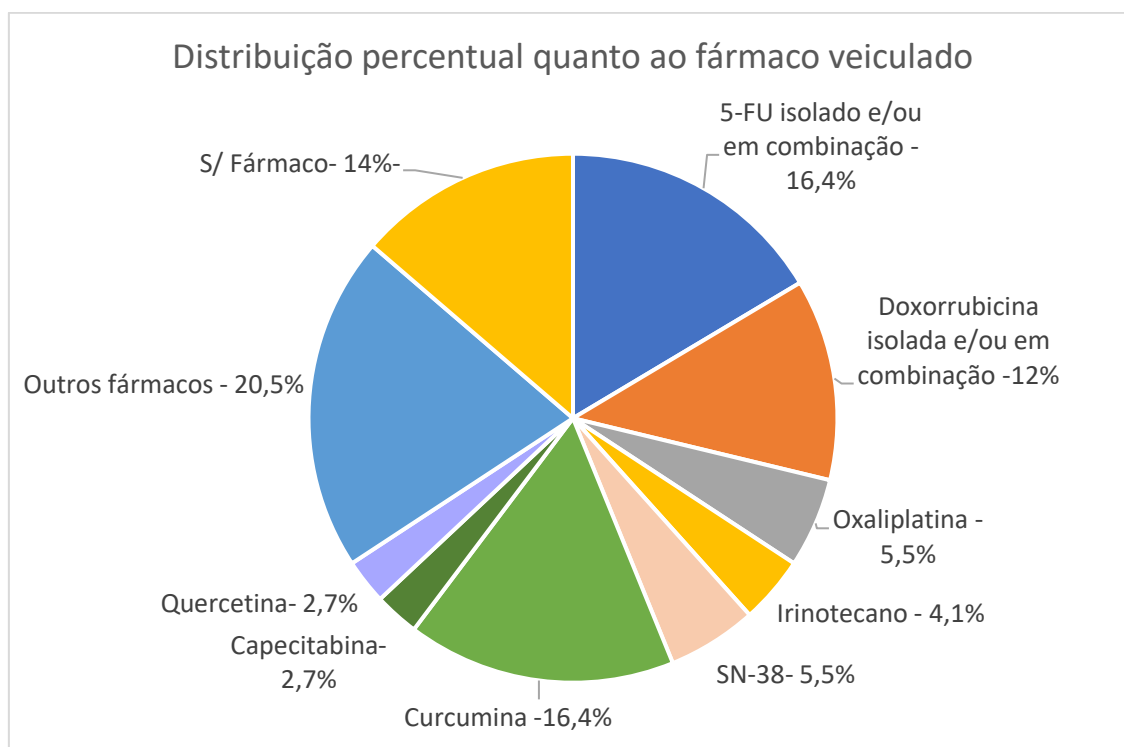


Figura 9 - Distribuição percentual quanto ao fármaco veiculado nas NPs em fase pré-clínica para tratamento da CCR.

O tratamento atual do CCR baseia-se essencialmente nos fármacos: 5-FU, OP, capecitabina e IRI. No entanto, o fármaco 5-FU é frequentemente utilizado de forma isolada ou em combinação com outros agentes citotóxicos. No entanto, como este fármaco apresenta um metabolismo rápido pela enzima dihidropirimidina desidrogenase, é necessária a administração contínua de altas doses de 5-FU para atingir a concentração terapêutica mínima (T. Smith et al., 2020). Esta concentração causa inúmeros efeitos adversos no trato gastrointestinal, reações hematológicas, neurais, entre outras (Latchman et al., 2014). Assim, entende-se que os cientistas invistam bastante no desenvolvimento de novos nanossistemas capazes de veicular o fármaco de forma a melhorar a sua eficácia terapêutica e que este fármaco, o 5-FU, isolado ou em combinação, seja veiculado em cerca de 16% dos nanossistemas.

Como a quimioterapia está associada a diversos efeitos adversos, o interesse quanto à fitoterapia tem aumentado nos últimos anos e a utilização de produtos à base de plantas na medicina tem sido grandemente explorada, nomeadamente a CUR. Este composto bioativo é considerado atóxico e seguro em estudos com animais, o que o torna um possível fármaco promissor (Hu et al., 2020). A CUR é um polifenol natural que apresenta ação anti-inflamatória e antineoplásica. Estudos pré-clínicos e clínicos revelaram que a CUR apresenta baixa solubilidade em água, baixa biodisponibilidade e elevada *clearance*, não atingindo as

concentrações sanguíneas ideais (Sabra et al., 2018). Estas características dificultam a ação antineoplásica da CUR essencial para o tratamento do cancro. Para ultrapassar estas limitações, diversas abordagens nanotecnológicas têm vindo a ser desenvolvidos para veicular a CUR (Alibolandi et al., 2018). Este interesse em veicular a CUR de forma eficiente tem sido comum a diversos grupos de investigação, representando cerca de 16% dos estudos pré-clínicos compilados. Os autores Cabeza et al., constataram o mesmo, sendo que descrevem que a CUR é um dos compostos mais encontrados nas nanoformulações para o tratamento do CCR (Cabeza et al., 2020).

Outro fármaco que está entre os três fármacos mais utilizados é a DOX, de facto, é o fármaco veiculado em cerca de 12% dos estudos pré-clínicos. Este fármaco é considerado um dos fármacos citotóxicos mais eficazes no tratamento de diversos tipos de cancro (Debele et al., 2018). No entanto, a alta eficácia deste fármaco é atingida com altas doses, o que provoca também efeitos adversos graves em tecidos saudáveis. Para além da toxicidade associada a este fármaco, também apresenta tempo de semi-vida curto o que faz com que seja eliminado da circulação antes de atingir uma concentração ideal no local do tumor (Sesarman et al., 2019). De forma a ultrapassar estas limitações, a veiculação deste fármaco de forma direccionada ao tumor é uma estratégia bastante adotada de forma a tornar o tratamento com a DOX mais seguro, mas também mais eficaz. Segundo Cabeza et al., este é o fármaco mais frequentemente encapsulado (Cabeza et al., 2020), o que de acordo com esta pesquisa elaborada nos últimos 6 anos não se confirma, ainda assim encontra-se no *top* três de fármacos mais utilizados.

Por fim, existem inúmeros outros fármacos a ser estudados como é o caso dos anticorpos bortezomib e imatinib; os taxanos: docetaxel, paclitaxel; e ainda outros como: rapamicina, resveratrol, camptotecina, niclosamida, entre outros. Estes fármacos apresentam baixa frequência e assim foram agrupados na categoria outros fármacos.

Quanto aos fármacos mais utilizados nos ensaios clínicos, pode-se facilmente observar na Figura 10 que os compostos que se destacam são: IRI - isolado e/ou em combinação, SN-38 e DOX. Os outros fármacos em menor destaque apresentam a mesma percentagem de utilização, tais como: cetuximab, RNA, AZD4635 e as combinações farmacológicas: FOLFOX, NALIRINOX e camptotecina e capecitabina.

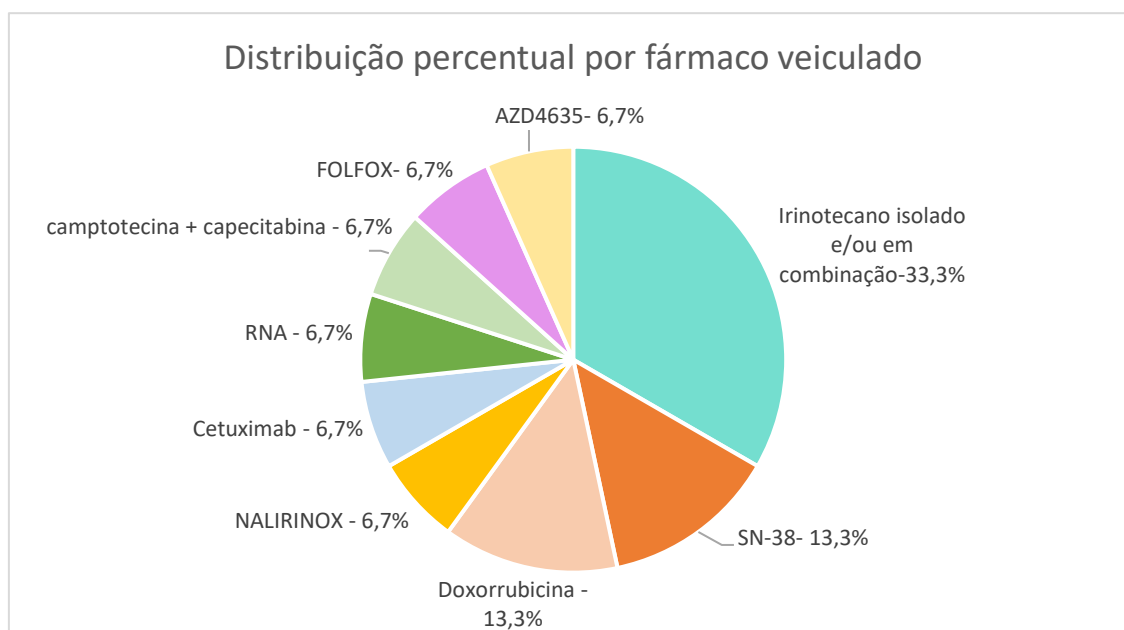


Figura 10 - Distribuição percentual quanto ao fármaco veiculado nos ensaios clínicos para tratamento da CCR.

O composto bioativo com maior percentagem de utilização nos ensaios clínicos é o IRI. Este fármaco citotóxico encontra-se nos fármacos mais utilizados na quimioterapia adjuvante no tratamento do CCR (T. Smith et al., 2020). Apesar da sua ampla aplicação clínica, a sua utilidade é limitada devido ao seu estreito índice terapêutico, podendo ser responsável por diversos efeitos adversos graves, como mielossupressão e diarreia. Este fármaco é um pró-fármaco, sendo que é hidrolisado no fígado e nas células tumorais, no seu metabolito ativo mais potente, o SN-38 (Sadat et al., 2020). Este metabolito encontra-se também entre os compostos mais encapsulados em nanoformulações em ensaios clínicos. O interesse na veiculação deste composto centra-se principalmente na sua utilização clínica limitada, sendo que apresenta baixa solubilidade em água e instabilidade química do seu anel lactona, farmacologicamente ativo em $\text{pH} > 6$ (England et al., 2017). Assim, existe um interesse enorme em desenvolver e avaliar a eficácia e segurança de várias estratégias nanotecnológicas para melhorar o índice terapêutico dos fármacos IRI e SN-38, sendo que o primeiro representa cerca de 33% dos ensaios clínicos e o segundo cerca de 13%.

O fármaco citotóxico, DOX, está novamente entre os três fármacos mais utilizados, tal como observado nos estudos em fase pré-clínica. É, de facto, um composto bastante utilizado no âmbito do nanotratamento do CCR. Como se pôde constatar, existe um elevado número de estudos em fase pré-clínica, o que demonstra o grande investimento e interesse das equipas de investigação neste fármaco. Estando atualmente a decorrer tantos ensaios

clínicos com este fármaco reflete o trabalho e os resultados obtidos na fase inicial de investigação. Este fármaco é encapsulado em nanoformulações em sensivelmente 13% dos ensaios clínicos estudados.

Como se pode observar na Figura 10, em fase clínica existem ainda outros fármacos a ser avaliados em nanoformulações. Alguns exemplos são: FOLFOX, NALIRINOX e Camptotecina e Capecitabina. A combinação de fármacos FOLFOX está nas *guidelines* de tratamento a partir do estadio II. E é de salientar que os pacientes que são submetidos a um esquema demorado de FOLFOX, normalmente 3 ou 6 meses, sofrem frequentemente de efeitos adversos pelo tratamento intensivo (Grothey et al., 2018; Guo et al., 2020). Geralmente, o objetivo das equipas de investigação é desenvolver nanoformulações que permitam diminuir as doses administradas, aumentando a acumulação de fármaco no alvo, isto é, no tumor colorretal, com a concomitante melhoria do perfil de segurança.

3.3.3. Distribuição por tipo de nanopartícula

O número total de artigos analisados quantos aos estudos pré-clínicos foi 78 e, observando a Tabela 16, consegue-se constatar que os dois tipos de NPs com maior número de estudos associados foram: as NPs baseadas em lípidos e NPs poliméricas. Estes resultados vão de encontro ao descrito por Cabeza et al., que refere que o uso de nanoformulações lipossomais e NPs poliméricas são predominantes em estudos relativos ao tratamento do CCR (Cabeza et al., 2020).

Tabela 16 - Distribuição dos estudos pré-clínicos e dos ensaios clínicos quanto ao tipo de nanopartícula.

Tipo de Nanopartícula	Nº de estudos pré-clínicos	Nº de ensaios clínicos
NPs à base de lípidos	20	10
NPs poliméricas	20	1
Micelas	7	1
Dendrímeros	8	0
NPs metálicas	8	1
NPs de sílica	7	0
NPs de carbono	8	2
NP não definida	0	6
Total	78	21

As NPs baseadas em lípidos apresentam diversas formas, estruturas e naturezas químicas e são uma das nanoplataformas mais seguras por serem constituídas por compostos biocompatíveis. Têm a capacidade de encapsular fármacos lipofílicos ou hidrofílicos, assim como produtos biofarmacêuticos, como: proteínas, RNAs e DNAs. Existem vários exemplos de NPs baseadas em lípidos, nomeadamente lipossomas, aprovadas para o tratamento clínico de outros tumores, como o Lipusu® - Paclitaxel lipossomal - e Marqibo® - vincristina lipossomal -, mostrando assim que este tipo de NP tem tido sucesso na área da nanomedicina (Tiwari et al., 2020). Como estas NPs apresentam uma grande biocompatibilidade, é de esperar que as nanoformulações à base de lípidos, principalmente os lipossomas PEGuilados e os NLCs sejam dos primeiros tipos de nanoformulações a ter sucesso em ensaios clínicos para o tratamento do CCR (Yang & Merlin, 2020). É expectável que os lipossomas tenham

maior probabilidade de obter resultados bem-sucedidos, tendo em conta que a maior parte dos ensaios clínicos decorridos e ainda a decorrer são com este tipo de NP.

As NPs poliméricas também têm tido um enorme interesse na área da nanomedicina, pois apresentam inúmeras vantagens, como estabilidade significativa em fluidos biológicos, ampla diversidade de polímeros, modulação da degradação do polímero e da libertação de fármaco encapsulado (Gagliardi et al., 2021). Estas características tornam estas NPs uma das abordagens mais estudadas na nanotecnologia para veiculação de fármacos - Tabela 16 -, tal como descrito anteriormente (Castro et al., 2020).

Tendo em conta os dados relativos aos ensaios clínicos, pode-se constatar pela Tabela 16 que o tipo de NP predominante são as NPs à base de lípidos, nomeadamente, os lipossomas. E de seguida, encontram-se as NPs não definidas. Em ensaios clínicos, esta denominação pode ser comum, pois é uma forma de não revelar pormenores essenciais dos avanços tecnológicos das equipas de investigação. O facto das NPs à base de lípidos se encontrarem com grande destaque pode estar relacionado com o facto de existirem diversos medicamentos lipossomais autorizados pelas entidades competentes e comercializados, como é o caso do Marqibo®, Thermodox® e Lipusu®.

3.3.4. Distribuição por tipo de ligando utilizado na funcionalização

Como referido em epígrafe, a principal desvantagem da quimioterapia convencional é a falta de especificidade dos fármacos e os consequentes efeitos adversos (Thorley & Tetley, 2013). Uma das vantagens da nanomedicina é a possibilidade de funcionalizar, quer passivamente, quer ativamente as NPs para o alvo pretendido, neste caso para o CCR. Neste sentido é interessante analisar quais os ligandos mais utilizados para a funcionalização ativa de NPs em desenvolvimento para o diagnóstico, tratamento e teranóstico do CCR. Na figura 11, é possível observar a distribuição percentual dos ligandos utilizados nos artigos compilados que se encontravam em fase pré-clínica. Como se pode observar na figura, os estudos de NPs não funcionalizadas ativamente, ou seja, sem ligandos, foram predominantes, cerca de 59%. Isto quer dizer que a maioria das equipas de investigação não inseriu ligandos na superfície das NPs, utilizando assim mais a funcionalização passiva e o processo de PEGuilação como estratégias. Esta aposta nos estudos sem funcionalização ativa pode ser justificado por não existir até ao momento nenhum sistema de veiculação com este tipo de funcionalização a ser utilizado na prática clínica, tal como sugerido anteriormente (Arslan et al., 2021).

Relativamente aos ligandos utilizados na funcionalização ativa, o ligando mais utilizado foi o AF, com cerca de 14% de estudos, seguido, de aptâmeros - 6%-, ácido hialurónico e anticorpos/fragmentos de anticorpos – com cerca de 4%. É de notar que tanto estratégias de funcionalização ativa seletiva, como anticorpos e aptâmeros, e não-seletiva, como AF, ácido hialurónico, têm sido exploradas.

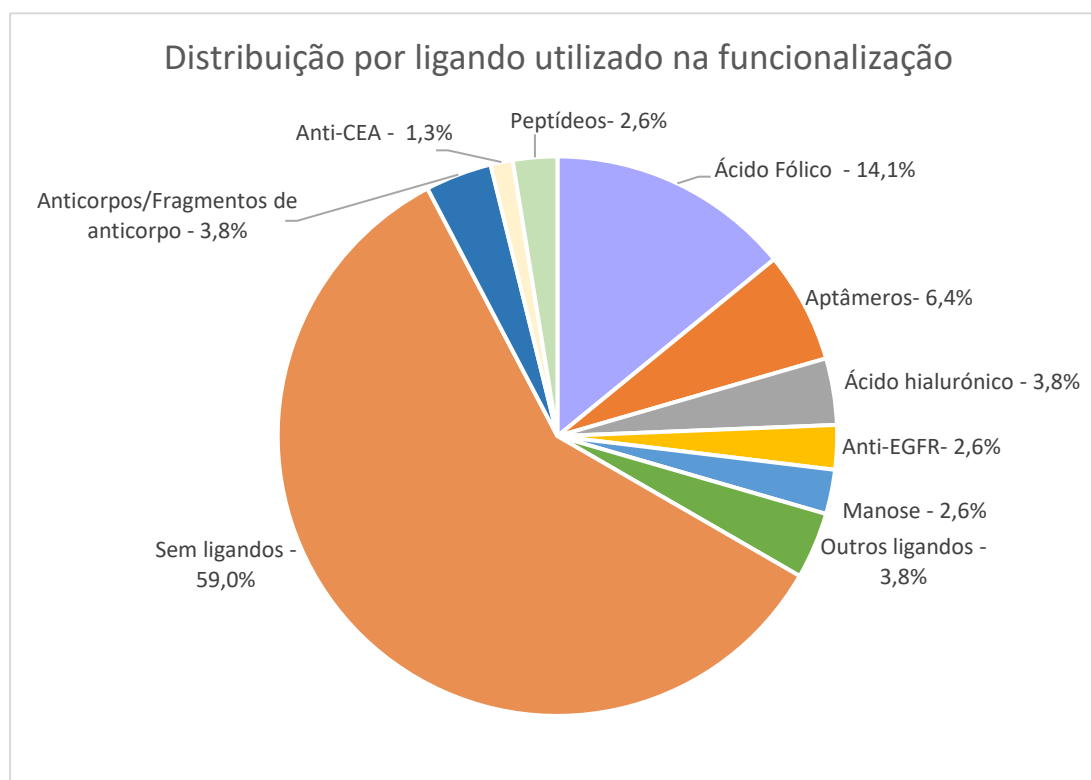


Figura 11 - Distribuição percentual por ligando utilizado na funcionalização das NPs direcionadas ao CCR.

O ligando mais utilizado foi o AF, que não é produzido endogenamente pelas células humanas e requer internalização nas células mediada por recetor, denominados, FR- α e FR- β . O FR- α é sobre-expresso num grande número de tumores malignos humanos, especificamente no CCR. Assim, o AF liga-se a células tumorais 20 vezes mais que a células epiteliais normais. Logo, a conjugação do AF na superfície de NPs tem sido uma estratégia bastante utilizada de forma a vetorizar os sistemas nanotecnológicos (Sanchez-Moreno et al., 2018; Tiwari et al., 2020).

Outro ligando bastante utilizado são os aptâmeros, sendo utilizados em 6% dos estudos analisados. Têm a capacidade de mimetizar as propriedades de anticorpos, através das suas conformações tridimensionais intramoleculares, e ligam-se especificamente a

antígenos alvo (Weihong Tan et al., 2011). A sua conjugação em NPs tem melhorado a terapêutica, pois fornece aos sistemas mais seletividade e especificidade, razão pela qual têm sido tão explorados nos últimos anos.

O ácido hialurónico é um polissacarídeo e possui boa biocompatibilidade. Os recetores de ácido hialurónico - CD44 - são pouco expressos em células epiteliais normais, no entanto, são sobre-expressos em células tumorais (Huang & Huang, 2018), nomeadamente, em células do CCR. Assim, a conjugação deste ligando na superfície das NPs tem potencial, pois o ácido hialurónico aumenta a acumulação das NPs nas células tumorais que expressem CD44 (Sanchez-Moreno et al., 2018).

O ligando anti-CEA foi utilizado em apenas 1% dos estudos, este seria um ligando que se esperaria mais utilização, pois, como referido anteriormente, o biomarcador mais sobre-expresso no CCR é o CEA. Apesar de ser um dos biomarcadores mais presentes no CCR, nos últimos anos não tem sido particularmente explorado, de acordo com os estudos analisados.

Seria também de grande interesse avaliar e estudar as estratégias de funcionalização que se encontram em desenvolvimento a nível clínico. No entanto, devido à falta de informação nas descrições das NPs utilizadas nos ensaios clínicos, não é possível comentar as estratégias de funcionalização mais adotadas.

3.3.5. Distribuição por tipo de nanopartícula e aplicação

Por último, é interessante uma análise global da distribuição dos estudos pré-clínicos e dos ensaios clínicos analisados pelos diferentes tipos de NPs com as respetivas aplicações - Tabela 17.

Tabela 17 – Distribuição dos estudos pré-clínicos (EP) e dos ensaios clínicos (EC) por tipo de nanopartícula e por aplicação. Os dados estão apresentados como número de EP + número de EC.

	Tratamento	Diagnóstico	Teranóstico	Total
NPs à base de lípidos	18 + 10	1 + 0	1 + 0	20 + 10
NPs poliméricas	20 + 1	0 + 0	0 + 0	20 + 1
Micelas	5 + 0	0 + 1	2 + 0	7 + 1
Dendrímeros	6 + 0	1 + 0	1 + 0	8 + 0
NPs metálicas	3 + 0	0 + 1	5 + 0	8 + 0
NPs de sílica	4 + 0	2 + 0	1 + 0	7 + 0
NPs de carbono	7 + 1	1 + 1	0 + 0	8 + 0
NP não definida	0 + 4	0 + 2	0 + 0	0 + 2
Total	64 + 16	5 + 5	10 + 0	78 + 21

Observando a figura 12, consegue-se mais facilmente visualizar a diferença percentual existente entre as aplicações, nomeadamente tratamento, diagnóstico e teranóstico de cada tipo de NP nos estudos pré-clínicos.

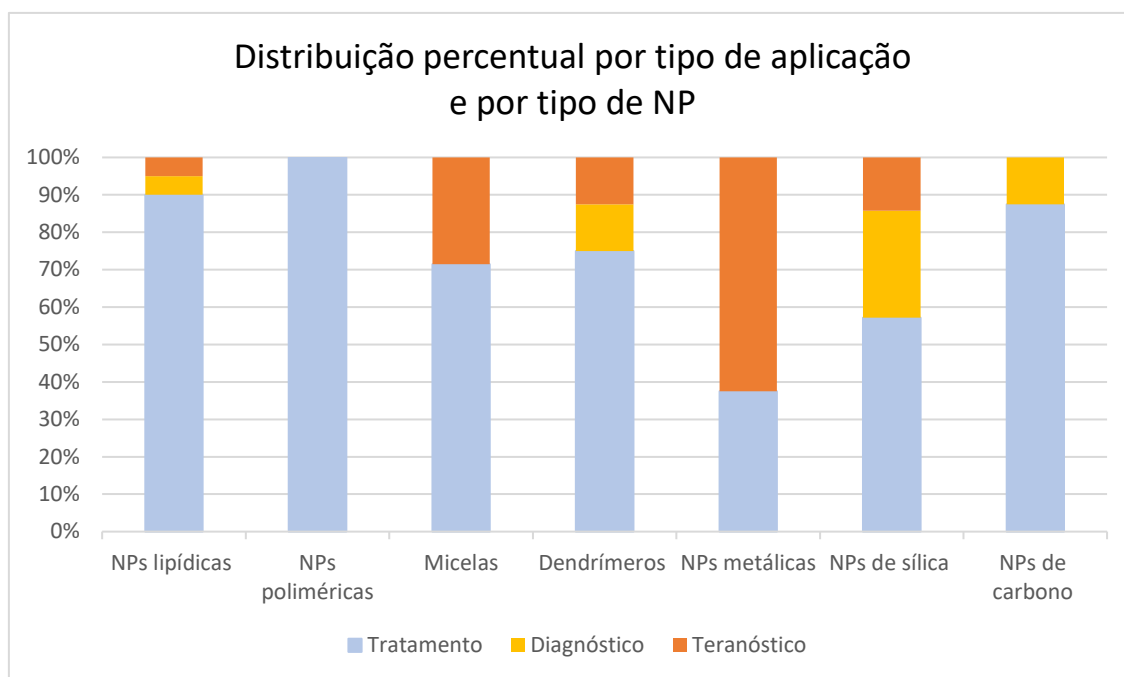


Figura 12 - Distribuição percentual por tipo de aplicação e por tipo de nanopartícula quanto aos estudos pré-clínicos em desenvolvimento no âmbito do CCR.

Os resultados obtidos foram ao encontro do descrito por Cabeza et al., pois o que os autores referem é que as NPs predominantes para o tratamento do CCR são as nanoformulações lipossomais e as NPs poliméricas. E ainda, que as NPs metálicas também são de grande interesse, mas para fins de teranóstico e imagiologia (Cabeza et al., 2020).

Como se pode observar na figura 12, as nanoformulações mais exploradas para o tratamento do CCR são as lipídicas e poliméricas, seguidas de micelas e dendrimeros. As NPs de carbono também apresentam uma grande percentagem de aplicação no tratamento, sendo que a maioria são aplicadas de forma a marcar a localização do tumor colorretal antes da cirurgia laparoscópica e não para veicular compostos antitumorais.

No nanoteranóstico, as NPs que se destacam são as constituídas por componentes metálicos. De acordo com os resultados obtidos, 62,5% dos estudos quanto a NPs metálicas tiveram como intuito uma aplicação teranóstica. Estas NPs foram em muitos casos funcionalizadas, quer pelo componente magnético da NP (funcionalização física) ou pela adição de ligandos na sua superfície.

As NPs de sílica parecem ser bastante versáteis, já que 57% dos estudos dizem respeito à área do tratamento, 28% à área do diagnóstico e 14% a uma abordagem teranóstica. Um dos tipos de NP de sílica que se destacam são as NPs de sílica mesoporosas.

Os poros existentes nestas NPs são ordenadamente arrançados, têm volume e tamanho ajustável, as NPs apresentam grande área de superfície que permite funcionalização, alta estabilidade e biocompatibilidade. Estas características permitem uma ampla aplicação biomédica deste tipo de NP (Liu et al., 2019; Mebert et al., 2017; Narayan et al., 2021).

Por fim, pode-se visualizar a diferença percentual existente entre as aplicações, nomeadamente tratamento e diagnóstico, de cada tipo de NP nos ensaios clínicos. É de notar que a abordagem teranóstica ainda não se encontra em desenvolvimento em ensaios clínicos. Como se pode constatar pela observação da Figura 13, os tipos de NPs que são mais predominantes em abordagens de nanotratamento são as NPs lipídicas e poliméricas, em linha com a tendência que pudemos também observar quanto aos estudos pré-clínicos.

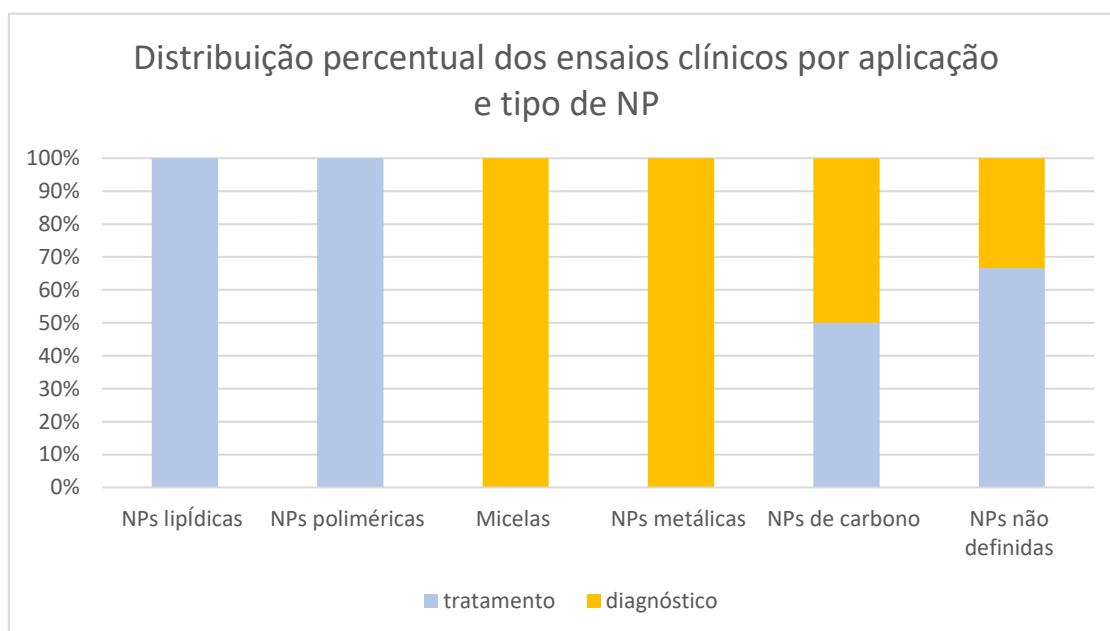


Figura 13 - Distribuição percentual por tipo de aplicação e por tipo de nanopartícula quanto aos ensaios clínicos a decorrer no âmbito do CCR.

Quanto ao diagnóstico, as NPs que se destacam são as micelas e as NPs metálicas. Tal como observado nos estudos analisados e ainda como Cabeza et al., as NPs metálicas são de grande interesse para fins de teranóstico e imagiologia (Cabeza et al., 2020), o que se reflete na sua progressão para ensaios clínicos.

As NPs de carbono e as NPs não definidas apresentam aplicações clínicas tanto na área do tratamento, como do diagnóstico. As NPs de carbono, tal como se observou anteriormente, são maioritariamente usadas para marcar a localização exata do tumor, tanto para situações pré-cirúrgicas, como para determinar o estadiamento do tumor.

Capítulo IV - Conclusão

4. Conclusão

Esta dissertação teve como objetivo central compilar os avanços recentes quanto à utilização de abordagens nanotecnológicas no âmbito do diagnóstico e/ou tratamento do CCR.

Na fase pré-clínica, as NPs à base de lípidos e as NPs poliméricas são os tipos de nanoformulações mais frequentemente exploradas com o objetivo de melhorar o tratamento do CCR. Por outro lado, as NPs que suscitam mais interesse no âmbito do diagnóstico e do teranóstico do CCR são as NPs de sílica e as metálicas, respetivamente.

Existem muitos estudos recentes que descrevem nanoformulações em desenvolvimento pré-clínico. No entanto, os ensaios clínicos a decorrer são muito mais escassos. É ainda de notar que a maioria dos ensaios clínicos dizem respeito a nanoformulações lipossomais, enquanto nos estudos pré-clínicos são explorados outros tipos de NPs.

A área do nanoteranóstico está em crescente expansão nos últimos anos, mas apenas numa fase pré-clínica. O facto de ainda não haver registos de ensaios clínicos a decorrer, indica que são necessários mais estudos e mais investimento nesta área para que esta seja verdadeiramente aplicada clinicamente.

De acordo com os estudos pré-clínicos analisados, os fármacos mais encapsulados em sistemas nanotecnológicos são o 5-FU, a CUR e a DOX. A nível dos ensaios clínicos, os fármacos mais utilizados são o IRI, o SN-38 e a DOX. Geralmente, a quimioterapia está associada a diversos efeitos adversos e o interesse em melhorar a qualidade de vida dos doentes durante a terapêutica é crescente. A encapsulação destes fármacos em sistemas nanotecnológicos pode melhorar não só o seu perfil de segurança, mas também a sua eficácia terapêutica.

Os ligandos utilizados como estratégia de funcionalização de NPs que mais se destacaram nos estudos analisados são: AF, aptâmeros, ácido hialurónico e anticorpos/fragmentos de anticorpos. Pode-se concluir que as estratégias de funcionalização ativa seletiva, como anticorpos e aptâmeros, e não-seletiva, como AF, ácido hialurónico, têm sido as mais exploradas no desenvolvimento de nanoformulações funcionalizadas. Relativamente aos ensaios clínicos, devido à falta de informação na descrição das nanoformulações dos ensaios clínicos, não é possível tirar conclusões quanto às estratégias de funcionalização mais adotadas.

É de notar que têm sido vários os avanços alcançados quanto ao nanodiagnóstico, nanoterapêutica e nanoteranóstico do CCR, particularmente no âmbito pré-clínico. No entanto, é necessário mais investimento para aumentar o número de sistemas de veiculação que atingem os ensaios clínicos. Por outro lado, são também necessárias mais pesquisas para melhor descrever e combater as complexidades do microambiente do CCR. Ao aumentar os conhecimentos sobre as características do microambiente tumoral, será também possível melhorar e aumentar as abordagens nanotecnológicas quanto ao direcionamento para alvos específicos, diagnóstico, tratamento e aplicações teranósticas eficazes e seguras.

A área da nanomedicina tem demonstrado apresentar potencial para ultrapassar várias limitações do diagnóstico e do tratamento convencional do CCR. As nanoformulações apresentam um potencial enorme para veicular fármacos de forma mais direcionada, diminuindo a sua toxicidade e efeitos adversos, melhorar a eficácia terapêutica e ultrapassar a multirresistência existente aos fármacos existentes no tratamento do CCR. Se o investimento assim o permitir, é possível que os próximos anos sejam frutíferos quanto ao número de autorizações de introdução no mercado de medicamentos baseados em abordagens nanotecnológicas para o diagnóstico e/ou tratamento do CCR.

Capítulo V – Bibliografia

5. Bibliografia

Abbasi, E., Aval, S. F., Akbarzadeh, A., Milani, M., Nasrabadi, H. T., Joo, S. W., Hanifehpour, Y., Nejati-Koshki, K., & Pashaei-Asl, R. (2014). Dendrimers: Synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Research Letters*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-247>

Abd-Rabou, A. A., & Ahmed, H. H. (2017). CS-PEG decorated PLGA nano-prototype for delivery of bioactive compounds: A novel approach for induction of apoptosis in HepG2 cell line. *Advances in Medical Sciences*, 62. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.01.003>

Abdellatif, A. (2018). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03774680. Retirado a 30 de Junho, 2021, em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03774680?term=nanoparticle&recrs=abcd&cond=Cancer&draw=2&rank=1>

Abed, Z., Beik, J., Laurent, S., Eslahi, N., Khani, T., Davani, E. S., Ghaznavi, H., & Shakeri-Zadeh, A. (2019). Iron oxide–gold core–shell nano-theranostic for magnetically targeted photothermal therapy under magnetic resonance imaging guidance. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s00432-019-02870-x>

Abruzzo, A., Zuccheri, G., Belluti, F., Provenzano, S., Verardi, L., Bigucci, F., Cerchiara, T., Luppi, B., & Calonghi, N. (2016). Chitosan nanoparticles for lipophilic anticancer drug delivery: Development, characterization and in vitro studies on HT29 cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.023>

Twelves, C., Wong, A., Nowacki M., Abt, M., Burris, H., Carrato, A., Cassidy, J., Cervantes, A., Fagerberg, J., Ph, D., Koralewski, P., Kröning, H., Maroun, J., Marschner, N., Mckendrick, J., Pawlicki, M., Rosso, R., Schüller, J., Seitz, J., Stabuc, B., Tujakowski, J., Hazel, G. Van, ... Scheithauer, W. (2005). Capecitabine as Adjuvant Treatment for Stage III Colon Cancer. 2696–2704.

Aceto, G. M., Catalano, T., Curia, M. C., & Tong, Q. (2020). Molecular Aspects of Colorectal Adenomas: The Interplay among Microenvironment, Oxidative Stress, and Predisposition. *BioMed Research International*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1726309>

Akl, M. A., Kartal-Hodzic, A., Oksanen, T., Ismael, H. R., Afouna, M. M., Yliperttula, M., Samy, A. M., & Viitala, T. (2016). Factorial design formulation optimization and in vitro

characterization of curcumin-loaded PLGA nanoparticles for colon delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2016.01.007>

Al B. Benson, Venook, A. P., Al-Hawary, M. M., Mwanzi, S. A., & Al, E. N. et. (2021). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology - Colon Cancer. NCCN Harmonized GuidelinesTM for Sub-Saharan Africa - Colon Cancer, Version 2(Colon Cancer).

Alese, O. B. (2017). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03368963. Retirado a 21 de Setembro de 2021, em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03368963>

Alibolandi, M., Hoseini, F., Mohammadi, M., Ramezani, P., Einafshar, E., Taghdisi, S. M., Ramezani, M., & Abnous, K. (2018). Curcumin-entrapped MUC-1 aptamer targeted dendrimer-gold hybrid nanostructure as a theranostic system for colon adenocarcinoma. *International Journal of Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.07.052>

Alibolandi, M., Taghdisi, S. M., Ramezani, P., Hosseini Shamili, F., Farzad, S. A., Abnous, K., & Ramezani, M. (2017). Smart AS1411-aptamer conjugated pegylated PAMAM dendrimer for the superior delivery of camptothecin to colon adenocarcinoma in vitro and in vivo. *International Journal of Pharmaceutics*, 519, 352–364. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.044>

Alkhader, E., Roberts, C. J., Rosli, R., Yuen, K. H., Seow, E. K., Lee, Y. Z., & Billa, N. (2018). Pharmacokinetic and anti-colon cancer properties of curcumin-containing chitosan-pectinate composite nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. <https://doi.org/10.1080/09205063.2018.1541500>

Alomrani, A., Badran, M., Harisa, G. I., ALshehry, M., Alhariri, M., Alshamsan, A., & Alkholief, M. (2019). The use of chitosan-coated flexible liposomes as a remarkable carrier to enhance the antitumor efficacy of 5-fluorouracil against colorectal cancer. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27, 603–611. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.02.008>

Alshehri, S., Imam, S. S., Rizwanullah, M., Akhter, S., Mahdi, W., Kazi, M., & Ahmad, J. (2021). Progress of cancer nanotechnology as diagnostics, therapeutics, and theranostics nanomedicine: Preclinical promise and translational challenges. *Pharmaceutics*, 13, 1–35. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010024>

American cancer society. (2020). Colorectal Cancer Early Detection, Diagnosis, and Staging.

American Cancer Society. (2020a). Chemotherapy for Colorectal Cancer. Retirado a 30 de Junho, 2021, em <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/treating/chemotherapy.html>

American Cancer Society. (2020b). Radiation Therapy for Colorectal Cancer. Retirado a 19 de Junho, 2021, em <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/treating/radiation-therapy.html>

American Cancer Society. (2020c). Tests to Diagnose and Stage Colorectal Cancer. Retirado a 2 de Abril, 2021, em [cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/how-diagnosed.html](https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/how-diagnosed.html)

Andrade, F., Rafael, D., Vilar-Hernández, Mireia Montero, S., Martínez-Trucharte, F., Seras-Franzoso, Joaquin Díaz-Riascos, Zamira V Boullosa, A., García-Aranda, Natalia Cámara-Sánchez, Patricia Arango, D., Andrade Nestor, M., Abasolo, Ibane Sarmiento, B., & Schwartz, S. J. (2021). Polymeric micelles targeted against CD44v6 receptor increase niclosamide efficacy against colorectal cancer stem cells and reduce circulating tumor cells in vivo. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.01.022>

Anticancer Fund. (2016). Cancro colorretal. Retirado a 5 de Abril, 2021, em <https://www.esmo.org/for-patients/patient-guides/colorectal-cancer>

Argilés, G., Tabernero, J., Labianca, R., Hochhauser, D., Salazar, R., Iveson, T., Quirke, P., Yoshino, T., Taieb, J., Martinelli, E., Arnold, D., & Committee, E. G. (2020). Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up y. *Annals of Oncology*, 31. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.06.022>

Armaghany, T., Wilson, J. D., Chu, Q., & Mills, G. (2012). Genetic Alterations in Colorectal Cancer, 19–27.

Arslan, F. B., Ozturk Atar, K., & Calis, S. (2021). Antibody-mediated drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 596. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120268>

Ashour, A. E., Badran, M., Kumar, A., Hussain, T., Ibrahim, A., & Yassin, A. A. E. B. (2019). Physical pegylation enhances the cytotoxicity of 5-fluorouracil-loaded PLGA and PCL nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 9259–9273. <https://doi.org/10.2147/IJN.S223368>

Attia, M. F., Anton, N., Wallyn, J., Omran, Z., & Vandamme, T. F. (2019). An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71, 1185–1198. <https://doi.org/10.1111/jphp.13098>

Badea, R. I., Caraiani, C. N., & Florian, D. I. (2016). Imaging of Colonic and Rectal Cancer. *Colorectal Cancer - From Pathogenesis to Treatment*. <https://doi.org/10.5772/62307>

Bartoş, A., Bartoş, D., Szabo, B., Breazu, C., Opincariu, I., Mironiuc, A., & Iancu, C. (2016). Recent achievements in colorectal cancer diagnostic and therapy by the use of nanoparticles. *Drug Metabolism Reviews*. <https://doi.org/10.3109/03602532.2015.1130052>

Batist, G., & Marshall, J. (2006). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00361842. Retirado a 11 de Novembro, 2021, em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00361842>

Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., & Rizzolio, F. (2020). The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. *Molecules*, 25(1), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>

BC Cancer. (2019). BC Cancer Protocol Summary for Adjuvant Therapy of Colon Cancer using Fluorouracil Injection and Infusion and Leucovorin Infusion. 2019, 1–5.

BC Cancer. (2021a). BC Cancer Protocol Summary for Adjuvant Combination Chemotherapy for Stage III and Stage IIB Colon Cancer using Oxaliplatin and Capecitabine. 2021, 1–8.

BC Cancer. (2021b). BC Cancer Protocol Summary for Adjuvant Combination Chemotherapy for Stage III and Stage IIB Colon Cancer using Oxaliplatin and Capecitabine. 2011, 1–8.

BC Cancer. (2021c). BC Cancer Protocol Summary for Adjuvant Therapy of Colon Cancer using Capecitabine.

Bekaii-Saab, T. S. (2017). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03337087. Retirado a 21 de Setembro, 2021, em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03337087?cond=NCT03337087&draw=2&rank=1>

Bendell, J. (2016). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02740985. Retirado a 21 de Setembro, 2021, em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02740985?term=nanoparticle&cond=Colorectal+Cancer&draw=2&rank=6>

Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N., & Farokhzad, O. C. (2014). The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Cancer Nanotechnology*, 66, 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.11.009.Cancer>

Bhattacharya, S. (2020). Fabrication and characterization of chitosan-based polymeric nanoparticles of Imatinib for colorectal cancer targeting application. *International*

Journal of Biological Macromolecules, 151, 104–115.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.151>

Bhattacharya, S. (2021). Anti-EGFR-mAb and 5-Fluorouracil Conjugated Polymeric Nanoparticles for Colorectal Cancer. <https://doi.org/10.2174/1574892815666201221121859>

Boisseau, P., & Loubaton, B. (2011). Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *Comptes Rendus Physique*, 12(7), 620–636. <https://doi.org/10.1016/j.crhy.2011.06.001>

Borys, N. (2011). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01464593. Retirado a 20 de Setembro, 2021, em <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01464593>

Brenner, H., Kloor, M., & Pox, C. P. (2014). Colorectal cancer. *The Lancet*, 383(9927), 1490–1502. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61649-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61649-9)

Bruening, W., Sullivan, N., Carter Paulson, E., Zafar, H., Mitchell, M., Treadwell, J., & Schoelles, K. (2014). Imaging Tests for the Staging of Colorectal Cancer. Comparative Effectiveness Review No. 142. (Prepared by the ECRI Institute-Penn Medicine Evidence-Based Practice Center under Contract No. 290-2012-00011-I.), 142, 1–43. www.effectivehealthcare.ahrq.gov/reports/final.cfm

Cabeza, L., Perazzoli, G., Mesas, C., Jiménez-Luna, C., Prados, J., Rama, A. R., & Melguizo, C. (2020). Nanoparticles in Colorectal Cancer Therapy: Latest In Vivo Assays, Clinical Trials, and Patents. *AAPS PharmSciTech*, 21(5). <https://doi.org/10.1208/s12249-020-01731-y>

Cancer Treatment Centers of America. (2021). Diagnosing colorectal cancer. Retirado a 28 de Abril, 2021, em <https://www.cancercenter.com/cancer-types/colorectal-cancer/diagnosis-and-detection>

Cappell, M. S. (2005). From Colonic Polyps to Colon Cancer: Pathophysiology, Clinical Presentation, and Diagnosis. 25. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2004.12.010>

Cappell, M. S. (2008). Pathophysiology, Clinical Presentation, and Management of Colon Cancer. *Gastroenterology Clinics of North America*, 37, 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2007.12.002>

Carvalho, M. R., Reis, R. L., & Oliveira, J. M. (2020). Dendrimer nanoparticles for colorectal cancer applications. *Journal of Materials Chemistry B*. <https://doi.org/10.1039/c9tb02289a>

Casalta-Lopes, J., Abrantes, A. M., Laranjo, M., Rio, J., Gonçalves, A. C., Oliveiros, B., Sarmiento-Ribeiro, A. B., & Botelho, M. F. (2011). Efflux Pumps Modulation in Colorectal

Adenocarcinoma Cell Lines: The Role of Nuclear Medicine. *Journal of Cancer Therapy*, 02(03), 408–417. <https://doi.org/10.4236/jct.2011.23056>

Castro, K. C. de, Costa, J. M., & Campos, M. G. N. (2020). Drug-loaded polymeric nanoparticles: a review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 1–13. <https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1798436>

CDC - Centers for Disease Control and Prevention (2021). Colorectal (Colon) Cancer. What Are the Symptoms of Colorectal Cancer? Retirado a 6 de Abril, 2021, em https://www.cdc.gov/cancer/colorectal/basic_info/symptoms.htm

Celsion Corporation. (2018). ThermoDox®. Retirado a 30 de Setembro, 2021, em <https://celsion.com/thermodox/>

Cerqueira, B. B. S., Lasham, A., Shelling, A. N., & Al-Kassas, R. (2015). Nanoparticle therapeutics: Technologies and methods for overcoming cancer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.10.007>

Chabner B, Lynch T, L. D. editors: (2014). *Harrison's manual of oncology*. 2nd Edition.

Chen, N. T., Souris, J. S., Cheng, S.-H., Chu, C.-H., Wang, Y.-C., Konda, V., Dougherty, U., Bissonnette, M., Mou, C.-Y., Chen, C.-T., & Lo, L.-W. (2017). Lectin-functionalized mesoporous silica nanoparticles for endoscopic detection of premalignant colonic lesions. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.03.014>

Chen, Y. Q., Zhu, W. T., Lin, C. Y., Yuan, Z. W., Li, Z. H., & Yan, P. K. (2021). Delivery of rapamycin by liposomes synergistically enhances the chemotherapy effect of 5-fluorouracil on colorectal cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 269–281. <https://doi.org/10.2147/IJN.S270939>

Cheng, L., Yang, K., Li, Y., Zeng, X., Shao, M., Lee, S. T., & Liu, Z. (2012). Multifunctional nanoparticles for upconversion luminescence/MR multimodal imaging and magnetically targeted photothermal therapy. *Biomaterials*, 33, 2215–2222. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.069>

Chevalier, M. T., Gonzalez, J., & Alvarez, V. (2015). Biodegradable polymeric microparticles as drug delivery devices. *IFMBE Proceedings*, 49, 187–190. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13117-7_49

Chibaudel, B. (2015). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02640365. Retirado a 23 de Setembro, 2021, em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02640365>

Cho, Y. S., Yoon, T. J., Jang, E. S., Soo Hong, K., Young Lee, S., Ran Kim, O., Park, C., Kim, Y. J., Yi, G. C., & Chang, K. (2010). Cetuximab-conjugated magneto-fluorescent silica nanoparticles for in vivo colon cancer targeting and imaging. *Cancer Letters*, 299, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.08.004>

Cisterna, B. A., Choi, W. Il, & Tavakkoli, A. (2016). Targeted nanoparticles for colorectal cancer.

Conniot, J., Silva, J. M., Fernandes, J. G., Silva, L. C., Gaspar, R., Brocchini, S., Florindo, H. F., & Barata, T. S. (2014). Cancer immunotherapy: Nanodelivery approaches for immune cell targeting and tracking. *Frontiers in Chemistry*, 2, 1–27. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00105>

Cross, A. J., Ferrucci, L. M., & Risch, A. (2010). A Large Prospective Study of Meat Consumption and Colorectal Cancer Risk: An Investigation of Potential Mechanisms Underlying this Association A Large Prospective Study of Meat Consumption and Colorectal Cancer Risk : An Investigation of Potential Mechan. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3929>

Cubillo, A. (2019). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04009876. Retirado a 23 de Setembro, 2021, em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04009876>

Debele, T. A., Yu, L. Y., Yang, C. S., Shen, Y. A., & Lo, C. L. (2018). PH- and GSH-Sensitive Hyaluronic Acid-MP Conjugate Micelles for Intracellular Delivery of Doxorubicin to Colon Cancer Cells and Cancer Stem Cells. *Biomacromolecules*, 19(9), 3725–3737. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00856>

Dutta, P. K., Duta, J., & Tripathi, V. S. (2004). Chitin and Chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 63, 20–31.

Ealias, A. M., & Saravanakumar, M. P. (2017). A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 263. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/263/3/032019>

Elgizawy, H. A., Ali, A. A., & Hussein, M. A. (2021). Resveratrol: Isolation, and Its Nanostructured Lipid Carriers, Inhibits Cell Proliferation, Induces Cell Apoptosis in Certain Human Cell Lines Carcinoma and Exerts Protective Effect against Paraquat-Induced Hepatotoxicity. *Journal of Medicinal Food*, 24, 89–100. <https://doi.org/10.1089/jmf.2019.0286>

EMA. (2009). Annex I - Summary of product characteristics -Erbix (cetuximab).

EMA. (2010). Anexo I - Resumo das Características do Medicamento - Avastin (bevacizumab). 1–29. Retirado a 23 de Setembro, 2021, em http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000829/WC500041059.pdf

EMA. (2015). Annex I - Summary of product characteristics -Vectibix (Panitumumab).

England, R. M., Hare, J. I., Barnes, J., Wilson, J., Smith, A., Strittmatter, N., Kemmitt, P. D., Waring, M. J., Barry, S. T., Alexander, C., & Ashford, M. B. (2017). Tumour regression and improved gastrointestinal tolerability from controlled release of SN-38 from novel polyoxazoline-modified dendrimers. *Journal of Controlled Release*. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.12.034>

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, 136–151. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.04.009>

Fatal, V., & Eugénio, J. (2010). Evolução da Nanotecnologia: abordagem nacional e internacional. 1–22.

FDA. (1995). Doxil - Prescribing Information. Sarcoma, 1–34. Retirado a 23 de Setembro, 2021, em http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2007/050718s029lbl.pdf

FDA. (2011). Leucovorin calcium injection USP Reference ID: 3070812.

FDA. (2012). Marqibo - Prescribing Information.

Ferrari, M. (2005). Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer*, 5, 161–171. <https://doi.org/10.1038/nrc1566>

Fu, S. (2017). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03203525. Retirado a 23 de Setembro, 2021, em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03203525>

Gabinete do secretário de estado e adjunto da saúde. (2017). Diário da República, 2.a série — N.º 183 — 21 de setembro de 2017. Retirado a 16 de Abril, 2021, em <https://dre.pt/application/conteudo/108189401>

Gagliardi, A., Giuliano, E., Venkateswararao, E., Fresta, M., Bulotta, S., Awasthi, V., & Cosco, D. (2021). Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 1–24. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.601626>

Galimidi, Z., & Hovers, Y. (2011). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01292369. Retirado a 21 de Setembro, 2021, em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01292369>

Ganesan, P., & Narayanasamy, D. (2017). Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 6(May), 37–56. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2017.07.002>

Garrec, D., Ranger, M., & Leroux, J. C. (2004). Micelles in anticancer drug delivery. *American Journal of Drug Delivery*, 2. <https://doi.org/10.2165/00137696-200402010-00002>

Garrigue, P., Tang, J., Ding, L., Bouhlef, A., Tintaru, A., Laurini, E., Huang, Y., Lyu, Z., Zhang, M., Fernandez, S., Balasse, L., Lan, W., Mas, E., Marson, D., Weng, Y., Liu, X., Giorgio, S., Iovanna, J., Pricl, S., ... Peng, L. (2018). Self-assembling supramolecular dendrimer nanosystem for PET imaging of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812938115>

Gaurab, R., Dattatrya, S., Amit, Y., & Kundu Gopal, C. (2014). Nanomedicine: Therapeutic applications and limitations. *Handbook of Research on Diverse Applications of Nanotechnology in Biomedicine, Chemistry, and Engineering*, January, 64–89. <https://doi.org/10.4018/978-1-4666-6363-3.ch005>

Ge, W., Li, Q., Liu, W. jia, Zhang, X. Q., Fan, X. shan, Shao, L. hua, Tao, L., Guan, W. xian, & Chen, G. (2021). Carbon nanoparticle suspension could help get a more accurate nodal staging for patient with rectal cancer. *Scientific Reports*, 11(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89541-5>

Gholami, Y. H., & Engel, A. (2018). Theranostic nanoplatforms for treatment and diagnosis of rectal and colon cancer: a brief review. *Mini-Invasive Surgery*, 2018. <https://doi.org/10.20517/2574-1225.2018.44>

Ghosn, M., Kourie, H. R., & Tabchi, S. (2015). Gastrointestinal cancers in the era of theranostics: Updates and future perspectives. *World Journal of Gastroenterology*, 21(28), 8473–8477. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i28.8473>

Gonçalves, A. S., Macedo, A. S., & Souto, E. B. (2012). Therapeutic nanosystems for oncology nanomedicine. *Clinical and Translational Oncology*, 14(12), 883–890. <https://doi.org/10.1007/s12094-012-0912-1>

Grady, W. M., & Markowitz, S. D. (2015). The Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer and Its Potential Application to Colorectal Cancer Screening. *Digestive Diseases and Sciences*, 60, 762–772. <https://doi.org/10.1007/s10620-014-3444-4>

Grimaldi, A. M., Incoronato, M., Salvatore, M., & Soricelli, A. (2017). Nanoparticle-based strategies for cancer immunotherapy and immunodiagnosics. *Nanomedicine*, 12, 2349–2365. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0208>

Grothey, A., Sobrero, A. F., Shields, A. F., Yoshino, T., Paul, J., Taieb, J., Souglakos, J., Shi, Q., Kerr, R., Labianca, R., Meyerhardt, J. A., Vernerey, D., Yamanaka, T., Boukovinas, I., Meyers, J. P., Renfro, L. A., Niedzwiecki, D., Watanabe, T., Torri, V., ... Iveson, T. (2018). Duration of Adjuvant Chemotherapy for Stage III Colon Cancer. *New England Journal of Medicine*, 378, 1177–1188. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1713709>

Guo, J., Yu, Z., Das, M., & Huang, L. (2020). Nano Codelivery of Oxaliplatin and Folinic Acid Achieves Synergistic Chemo-Immunotherapy with 5-Fluorouracil for Colorectal Cancer and Liver Metastasis. *ACS Nano*, 14, 5075–5089. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c01676>

Haller, D. G., Catalano, P. J., Macdonald, J. S., O'Rourke, M. A., Frontiera, M. S., Jackson, D. V., & Mayer, R. J. (2005). Phase III study of fluorouracil, leucovorin, and levamisole in high-risk stage II and III colon cancer: Final report of intergroup 0089. *Journal of Clinical Oncology*, 23. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.00.5686>

Haller, D. G., Tabernero, J., Maroun, J., De Braud, F., Price, T., Van Cutsem, E., Hill, M., Gilberg, F., Rittweger, K., & Schmoll, H. J. (2011). Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 29. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.6297>

Han, W., Xie, B., Li, Y., Shi, L., Wan, J., Chen, X., & Wang, H. (2019). Orally deliverable nanotherapeutics for the synergistic treatment of colitis-associated colorectal cancer. *Theranostics*, 9, 7458–7473. <https://doi.org/10.7150/thno.38081>

Handali, S., Moghimipour, E., Rezaei, M., Ramezani, Z., Kouchak, M., Amini, M., Angali, K. A., Saremy, S., & Dorkoosh, F. A. (2018). A novel 5-Fluorouracil targeted delivery to colon cancer using folic acid conjugated liposomes. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 108, 1259–1273. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.128>

Harding, J. (2014). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02102022. Retirado a 23 de Setembro, 2021, em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02102022?cond=NCT02102022&draw=2&rank=1>

Hetzel, J. T., Huang, C. S., Coukos, J. A., Omstead, K., Cerda, S. R., Yang, S., Brien, M. J. O., & Farraye, F. A. (2010). Variation in the Detection of Serrated Polyps in an Average Risk Colorectal Cancer Screening Cohort. 105(February), 2656–2664. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.315>

Hisato Kawakami, Aziz Zaanani, Frank A. Sinicrope. (2015). MSI testing and its role in the management of colorectal cancer. *International Journal of Circumpolar Health*, 60(4), 466–468. <https://doi.org/10.1007/s11864-015-0348-2.MSI>

Hosseinzadeh, H., Atyabi, F., Varnamkhasti, B. S., Hosseinzadeh, R., Ostad, S. N., Ghahremani, M. H., & Dinarvand, R. (2017). SN38 conjugated hyaluronic acid gold nanoparticles as a novel system against metastatic colon cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 526. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.04.060>

Hu, Y., He, Y., Ji, J., Zheng, S., & Cheng, Y. (2020). Tumor targeted curcumin delivery by folate-modified MPEG-PCL self-assembly micelles for colorectal cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 1239–1252. <https://doi.org/10.2147/IJN.S232777>

Huang, G., & Huang, H. (2018). Application of hyaluronic acid as carriers in drug delivery. *Drug Delivery*, 25, 766–772. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1450910>

Infarmed I.P. (2009). Resumo das características do medicamento - Irinotecano.

Infarmed I.P. (2012). Resumo das características do medicamento - Oxaliplatina.

IPO. (n.d.). Quimioterapia. Retirado a 18 de Junho, 2021, em <https://www.ipolisboa.min-saude.pt/sobre-o-cancro/tratamento/quimioterapia/>

Jalilzadeh, N., Samadi, N., Salehi, R., Dehghan, G., Iranshahi, M., Dadpour, M. R., & Hamishehkar, H. (2020). Novel nano-vehicle for delivery and efficiency of anticancer auraptene against colon cancer cells. *Scientific Reports*, 10(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58527-0>

Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., & Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9(1), 1050–1074. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>

Jena, G. K., Sahoo, S. K., Dixit, P. K., Senapati, S., & Ch. Niranjana Patra, K. C. P. (2017). Nanotechnology as cutting edge technology for screening, detection and treatment of colorectal cancer. *Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences*, 8.

Jin, Q., Deng, Y., Chen, X., & Ji, J. (2019). Rational Design of Cancer Nanomedicine for Simultaneous Stealth Surface and Enhanced Cellular Uptake [Review-article]. *ACS Nano*, 13(2), 954–977. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b07746>

Juang, V., Chang, C. H., Wang, C. S., Wang, H. E., & Lo, Y. L. (2019). pH-Responsive PEG-Shedding and Targeting Peptide-Modified Nanoparticles for Dual-Delivery of Irinotecan and microRNA to Enhance Tumor-Specific Therapy. *Small*, 15(49), 1–18. <https://doi.org/10.1002/smll.201903296>

Kamel, K. M., Khalil, I. A., Rateb, M. E., Elgendy, H., & Elhawary, S. (2017). Chitosan-Coated Cinnamon/Oregano-Loaded Solid Lipid Nanoparticles to Augment 5-Fluorouracil Cytotoxicity for Colorectal Cancer: Extract Standardization, Nanoparticle Optimization, and Cytotoxicity Evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(36), 7966–7981. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03093>

Kandasamy, G., & Maity, D. (2015). Recent advances in superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for in vitro and in vivo cancer nanotheranostics. *International Journal of Pharmaceutics*, 496, 191–218. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.058>

Kang, X. J., Wang, H. Y., Peng, H. G., Chen, B. F., Zhang, W. Y., Wu, A. H., Xu, Q., & Huang, Y. Z. (2017). Codelivery of dihydroartemisinin and doxorubicin in mannosylated liposomes for drug-resistant colon cancer therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38, 885–896. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.10>

Ke, S., Wen, X., Gurfinkel, M., Charnsangavej, C., Wallace, S., Sevick-Muraca, E. M., & Li, C. (2003). Near-Infrared Optical Imaging of Epidermal Growth Factor Receptor in Breast Cancer Xenografts. *Cancer Research*, 63, 7870–7875.

Kim, J. (2020). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04640480. Retirado a 21 de Setembro, 2021, em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04640480?term=nano&cond=Colorectal+Cancer&draw=2&rank=3>

Kim, K. S., Youn, Y. S., & Bae, Y. H. (2019). Immune-triggered cancer treatment by intestinal lymphatic delivery of docetaxel-loaded nanoparticle. *Journal of Controlled Release*, 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.08.027>

Kim, S., & Lee, K. (2016). Recent insights into nanotechnology development for detection and treatment of colorectal cancer.

Thorn, C., Sharon, M., Whirl, C. M., Howard, L. M., Teri, K., & Russ, A. B. (2011). PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways. Retirado em 20 de Maio, 2021, em <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA165291507>

Klippstein, R., Wang, J. T. W., El-Gogary, R. I., Bai, J., Mustafa, F., Rubio, N., Bansal, S., Al-Jamal, W. T., & Al-Jamal, K. T. (2015). Passively Targeted Curcumin-Loaded PEGylated PLGA Nanocapsules for Colon Cancer Therapy in Vivo. *Small*, 4704–4722. <https://doi.org/10.1002/smll.201403799>

Klose, R. J., & Bird, A. P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *31*. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.12.008>

Kotelevets, L., Chastre, E., Desmaële, D., & Couvreur, P. (2016). Nanotechnologies for the treatment of colon cancer: From old drugs to new hope. *International Journal of Pharmaceutics*, 514(1), 24–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.005>

Kuo, C. Y., Liu, T. Y., Chan, T. Y., Tsai, S. C., Hardiansyah, A., Huang, L. Y., Yang, M. C., Lu, R. H., Jiang, J. K., Yang, C. Y., Lin, C. H., & Chiu, W. Y. (2016). Magnetically triggered nanovehicles for controlled drug release as a colorectal cancer therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 140, 567–573. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.11.008>

Laroui, H., Rakhya, P., Xiao, B., Viennois, E., & Merlin, D. (2013). Nanotechnology in diagnostics and therapeutics for gastrointestinal disorders. *Digestive and Liver Disease*, 45(12), 995–1002. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2013.03.019>

Latchman, J., Guastella, A., & Tofthagen, C. (2014). 5-fluorouracil toxicity and dihydropyrimidine dehydrogenase enzyme: Implications for practice. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 18(5), 581–585. <https://doi.org/10.1188/14.CJON.581-585>

Lauka, L., & Cîrule, A. (2017). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03228095. Retirado a 22 de Setembro, 2021, em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03228095?term=nano&cond=Colorectal+Cancer&draw=2&rank=2>

Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., & Muller, R. N. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications. *Chemical Reviews*, 108, 2064–2110. <https://doi.org/10.1021/cr068445e>

Lee, S. Y., Yang, C. Y., Peng, C. L., Wei, M. F., Chen, K. C., Yao, C. J., & Shieh, M. J. (2016). A theranostic micelleplex co-delivering SN-38 and VEGF siRNA for colorectal cancer therapy. *Biomaterials*. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.068>

Lei, S., Chien, P. Y., Sheikh, S., Zhang, A., Ali, S., & Ahmad, I. (2004). Enhanced therapeutic efficacy of a novel liposome-based formulation of SN-38 against human tumor models in SCID mice. *Anti-Cancer Drugs*, 15, 773–778. <https://doi.org/10.1097/00001813-200409000-00006>

Lewinski, N., Colvin, V., & Drezek, R. (2008). Cytotoxicity of nanopartides. *Small*, 4, 26–49. <https://doi.org/10.1002/sml.200700595>

Li, J., Deng, X., Wang, L., Liu, J., & Xu, K. (2020). Clinical application of carbon nanoparticles in lymphatic mapping during colorectal cancer surgeries: A systematic review and meta-analysis. *Digestive and Liver Disease*, 52, 1445–1454. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2020.08.020>

Li, Yan, He, H., Lu, W., & Jia, X. (2017). A poly(amidoamine) dendrimer-based drug carrier for delivering DOX to gliomas cells. *RSC Advances*, 7(25), 15475–15481. <https://doi.org/10.1039/C7RA00713B>

Li, Yunhao, Jia, F., Deng, X., Wang, X., Lu, J., Shao, L., Cui, X., Pan, Z., & Wu, Y. (2020). Combinatorial miRNA-34a replenishment and irinotecan delivery: Via auto-fluorescent polymeric hybrid micelles for synchronous colorectal cancer theranostics. *Royal Society of Chemistry*. <https://doi.org/10.1039/d0bm01579b>

Liang, J., Kalady, M. F., Appau, K., & Church, J. (2012). Serrated polyp detection rate during screening colonoscopy. *Colorectal Disease*, 14(11), 1323–1327. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1318.2012.03017.x>

Licciardi, M., Scialabba, C., Puleio, R., Cassata, G., Cicero, L., Cavallaro, G., & Giammona, G. (2019). Smart copolymer coated SPIONs for colon cancer chemotherapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 556(December 2018), 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.069>

Lin, C., Zhang, Z., Wang, L., Lin, N., Yang, W., Wu, W., Wang, W., Wang, R., & Wang, Y. (2017). Effect of nano carbon tattooing on the lesion localization in the early colon cancer for additional surgical procedure after endoscopic resection. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*.

Lin, N., Qiu, J., Wu, W., Yang, W., & Wang, Y. (2019). Preoperative carbon nanoparticles and titanium clip combined labeling method for transverse colon tumor surgery. *Asian Journal of Surgery*, 42(8), 844–845. <https://doi.org/10.1016/j.asjsur.2019.04.006>

Ling, T., Zhao, Y., Huff, T. B., Hansen, M. N., Wei, A., & Cheng, J.-X. (2007). Gold Nanorods Mediate Tumor Cell Death by Compromising Membrane Integrity. <https://doi.org/10.1002/adma.200701974>

Liu, X., Jiang, J., Chan, R., Ji, Y., Lu, J., Liao, Y. P., Okene, M., Lin, J., Lin, P., Chang, C. H., Wang, X., Tang, I., Zheng, E., Qiu, W., Wainberg, Z. A., Nel, A. E., & Meng, H. (2019). Improved Efficacy and Reduced Toxicity Using a Custom-Designed Irinotecan-Delivering Silicasome for Orthotopic Colon Cancer. *ACS Nano*, 13(1), 38–53. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b06164>

Makeen, H. A., Mohan, S., Al-Kasim, M. A., Attafi, I. M., Ahmed, R. A., Syed, N. K., Sultan, M. H., Al-Bratty, M., Alhazmi, H. A., Safhi, M. M., Ali, R., & Intakhab Alam, M. (2020). Gefitinib loaded nanostructured lipid carriers: characterization, evaluation and anti-human colon cancer activity in vitro. *Drug Delivery*, 27(1), 622–631. <https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1754526>

Mebert, A. M., Baglolle, C. J., Desimone, M. F., & Maysinger, D. (2017). Nanoengineered silica: Properties, applications and toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 753–770. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.054>

MedlinePlus. (2020). STK11 gene. Retirado a 25 de Maio, 2021, em <https://medlineplus.gov/genetics/gene/stk11/>

Menconi, A., Marzo, T., Massai, L., Pratesi, A., Severi, M., Petroni, G., Antonuzzo, L., Messori, L., Pillozzi, S., & Cirri, D. (2021). Anticancer effects against colorectal cancer models of chloro(triethylphosphine)gold(I) encapsulated in PLGA–PEG nanoparticles. *BioMetals*, 34(4), 867–879. <https://doi.org/10.1007/s10534-021-00313-0>

Merrimack Pharmaceuticals. (2016). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02785068. Retirado a 22 de Setembro, 2021, em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02785068>

Minhhuyen Nguyen. (2021). Colorectal Cancer. Retirado a 10 de Abril, 2021, em [https://www.msdmanuals.com/en-pt/home/digestive-disorders/tumors-of-the-digestive-system/colorectal-cancer?query=Minhhuyen Nguyen](https://www.msdmanuals.com/en-pt/home/digestive-disorders/tumors-of-the-digestive-system/colorectal-cancer?query=Minhhuyen%20Nguyen)

Mishra, S., Manna, K., Kayal, U., Saha, M., Chatterjee, S., Chandra, D., Hara, M., Datta, S., Bhaumik, A., & Das Saha, K. (2020). Folic acid-conjugated magnetic mesoporous

silica nanoparticles loaded with quercetin: A theranostic approach for cancer management. *The Royal Society of Chemistry*, 10, 23148–23164. <https://doi.org/10.1039/d0ra00664e>

Mody, V. V., Siwale, R., Singh, A., & Mody, aHardik R. (2010). Introduction to metallic nanoparticles. *J Pharm Bioallied Sci.* <https://doi.org/10.4103/0975-7406.72127>

Moghimpour, E., Rezaei, M., Ramezani, Z., Kouchak, M., Amini, M., Angali, K. A., Dorkoosh, F. A., & Handali, S. (2018). Folic acid-modified liposomal drug delivery strategy for tumor targeting of 5-fluorouracil. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 114, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.12.011>

Mohamed, J. M., Alqahtani, A., Ahmad, F., Krishnaraju, V., & Kalpana, K. (2021). Pectin co-functionalized dual layered solid lipid nanoparticle made by soluble curcumin for the targeted potential treatment of colorectal cancer. *Carbohydrate Polymers*, 252(October 2020), 117180. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117180>

Morachis, J. M., Mahmoud, E. A., & Almutairi, A. (2012). Physical and chemical strategies for therapeutic delivery by using polymeric nanoparticles. *Pharmacological Reviews*, 64(3), 505–519. <https://doi.org/10.1124/pr.111.005363>

Moreno, C. C., Mittal, P. K., Sullivan, P. S., Rutherford, R., Staley, C. A., Cardona, K., Hawk, N. N., Dixon, W. T., Kitajima, H. D., Kang, J., Small, W. C., Oshinski, J., & Votaw, J. R. (2016). Colorectal Cancer Initial Diagnosis: Screening Colonoscopy, Diagnostic Colonoscopy, or Emergent Surgery, and Tumor Stage and Size at Initial Presentation. *Clinical Colorectal Cancer*, 15(1), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2015.07.004>

Mosafer, J., Abnous, K., Tafaghodi, M., Mokhtarzadeh, A., & Ramezani, M. (2017). In vitro and in vivo evaluation of anti-nucleolin-targeted magnetic PLGA nanoparticles loaded with doxorubicin as a theranostic agent for enhanced targeted cancer imaging and therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.12.009>

Munding, J., & Tannapfel, A. (2014). Epidemiology of colorectal adenomas and histopathological assessment of endoscopic specimens in the colorectum. *Viszeralmedizin: Gastrointestinal Medicine and Surgery*. <https://doi.org/10.1159/000357744>

Nabavizadeh, F., Fanaei, H., Imani, A., Vahedian, J., Amoli, Fahimeh Asadi Ghorbi, J., Sohanaki, H., Mehdi Mohammadi, S., & Golchoobian, R. (2016). Evaluation of Nanocarrier Targeted Drug Delivery of Capecitabine-PAMAM Dendrimer Complex in a Mice Colorectal Cancer Model.

Naeem, M., Azeem, U., Fazli, A., & Jiafu, S. (2020). Advances in colon-targeted nano-drug delivery systems: challenges and solutions. *Archives of Pharmacal Research*. <https://doi.org/10.1007/s12272-020-01219-0>

Nahak, P., Gajbhiye, R. L., Karmakar, G., Guha, P., Roy, B., Besra, S. E., Bikov, A. G., Akentiev, A. V., Noskov, B. A., Nag, K., Jaisankar, P., & Panda, A. K. (2018). Orcinol Glucoside Loaded Polymer - Lipid Hybrid Nanostructured Lipid Carriers: Potential Cytotoxic Agents against Gastric, Colon and Hepatoma Carcinoma Cell Lines. *Pharmaceutical Research*, 35(10). <https://doi.org/10.1007/s11095-018-2469-3>

Näkki, S., Wang, J. T. W., Wu, J., Fan, L., Rantanen, J., Nissinen, T., Kettunen, M. I., Backholm, M., Ras, R. H. A., Al-Jamal, K. T., Lehto, V. P., & Xu, W. (2019). Designed inorganic porous nanovector with controlled release and MRI features for safe administration of doxorubicin. *International Journal of Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.10.074>

Narayan, R., Gadag, S., Cheruku, S. P., Raichur, A. M., Day, C. M., Garg, S., Manandhar, S., Pai, K. S. R., Suresh, A., Mehta, C. H., Nayak, Y., Kumar, N., & Nayak, U. Y. (2021). Chitosan-glucuronic acid conjugate coated mesoporous silica nanoparticles: A smart pH-responsive and receptor-targeted system for colorectal cancer therapy. *Carbohydrate Polymers*, 261. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117893>

Narayan, R., Nayak, U. Y., Raichur, A. M., & Garg, S. (2018). Mesoporous silica nanoparticles: A comprehensive review on synthesis and recent advances. *Pharmaceutics*, 10, 1–49. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030118>

Narmani, A., Kamali, M., Amini, B., Salimi, A., & Panahi, Y. (2018). Targeting delivery of oxaliplatin with smart PEG-modified PAMAM G4 to colorectal cell line: In vitro studies. *Process Biochemistry*, 69, 178–187. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.014>

Natarajan, S. K., & Selvaraj, S. (2014). Mesoporous silica nanoparticles: importance of surface modifications and its role in drug delivery. *RSC Advances*,. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/c4ra00781f>

NCBI. (2021). STK11 serine/threonine kinase 11. Retirado a 20 de Abril, 2021, em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6794>

NCCN. (2021). Colon cancer.

NHS. (2018). MRI scan. Retirado a 20 de Maio, 2021, em <https://www.nhs.uk/conditions/mri-scan/>

NHS. (2019). Bowel cancer. Retirado a 20 de Abril, 2021, em <https://www.nhs.uk/conditions/bowel-cancer/>

NHS. (2020a). Bowel polyps. Retirado a 22 de Abril, 2021, em <https://www.nhs.uk/conditions/bowel-polyps/#:~:text=Bowel polyps are small growths,others may have a few.>

NHS. (2020b). Chemotherapy. Retirado a 20 de Junho, 2021, em <https://www.nhs.uk/conditions/chemotherapy/>

NHS. (2021). PET scan. Retirado a 20 de Maio, 2021, em <https://www.nhs.uk/conditions/pet-scan/>

NIH. (n.d.-a). Endorectal Ultrasound. Retirado a 2 de Maio, 2021, em <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/endorectal-ultrasound>

NIH. (n.d.-b). TNM staging system. Retirado a 31 de Março, 2021, em <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/tnm-staging-system>

NIH. (2015). Cancer Staging. Retirado a 31 de Março, 2021, em <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging>

NIH. (2016). Magnetic Resonance Imaging (MRI). Retirado a 20 de Maio, 2021, em https://imaging.cancer.gov/imaging_basics/cancer_imaging/mri.htm

NIH. (2020a). Colon Cancer Treatment. Retirado a 20 de Junho, 2021, em <https://www.cancer.gov/types/colorectal/patient/colon-treatment-pdq>

NIH. (2020b). Colorectal cancer - Patient Version. Retirado a 20 de Junho, 2021, em <https://www.cancer.gov/types/colorectal>

NIH. (2021a). Stage 0 Colon Cancer Treatment. Retirado a 20 de Junho, 2021, em https://www.cancer.gov/types/colorectal/hp/colon-treatment-pdq#link/_74

NIH. (2021b). Stage II Colon Cancer Treatment. Retirado a 20 de Junho, 2021, em https://www.cancer.gov/types/colorectal/hp/colon-treatment-pdq#link/_87

NIH. (2021c). Stage IV and Recurrent Colon Cancer Treatment. Retirado a 20 de Junho, 2021, em https://www.cancer.gov/types/colorectal/hp/colon-treatment-pdq#link/_145

NIH. (2021d). Standard Treatment Options for Stage I Colon Cancer. Retirado a 20 de Junho, 2021, em https://www.cancer.gov/types/colorectal/hp/colon-treatment-pdq#_83_toc

Nosrati, R., Abnous, K., Alibolandi, M., Mosafer, J., Dehghani, S., Taghdisi, S. M., & Ramezani, M. (2021). Targeted SPION siderophore conjugate loaded with doxorubicin as a theranostic agent for imaging and treatment of colon carcinoma. *Scientific Reports*, 11, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92391-w>

Ocean, A. (2006). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00311610. Retirado a 20 de Setembro, 2021, em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00311610>

Omid C. Farokhzad, R. L. (2007). Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. *ACS Nano*.

Omid Veisheh, Jonathan Gunn, M. Z. (2010). Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.002.Design>

OncoNano Medicine. (2018). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03735680. Retirado a 20 de Setembro, 2021, em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03735680?term=micelles&cond=colorectal+cancer&draw=2&rank=1>

Otsuka, H., Nagasaki, Y., & Kataoka, K. (2003). PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(3), 403–419. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00226-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00226-0)

Pan, J. H., Abernathy, B., Kim, Y. J., Lee, J. H., Ho, J., Shin, E. C., & Kim, J. K. (2017). Cruciferous vegetables and colorectal cancer prevention through microRNA regulation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–13. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1300134>

Paschke, S., Jafarov, S., Staib, L., Kreuser, E., Link, K., & Kornmann, M. (2018). Are Colon and Rectal Cancer Two Different Tumor Entities? A Proposal to Abandon the Term Colorectal Cancer. *Cc*, 1–24. <https://doi.org/10.3390/ijms19092577>

Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. D. P., Acosta-Torres, L. S., Diaz-Torres, L. A., Grillo, R., Swamy, M. K., Sharma, S., Habtemariam, S., & Shin, H. S. (2018). Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>

Paz, M. C., Almeida Santos, M. de F. M., Santos, C. M. B., da Silva, S. W., de Souza, L. B., Lima, E. C. D., Silva, R. C., Lucci, C. M., Morais, P. C., Azevedo, R. B., & Lacava, Z. G. M. (2012). Anti-CEA loaded maghemite nanoparticles as a theragnostic device for colorectal

cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 5271–5282. <https://doi.org/10.2147/IJN.S32139>

Pereira, I. (2013). Cancro colo-retal hereditário: pesquisa de mutações em famílias portuguesas. 2012–2013.

Pishavar, E., Attaranzadeh, A., Alibolandi, M., Ramezani, M., & Hashemi, M. (2018). Modified PAMAM vehicles for effective TRAIL gene delivery to colon adenocarcinoma: in vitro and in vivo evaluation. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(sup3), S503–S513. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1500372>

Pishavar, E., Ramezani, M., & Hashemi, M. (2019). Co-delivery of doxorubicin and TRAIL plasmid by modified PAMAM dendrimer in colon cancer cells, in vitro and in vivo evaluation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 45(12), 1931–1939. <https://doi.org/10.1080/03639045.2019.1680995>

Pool, H., Campos-Vega, R., Herrera-Hernández, M. G., García-Solis, P., García-Gasca, T., Sánchez, I. C., Luna-Bárcenas, G., & Vergara-Castañeda, H. (2018). Development of genistein-PEGylated silica hybrid nanomaterials with enhanced antioxidant and antiproliferative properties on HT29 human colon cancer cells. *American Journal of Translational Research*, 10(8), 2306–2323.

Prabhu, R. H., Patravale, V. B., & Joshi, M. D. (2015). Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: Current insights. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 1001–1018. <https://doi.org/10.2147/IJN.S56932>

Preksha Vinchhi, M. M. P. (2021). Triumph against cancer: invading colorectal cancer with nanotechnology. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/17425247.2021.1889512>

Raghu Dhanapal, TR Saraswathi, R. N. G. (2011). Cancer cachexia. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP*. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.86670>

Rajpoot, K., & Jain, S. K. (2018). Colorectal cancer-targeted delivery of oxaliplatin via folic acid-grafted solid lipid nanoparticles: preparation, optimization, and in vitro evaluation. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 1236–1247. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1366338>

Rajpoot, K., & Jain, S. K. (2020). ^{99m}Tc-labelled and pH-awakened microbeads entrapping surface-modified lipid nanoparticles for the augmented effect of oxaliplatin in the therapy of colorectal cancer. *Journal of Microencapsulation*, 37(8), 609–623. <https://doi.org/10.1080/02652048.2020.1829141>

Rampado, R., Crotti, S., Caliceti, P., Pucciarelli, S., & Agostini, M. (2019). Nanovectors Design for Theranostic Applications in Colorectal Cancer. *Journal of Oncology*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2740923>

Ramsden, J. J. (2016). What is nanotechnology? *Nanotechnology*, 1–18. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-39311-9.00007-8>

Rashid, A., & Issa, J. P. J. (2004). CpG Island Methylation in Gastroenterologic Neoplasia: A Maturing Field. 1578–1588. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.09.007>

Rawla, P., Sunkara, T., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przegląd Gastroenterologiczny*, 14(2), 89–103. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072>

Rentsch, M., Schiergens, T., Khandoga, A., & Werner, J. (2016). Surgery for colorectal cancer - Trends, developments, and future perspectives. *Visceral Medicine*, 32(3), 184–191. <https://doi.org/10.1159/000446490>

Richards, D. A., Maruani, A., & Chudasama, V. (2016). Antibody fragments as nanoparticle targeting ligands: a step in the right direction. *Chemical Science*, 8(1), 63–77. <https://doi.org/10.1039/c6sc02403c>

Rudloff, U. (2011). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01437007. Retirado a 20 de Setembro, 2021, em <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01437007?cond=NCT01437007&draw=2&rank=1>

Sabra, R., Billa, N., & Roberts, C. J. (2018). An augmented delivery of the anticancer agent, curcumin, to the colon. *Reactive and Functional Polymers*, 123(December 2017), 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2017.12.012>

Sabra, R., Billa, N., & Roberts, C. J. (2019). Cetuximab-conjugated chitosan-pectinate (modified) composite nanoparticles for targeting colon cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, 572, 118775. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118775>

Sadat, S. M. A., Vakili, M. R., Paiva, I. M., Weinfeld, M., & Lavasanifar, A. (2020). Development of self-associating sn-38-conjugated poly(Ethylene oxide)-poly(ester) micelles for colorectal cancer therapy. *Pharmaceutics*, 12(11), 1–22. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111033>

Sampson, J. R., Jones, S., Dolwani, S., & Cheadle, J. P. (2005). MutYH (MYH) and colorectal cancer. 679–683.

Sanchez-Moreno, P., Ortega-Vinuesa, J. L., Peula-Garcia, J. M., Marchal, J. A., & Boulaiz, H. (2018). Smart Drug-Delivery Systems for Cancer Nanotherapy. *Current Drug Targets*, 19(4), 339–359. <https://doi.org/10.2174/1389450117666160527142544>

Sanoj Rejinold, N., Thomas, R. G., Muthiah, M., Chennazhi, K. P., Manzoor, K., Park, I. K., Jeong, Y. Y., & Jayakumar, R. (2015). Anti-cancer, pharmacokinetics and tumor localization studies of pH-, RF- and thermo-responsive nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 249–262. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.11.044>

Satalkar, P., Elger, B. S., & Shaw, D. M. (2016). Defining Nano, Nanotechnology and Nanomedicine: Why Should It Matter? *Science and Engineering Ethics*, 22(5), 1255–1276. <https://doi.org/10.1007/s11948-015-9705-6>

Scheenen, T. (2016). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02751606. Retirado a 21 de Setembro, 2021, em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02751606?draw=2>

Schmoll, H. J., Cartwright, T., Tabernero, J., Nowacki, M. P., Figer, A., Maroun, J., Price, T., Lim, R., Van Cutsem, E., Park, Y. S., McKendrick, J., Topham, C., Soler-Gonzalez, G., De Braud, F., Hill, M., Sirzén, F., & Haller, D. G. (2007). Phase III trial of capecitabine plus oxaliplatin as adjuvant therapy for stage III colon cancer: A planned safety analysis in 1,864 patients. *Journal of Clinical Oncology*, 25(1), 102–109. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.08.1075>

Sebastian, R. (2017). Nanomedicine - the Future of Cancer Treatment: A Review. *Journal of Cancer Prevention & Current Research*, 14–18. <https://doi.org/10.15406/jcpcr.2017.08.00265>

Sen, K., Banerjee, S., & Mandal, M. (2019). Dual drug loaded liposome bearing apigenin and 5-Fluorouracil for synergistic therapeutic efficacy in colorectal cancer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 180(April), 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.04.035>

Sesarman, A., Tefas, L., Sylvester, B., Licarete, E., Rauca, V., Luput, L., Patras, L., Porav, S., Banciu, M., & Porfire, A. (2019). Co-delivery of curcumin and doxorubicin in PEGylated liposomes favored the antineoplastic C26 murine colon carcinoma microenvironment. *Drug Delivery and Translational Research*, 9(1), 260–272. <https://doi.org/10.1007/s13346-018-00598-8>

Smith, G., Carey, F. A., Beattie, J., Wilkie, M. J. V, Lightfoot, T. J., Coxhead, J., Garner, R. C., Steele, R. J. C., & Wolf, C. R. (2002). Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53—alternative genetic pathways to colorectal cancer.

Smith, T., Affram, K., Nottingham, E. L., Han, B., Amissah, F., Krishnan, S., Trevino, J., & Agyare, E. (2020). Application of smart solid lipid nanoparticles to enhance the efficacy of 5-fluorouracil in the treatment of colorectal cancer. *Scientific Reports*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73218-6>

SNS. (2020a). Quimioterapia. Retirado a 20 de Maio, 2021, em <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-oncologicas/tipos-de-tratamento-do-cancro/quimioterapia/>

SNS. (2020b). Rastreios oncológicos. Retirado a 20 de Maio, 2021, em <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-oncologicas/rastreios-oncologicos/>

SNS. (2021). Cancro. Retirado a 20 de Março, 2021, em <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-oncologicas/cancro/#sec-6>

Soe, Z. C., Poudel, B. K., Nguyen, H. T., Thapa, R. K., Ou, W., Gautam, M., Poudel, K., Jin, S. G., Jeong, J. H., Ku, S. K., Choi, H. G., Yong, C. S., & Kim, J. O. (2019). Folate-targeted nanostructured chitosan/chondroitin sulfate complex carriers for enhanced delivery of bortezomib to colorectal cancer cells. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(1), 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2018.09.004>

SPED (2021a). Cancro Colorretal. Retirado a 20 de Abril, 2021, em <https://www.sped.pt/index.php/publico/carcinoma-colorretal>

SPED (2021b). Colonoscopia. Retirado a 20 de Maio, 2021, em <https://www.sped.pt/index.php/publico/exames-endoscopicos/colonoscopia>

Strum, W. B. (2016). Colorectal Adenomas Williamson. 1065–1075. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1513581>

Świdarska, M., Choromańska, B., Dąbrowska, E., Konarzewska-Duchnowska, E., Choromańska, K., Szczurko, G., Myśliwiec, P., Dadan, J., Ładny, J. R., & Zwierz, K. (2014). The diagnostics of colorectal cancer. *Wspolczesna Onkologia*, 18(1), 1–6. <https://doi.org/10.5114/wo.2013.39995>

Tang, L., Sun, L., Zhao, P., & Kong, D. (2018). Effect of activated carbon nanoparticles on lymph node harvest in patients with colorectal cancer. *Colorectal Disease*. <https://doi.org/10.1111/codi.14538>

Taurin, S., Nehoff, H., & Greish, K. (2012). Anticancer nanomedicine and tumor vascular permeability; Where is the missing link? *Journal of Controlled Release*, 164(3), 265–275. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.07.013>

Thébault, C. J., Ramniceanu, G., Michel, A., Beauvineau, C., Girard, C., Seguin, J., Mignet, N., Ménager, C., & Doan, B. T. (2019). In Vivo Evaluation of Magnetic Targeting in Mice Colon Tumors with Ultra-Magnetic Liposomes Monitored by MRI. *Molecular Imaging and Biology*. <https://doi.org/10.1007/s11307-018-1238-3>

Thorley, A. J., & Tetley, T. D. (2013). New perspectives in nanomedicine. *Pharmacology and Therapeutics*, 140(2), 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.06.008>

Tiernan, J., Ingram, N., Marston, G., Perry, S., Rushworth, J., Coletta, L., Millner, P., Jayne, D., & Hughes, T. (2015). CEA-targeted nanoparticles allow specific in vivo fluorescent imaging of colorectal cancer models. *Nanomedicine*. <https://doi.org/10.2217/nnm.14.202>

Tiernan, J. P., Perry, S. L., Verghese, E. T., West, N. P., Yeluri, S., Jayne, D. G., & Hughes, T. A. (2013). Carcinoembryonic antigen is the preferred biomarker for in vivo colorectal cancer targeting. *British Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.605>

Tiwari, A., Saraf, S., Jain, A., Panda, P. K., Verma, A., & Jain, S. K. (2020). Basics to advances in nanotherapy of colorectal cancer. *Drug Delivery and Translational Research*, 10(2), 319–338. <https://doi.org/10.1007/s13346-019-00680-9>

Tseng, C. L., Wang, T. W., Dong, G. C., Yueh-Hsiu Wu, S., Young, T. H., Shieh, M. J., Lou, P. J., & Lin, F. H. (2007). Development of gelatin nanoparticles with biotinylated EGF conjugation for lung cancer targeting. *Biomaterials*, 28(27), 3996–4005. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.05.006>

Tsilidis, K. K., Kasimis, J. C., Lopez, D. S., Ntzani, E. E., & Ioannidis, J. P. A. (2015). Type 2 diabetes and cancer: umbrella review of meta-analyses of observational studies, 1–11. <https://doi.org/10.1136/bmj.g7607>

Wakaskar, R. R. (2018). Promising effects of nanomedicine in cancer drug delivery. *Journal of Drug Targeting*, 319–324. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2017.1377207>

Wang, A. (2013). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02010567. Retirado a 19 de Setembro, 2021, em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02010567?cond=NCT02010567&draw=2&rank=1>

Wang, E., & Wang, A. (2014). Nanoparticles and their applications in cell and molecular biology. *Library*, 6(1), 576. <https://doi.org/10.1039/c3ib40165k>.NANOPARTICLES

Wang, H., Ding, W., Peng, L., Fan, H., Yan, C., Xu, S., Sun, J., & Zh, X. (2020). Gadolinium-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Colorectal Tumor in MR Colonography. *J Biomed Nanotechnol*. <https://doi.org/10.1166/jbn.2020.2922>

Wang, L. Y., Li, J. H., Zhou, X., Zheng, Q. C., & Cheng, X. (2017). Clinical application of carbon nanoparticles in curative resection for colorectal carcinoma. *OncoTargets and Therapy*, 10, 5585–5589. <https://doi.org/10.2147/OTT.S146627>

Wang, Q., Chen, E., Cai, Y., Chen, C., Jin, W., Zheng, Z., Jin, Y., Chen, Y., Zhang, X., & Li, Q. (2016). Preoperative endoscopic localization of colorectal cancer and tracing lymph nodes by using carbon nanoparticles in laparoscopy. *World Journal of Surgical Oncology*, 14(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12957-016-0987-1>

Wang, R., Zhan, H. L., Li, D. Z., Li, H. T., Yu, L., & Wang, W. (2020). Application of endoscopic tattooing with carbon nanoparticlet in the treatment for advanced colorectal cancer. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1671-0274.2020.01.010>

Wang, Yaowen, Ma, J., Qiu, T., Tang, M., Zhang, X., & Dong, W. (2021). In vitro and in vivo combinatorial anticancer effects of oxaliplatin- and resveratrol-loaded N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles against colorectal cancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105864>

Wang, Yichao, Li, P., Chen, L., Gao, W., Zeng, F., & Kong, L. X. (2015). Targeted delivery of 5-fluorouracil to HT-29 cells using high efficient folic acid-conjugated nanoparticles. *Drug Delivery*, 22(2), 191–198. <https://doi.org/10.3109/10717544.2013.875603>

Weihong Tan, Wang, H., Chen, Y., Zhang, X., Zhu, H., Yang, C., & Yang, R. (2011). Molecular aptamers for drug delivery Weihong. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.009>

White, S. B., Kim, D.-H., Guo, Y., Li, W., Yang, Y., Chen, J., & Gogineni, Venkateswara R. Larson, A. C. (2017). Biofunctionalized hybrid Magnetic gold nanoparticles as catalysts for Photothermal ablation of colorectal liver Metastases. *Radiology*.

Wolf, A. M. D., Fontham, E. T. H., Church, T. R., Flowers, C. R., Guerra, C. E., LaMonte, S. J., Etzioni, R., McKenna, M. T., Oeffinger, K. C., Shih, Y.-C. T., Walter, L. C., Andrews, K. S., Brawley, O. W., Brooks, D., Fedewa, S. A., Manassaram-Baptiste, D., Siegel, R. L., Wender, R. C., & Smith, R. A. (2018). Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68. <https://doi.org/10.3322/caac.21457>

World Gastroenterology Organisation. (2007). Colorectal cancer screening. *Gastroenterologia y Hepatologia*, 35. [https://doi.org/10.1016/S0210-5705\(12\)70036-5](https://doi.org/10.1016/S0210-5705(12)70036-5)

Wu, C. (2018). Systemic Therapy for Colon Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 27, 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2017.11.001>

Wu, J.-Y., Li, Y.-J., Liu, X.-Y., Cai, J.-X., Hu, X.-B., Tang, T.-T., & Xiang, D.-X. (2019). 3,5,4'-trimethoxy-trans-stilbene loaded PEG-PE micelles for the treatment of colon cancer.

Wu, P., Zhou, Q., Zhu, H., Zhuang, Y., & Bao, J. (2020). Enhanced antitumor efficacy in colon cancer using EGF functionalized PLGA nanoparticles loaded with 5-Fluorouracil and perfluorocarbon. *BMC Cancer*, 20, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-06803-7>

Wu, P., Zhu, H., Zhuang, Y., Sun, X., & Gu, N. (2020). Combined therapeutic effects of ¹³¹I-Labeled and 5Fu-loaded multifunctional nanoparticles in colorectal cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 2777–2787. <https://doi.org/10.2147/IJN.S215137>

Xiao, B., Han, M. K., Viennois, E., Wang, L., Zhang, M., Si, X., & Merlin, D. (2015). Hyaluronic acid-functionalized polymeric nanoparticles for colon cancer-targeted combination chemotherapy. *Nanoscale*, 7, 17745–17755. <https://doi.org/10.1039/c5nr04831a>

Xie, J., Wang, J., Chen, H., Shen, W., Sinko, P. J., Dong, H., Zhao, R., Lu, Y., Zhu, Y., & Jia, L. (2015). Multivalent Conjugation of Antibody to Dendrimers for the Enhanced Capture and Regulation on Colon Cancer Cells. *Scientific Reports*, 5, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep09445>

Xiong, M., Lei, Q., You, X., Gao, T., Song, X., Xia, Y., Ye, T., Zhang, L., Wang, N., & Yu, L. (2017). Mannosylated liposomes improve therapeutic effects of paclitaxel in colon cancer models. *Journal of Microencapsulation*, 34, 513–521. <https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1339739>

Yang, C., & Merlin, D. (2020). Lipid-based drug delivery nanoplatfoms for colorectal cancer therapy. *Nanomaterials*, 10, 1–32. <https://doi.org/10.3390/nano10071424>

Ye, Y. (2018). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03550001. Retirado a 20 de Setembro, 2021, em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03550001?draw=2>

Yi-Cheun Yeh, Brian Creran, and V. M. R. (2012). Gold Nanoparticles: Preparation, Properties, and Applications in Bionanotechnology. *Nanoscale*. <https://doi.org/10.1039/c1nr11188d>.

Yu, M. K., Park, J., & Jon, S. (2012). Targeting strategies for multifunctional nanoparticles in cancer imaging and therapy. *Theranostics*, 2(1), 3–44. <https://doi.org/10.7150/thno.3463>

Yusefi, M., Chan, H. Y., Teow, S. Y., Kia, P., Lee-Kiun Soon, M., Sidik, N. A. B. C., & Shameli, K. (2021). 5-fluorouracil encapsulated chitosan-cellulose fiber bionanocomposites: Synthesis, characterization and in vitro analysis towards colorectal cancer cells. *Nanomaterials*, 11. <https://doi.org/10.3390/nano11071691>

Zhang, X. M., Liang, J. W., Wang, Z., Kou, J. tao, & Zhou, Z. X. (2016). Effect of preoperative injection of carbon nanoparticle suspension on the outcomes of selected patients with mid-low rectal cancer. *Chinese Journal of Cancer*, 1–5. <https://doi.org/10.1186/s40880-016-0097-z>

Zhao, Z., Ukidve, A., Kim, J., & Mitragotri, S. (2020). Targeting Strategies for Tissue-Specific Drug Delivery. *Cell*, 181(1), 151–167. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.001>

Zheng, B., Chen, L., Pan, C. C., Wang, J. Z., Lu, G. R., Yang, S. X., Xue, Z. X., Wang, F. Y., & Xu, C. L. (2018). Targeted delivery of miRNA-204-5p by PEGylated polymer nanoparticles for colon cancer therapy. *Nanomedicine*, 13(7). <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0345>

Zheng, M. (2017). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03350945. Retirado a 20 de Setembro, 2021, em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03350945?term=nanoparticle&cond=Colorectal+Cancer&draw=2>