



Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologias

**Inibição da Angiogénese em Tumores Sólidos: Aplicação dos
Lipossomas Catiónicos**

Dissertação
Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
Filipe Manuel Marques Trindade

Trabalho efetuado sob a orientação de:
Prof. Doutora Ana Grenha

2013

Inibição da angiogénese em tumores sólidos: aplicação dos lipossomas catiónicos



Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologias

**Inibição da Angiogénese em Tumores Sólidos: Aplicação dos
Lipossomas Catiónicos**

Dissertação para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas
Filipe Manuel Marques Trindade

Orientador:
Prof. Doutora Ana Grenha

2013

Declaração de autoria de trabalho:

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright© Filipe Manuel Marques Trindade

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Aos meus pais em especial, pelo enorme esforço, apoio, carinho e dedicação, acreditando sempre nas minhas capacidades, sendo imprescindíveis para a conclusão desta etapa como para a minha vida.

À minha namorada, Rita, pelo amor, motivação e confiança na minha capacidade em superar todos os objetivos, essenciais para a conclusão deste trabalho.

À minha família, pelo carinho, confiança e orgulho que sempre demonstraram, revelando sempre um enorme interesse pela minha vida académica.

À minha orientadora Professora Doutora Ana Grenha, pela ajuda no desenvolvimento desta dissertação, revelando sempre uma enorme disponibilidade no esclarecimento de dúvidas.

Aos meus amigos e colegas, que estiveram sempre presentes, pela amizade, alegria, incentivo e pelos bons momentos que passei durante esta etapa da minha vida.

A todos, um muito obrigado.

Resumo

Este trabalho pretende abordar a aplicabilidade dos lipossomas catiónicos como veículos de terapia anti-angiogénica, bem como verificar o seu efeito em diversos tipos de cancro.

O termo angiogénese define-se como o processo de formação de novos vasos a partir de uma vasculatura pré-existente. Este processo é regulado por várias vias de transdução de sinal que envolvem múltiplos fatores como, por exemplo, o VEGF, o mais potente indutor angiogénico conhecido. A angiogénese é essencial para o crescimento tumoral, pois permite um maior aporte de nutrientes e oxigénio para as células hipóxicas do interior do tumor, que se traduz num aumento da proliferação celular.

Nos últimos anos, surgiu um grande interesse na capacidade dos lipossomas catiónicos em reconhecer seletivamente as células endoteliais da vasculatura tumoral. A modificação dos constituintes dos lipossomas catiónicos, como por exemplo a inclusão de polietilenoglicol, permite ultrapassar as principais desvantagens da utilização deste tipo de formulações, como a toxicidade e a rápida eliminação do organismo. A utilização de lipossomas catiónicos na veiculação de terapia anti-angiogénica permite uma maior acumulação dos fármacos nas células-alvo, não só aumentando a eficácia terapêutica como reduzindo a toxicidade associada.

Esta estratégia poderá revelar-se um enorme passo na terapia contra o cancro, não só na inibição da progressão tumoral como também, em combinação com a quimioterapia convencional, no aumento das taxas de cura.

Palavras-chave

Angiogénese, cancro, lipossomas catiónicos, progressão tumoral, terapia anti-angiogénica, vasculatura tumoral.

Abstract

This study addresses the applicability of cationic liposomes as vehicles for anti-angiogenic therapy, as well as verifies its effect in several types of cancer.

The term angiogenesis is defined as the process of formation of new vessels from a pre-existing vasculature. This process is regulated by various signal transduction pathways that involve multiple factors such as, for example, VEGF which is the most potent inducer known angiogenesis. Angiogenesis is essential for tumour growth, since it allows an increased supply of nutrients and oxygen to the hypoxic cells within the tumour, which causes an increase in cell proliferation.

In recent years, a great interest has arisen in the ability of the cationic liposomes to selectively recognize the endothelial cells of tumour vasculature. The modification of the constituents of cationic liposomes, such as the inclusion of polyethylene glycol, overcomes the main disadvantages of using this kind of formulations, such as toxicity and rapid elimination from the organism. The use of cationic liposomes as vehicles for anti-angiogenic therapy allows a greater accumulation of drugs in target cells, not only increasing the therapeutic efficacy but also reducing the associated toxicity.

This strategy may prove to be a huge step in the therapy against cancer, not only in the inhibition of tumour progression as well as increasing cure rates, in combination with conventional chemotherapy.

Keywords

Angiogenesis, anti-angiogenic therapy, cancer, cationic lipossomes, tumour progression, tumour vasculature.

Índice

Índice figuras	IX
Índice de quadros	X
Lista de abreviaturas	XI
1. Introdução.....	1
2. Cancro	3
3. Angiogénese	7
3.1. “Switch angiogénico”	8
3.2. Mecanismos regulatórios da angiogénese	9
3.2.1. Fatores endógenos envolvidos na indução da angiogénese	9
3.2.1.1- Fator de crescimento vascular endotelial.....	9
3.2.1.2- Fator de crescimento fibroblástico básico.....	11
3.2.1.3- Outros fatores endógenos indutores da angiogénese.....	11
3.2.2. Fatores endógenos envolvidos na inibição da angiogénese	12
3.3. Inibição da angiogénese.....	13
4. A vasculatura do tumor como alvo terapêutico preferencial.....	16
5. Lipossomas catiónicos.....	20
5.1. Composição dos lipossomas catiónicos.....	21
5.2. Toxicidade associada aos lipossomas.....	22
5.3 A importância da utilização de polietilenoglicol (PEG).....	23
5.4. A influência da composição do lipossoma no tamanho, na carga catiónica e na interação com as células-alvo	26
6. Interação dos lipossomas catiónicos com as células endoteliais	28
7. Aplicação dos lipossomas catiónicos na inibição da angiogénese	31
7.1 Terapia genética	32
7.1.1. Oligonucleótidos “antisense”	32
7.1.2. siRNA	34

Inibição da angiogénese em tumores sólidos: aplicação dos lipossomas catiónicos

7.1.3. Transfeção de genes com atividade anti-angiogénica	37
7.2. Fármacos citotóxicos	38
8. Conclusão	41

Índice de figuras

Figura 3.1- Etapas da angiogénese tumoral.....	8
Figura 4.1- Classificação dos diferentes tipos de células endoteliais, de acordo com o seu fenótipo	18
Figura 5.1- Exemplos de substâncias lipídicas utilizadas na formulação de lipossomas catiónicos.....	22
Figura 5.2- Estrutura química do polietilenoglicol (PEG)	24
Figura 6.1- Mecanismo de libertação do complexo DNA/lipossoma, do interior da vesícula endossómica.....	29
Figura 7.1- Mecanismo de clivagem da porção de mRNA complementar ao OAS.....	32
Figura 7.2- Mecanismos de bloqueio da tradução proteica pelos OAS	33
Figura 7.3- Mecanismo de ação do siRNA	35

Índice de quadros

Quadro 2.1- Exemplos de agentes biológicos relacionados com certos tipos de cancro ..	4
Quadro 3.1- Outros exemplos de fatores endógenos pró-angiogénicos.....	12
Quadro 3.2- Outros exemplos de fatores endógenos anti-angiogénicos	13
Quadro 3.3- Exemplos de fármacos com atividade anti-angiogénica.....	14
Quadro 4.1- Comparação entre a vetorização de fármacos para as células tumorais e a vetorização de fármacos para as células endoteliais dos neovasos tumorais	17
Quadro 7.1- Exemplos de estudos de aplicação dos lipossomas catiónicos na vetorização de siRNA com atividade anti-angiogénica	36

Lista de abreviaturas

bFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
Chol	Colesterol
DCP-TEPA	Diacetilfosfato-tetraetilenopentamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOPE	Dioleoilfosfatidiletanolamina
DOTAP	1,2-dioleil-3-trimetilamônio-propano
DOTMA	N-(2,3-dioleoiloxipropil)-N,N,N-trimetilamônio
DSPE	1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
EGFR	Recetor do fator de crescimento epidérmico
FGFR	Recetor do fator de crescimento fibroblástico básico
HER2	Recetor do fator de crescimento epidérmico humano 2
HIF-1	Fator induzido por hipóxia 1
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana 1
HTLV-1	Vírus linfotrópico da célula-T humana 1
iRNA	RNA-interferência
mPEG	Metiléterpolietilenoglicol
mRNA	RNA mensageiro
OAS	Oligonucleótidos “ <i>antisense</i> ”
ODN	Oligodeoxiribonucleótidos
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PIGF	Fator de crescimento placentar
RGD	Tripéptido Arginina-Glicina-Aspartato
RISC	Complexo de silenciamento induzido pelo RNA
RNA	Ácido ribonucleico
siRNA	Pequeno RNA interferente
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR-1	Recetor do fator de crescimento endotelial vascular

1. Introdução

O cancro é, atualmente, uma das maiores causas de óbito na Europa. A quimioterapia existente tem como objetivo a erradicação das células malignas que constituem o tumor, ou o atraso da progressão deste, prolongando a sobrevivência do doente oncológico. No entanto, verifica-se uma elevada incidência de efeitos adversos associados à terapêutica, para além do desenvolvimento de resistências aos fármacos por parte das células malignas, o que compromete a eficácia do tratamento [1,2].

Quando os tumores atingem um determinado tamanho, o aporte de nutrientes e oxigénio fica dificultado, principalmente para as células presentes no interior do tumor. Deste modo, o próprio tumor liberta fatores endógenos responsáveis pela indução da formação de uma nova vasculatura, que o envolve e que é responsável pela rápida progressão da doença. Este processo é denominado por angiogénese [1].

A angiogénese é crucial não só para um crescimento sustentado do tumor mas também na formação de metástases, por facilitar a invasão de células malignas para a circulação sistémica. Este processo é regulado por vários fatores que atuam em diversas vias de transdução de sinal celulares, sendo o mais importante o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). O conhecimento da maior parte dos mecanismos e fatores envolvidos no processo angiogénico foi um importante passo no desenvolvimento de fármacos com atividade anti-angiogénica. No entanto, é necessária uma vetorização seletiva para os vasos tumorais de modo a aumentar a eficácia e a segurança deste tipo de abordagem [1,3].

As células endoteliais que constituem os vasos tumorais possuem diversas características únicas, quando comparadas com as células endoteliais dos vasos normais. O estudo destas características favorece o desenvolvimento de estratégias que permitam aumentar a seletividade da terapêutica anti-angiogénica para este tipo de células [1,3].

Neste trabalho, pretende-se demonstrar a aplicabilidade dos lipossomas catiónicos na vetorização, para a vasculatura tumoral, de diversos agentes terapêuticos com atividade anti-angiogénica.

Inibição da angiogénese em tumores sólidos: aplicação dos lipossomas catiónicos

Como existe uma enorme variedade no tipo de agentes terapêuticos que podem ser utilizados nestas formulações, para além das diferentes características das células-alvo consoante o tipo de tumor, é importante que a constituição dos lipossomas catiónicos seja a mais adequada para cada caso.

Inicialmente, esta dissertação tem como objetivo elucidar o leitor acerca de todos os mecanismos envolvidos no processo angiogénico, da importância deste para o tumor e das propriedades únicas dos vasos tumorais que o tornam um potencial alvo terapêutico. A fase posterior do trabalho será totalmente dedicada aos lipossomas catiónicos, tanto ao nível da composição e características destes, como à sua capacidade de vetorização de fármacos citotóxicos e material genético para os vasos tumorais, com o objetivo de diminuir a proliferação do tumor.

2. Cancro

Durante o tempo em que vivemos, as células que constituem o corpo humano renovam-se. Esta renovação celular ocorre, não de forma aleatória, mas sim segundo uma regulação muito restrita, de modo a que cada tecido possua a dimensão e forma adequadas. Este equilíbrio no número de células de determinado tecido é regulado por uma grande variedade de vias de transdução de sinal celulares, sendo que a presença de uma ou várias anomalias nestas vias podem originar uma neoplasia (do grego *neos* + *plasia* = novo crescimento) ou cancro (do grego *karkinos* = caranguejo). O termo cancro define-se então como uma desregulação no crescimento celular, com uma produção excessiva e diferenciação anormal das células que, num estado mais tardio da doença, compromete o normal funcionamento fisiológico, sendo muitas das vezes letal [1].

Através de dados estatísticos recolhidos pela OCDE referentes ao ano de 2010, o cancro já é a segunda maior causa de mortalidade nos estados membros da União Europeia, logo atrás das doenças cardiovasculares, sendo responsável por 28% dos óbitos. Segundo os mesmos dados, o género masculino é o mais afectado, possivelmente devido a uma menor existência de programas de rastreio, que dificulta o diagnóstico precoce, aliado a uma maior prevalência de fatores de risco comportamentais. Comparando os diversos tipos de cancro, o do pulmão continua a ser responsável pelo maior número de óbitos por doença cancerígena, principalmente nos países onde o tabagismo, o principal fator de risco, continua a ter uma grande prevalência [2].

Atualmente, são conhecidos uma enorme diversidade de fatores que podem levar ao aparecimento de uma doença cancerígena. O mecanismo responsável pelo aparecimento da maioria dos cancros é a exposição prolongada a agentes carcinogénicos que são capazes de causar alterações no DNA, como mutações ou deleções em genes essenciais para o normal funcionamento celular. Estes agentes podem ser divididos em agentes físicos, químicos ou biológicos [3].

A exposição solar, particularmente a radiação ultravioleta, é um exemplo de agente carcinogénico físico. É conhecido o facto de que a exposição solar excessiva e prolongada aumenta a probabilidade de desenvolvimento de melanoma. As radiações

ionizantes também estão incluídas neste grupo e tal como as anteriores, atuam por lesão direta do material genético, para além do efeito imunossupressor [4].

Em relação aos agentes biológicos, estima-se que as infeções crónicas por determinados vírus correspondem a uma percentagem de cerca de 18% da etiologia de tumores malignos. Os vírus não possuem um mecanismo de replicação próprio e necessitam de um hospedeiro para assegurar a sua proliferação, inserindo o seu material genético aleatoriamente no genoma celular do hospedeiro. Devido a este mecanismo, a transformação maligna das células pode dever-se à inserção do DNA/RNA viral próximo de genes envolvidos na regulação do ciclo celular, aumentando ou diminuindo a sua expressão. No quadro 2.1 estão representados alguns vírus que podem ter influência causal na oncogénese [1,5].

Quadro 2.1- Exemplos de agentes biológicos relacionados com certos tipos de cancro [5].

AGENTE BIOLÓGICO	TIPOS DE CANCRO ASSOCIADOS
Helicobacter-pylori	Adenocarcinoma gástrico, linfoma gástrico
Papiloma vírus humano	Cancro do cólo do útero
Hepatite B, Hepatite C	Carcinoma hepatocelular, linfoma não-Hodgkin
Epstein-Barr	Linfoma Hodgkin, linfoma Burkitt's, carcinoma nasofaríngeo
HTLV-I	Leucemia células-T
HIV-I	Diversos tipos de cancro, devido à imunossupressão severa

Existe uma enorme diversidade de agentes químicos que também podem induzir o desenvolvimento de doença cancerígena como, por exemplo, as aminas aromáticas, os hidrocarbonetos policíclicos, as mustardas e as aflotoxinas. Como resultado da atividade celular também são produzidos metabolitos endógenos mutagénicos, como os radicais livres de oxigénio que são altamente reactivos contra o DNA [1].

Inibição da angiogénese em tumores sólidos: aplicação dos lipossomas catiónicos

Prevenir totalmente a exposição a todos estes agentes torna-se uma tarefa impossível pois estes estão presentes no ar, no solo, na água, no estilo de vida de cada indivíduo e até na nossa alimentação. Devido a este facto, torna-se urgente alertar e educar a população, pois parte da solução consiste em reduzir o máximo possível a exposição a estes agentes [6].

Todos os dias o nosso material genético sofre um grande número de mutações aleatórias, mas nem todas as pessoas desenvolvem uma doença cancerígena durante a vida. A maior parte destas mutações ocorrem em locais do genoma que não afetam o normal funcionamento celular, sendo chamadas mutações “silenciosas”. Como anteriormente explicado, o maior risco de desenvolver um cancro deve-se às alterações genéticas ocorridas num conjunto de genes que regulam direta ou indiretamente o ciclo celular. Neste conjunto incluem-se os proto-oncogenes e oncogenes, os genes supressores tumorais, os genes que regulam a apoptose (suicídio celular) e também genes cuja função está incluída no sistema de reparação do DNA [1].

É certo que alguns indivíduos apresentam uma predisposição genética para o desenvolvimento da doença, devido a anormalidades nas classes de genes acima referidos, mas a hereditariedade genética apenas explica uma pequena percentagem da incidência de tumores malignos. A probabilidade de desenvolver uma doença cancerígena está assim associada aos fatores comportamentais de cada indivíduo aliado à sua componente genética [1,3].

O tratamento do cancro tem sido o maior desafio da comunidade científica ao longo das últimas décadas. A cirurgia permite a extração eficaz do tecido maligno no caso de certos tumores em estádios não metastáticos, enquanto a radioterapia e a quimioterapia visam a destruição das células tumorais, sendo que nestes últimos existe uma elevada incidência de efeitos adversos, devido à suscetibilidade das células saudáveis ao tratamento. Outras terapêuticas eficazes no tratamento do cancro incluem a hormonoterapia e a imunoterapia [3].

No entanto, existe a possibilidade de falha terapêutica devido ao desenvolvimento de resistência a fármacos pelas células tumorais. O mecanismo de resistência mais estudado é a sobreexpressão de transportadores de efluxo da família ABC por parte das células suscetíveis à quimioterapia. Estes transportadores transmembranares utilizam a energia gerada pela degradação de moléculas de ATP para excretar os fármacos do

Inibição da angiogénese em tumores sólidos: aplicação dos lipossomas catiónicos

interior das células, diminuindo a concentração intracelular do fármaco e portanto o seu efeito terapêutico. Num estudo publicado por Liu et al., realizado numa cultura de células de leucemia humana, conclui-se que o grau de resistência destas células a fármacos antineoplásicos está correlacionado com o aumento da expressão de p-glicoproteína, o transportador de efluxo mais estudado da família ABC [7,8].

Futuramente, é urgente a obtenção de um maior conhecimento dos mecanismos envolvidos na transformação maligna das células, bem como de outros processos essenciais para o desenvolvimento do tumor, para que possam ser produzidos fármacos com ação cada vez mais seletiva nas células tumorais e por isso menos tóxicos para os tecidos saudáveis. O processo angiogénico é um dos exemplos amplamente estudados.

3. Angiogénese

A célula constitui a unidade fundamental da matéria viva. Todas as células do organismo necessitam de nutrientes e oxigénio para manter a sua função fisiológica, bem como de meios para excretar metabolitos desnecessários, ou até mesmo tóxicos, resultantes da atividade celular. Estes processos são garantidos pela existência de uma rede vascular sanguínea e linfática constituídas por células endoteliais que estão organizadas em forma de túbulos de diferentes calibres, de modo a garantir uma cobertura total do corpo humano. Nesta sequência, é então necessário que estes vasos possuam uma determinada permeabilidade, não só para permitir as trocas gasosas e de nutrientes com os tecidos, mas também para o transporte de algumas células do plasma que são necessárias em locais específicos [9].

O termo angiogénese refere-se ao processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de uma vasculatura pré-existente, podendo ser diferenciada em angiogénese fisiológica ou patológica. Enquanto a primeira é crucial durante a embriogénese e até depois do nascimento sendo responsável por formar a rede vascular normal nos tecidos adultos, já a segunda, está anormalmente presente em diversos estados de doença como na inflamação crónica, cicatrização de feridas, doenças cardiovasculares isquémicas e neoplasias [10].

No caso específico das neoplasias, este processo representa um factor fundamental para o seu crescimento, sendo também determinante na formação de metástases pois a entrada de células neoplásicas na circulação e possível invasão de outros tecidos é facilitada [11].

Observou-se que, na ausência de angiogénese, o aporte de oxigénio e nutrientes para as células interiores dos tumores com tamanho superior a $2\text{-}3\text{ mm}^3$ fica geralmente comprometido, mantendo o tumor num estado de dormência. Este facto deve-se ao equilíbrio entre o número de células do interior que entram em apoptose por falta de nutrientes e o número de células que continuam a proliferar nas camadas mais externas do tumor. Para continuar o seu crescimento, o próprio tumor necessita de estimular a

criação de novos vasos sanguíneos que o envolvam e permita a difusão de gases e nutrientes a todas as células que o constituem [12].

A angiogénese pode ser diretamente estimulada pelo próprio tumor ou por outras células e matriz extracelular próxima do tumor. As células endoteliais mais próximas são então activadas para formar os novos vasos de acordo com a seguinte figura:

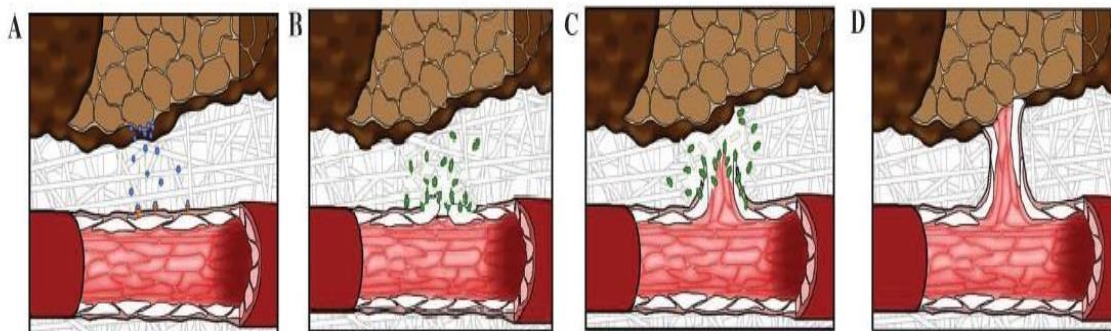


Figura 3.1- Etapas da angiogénese tumoral [13]. **Legenda:** A- Secreção de fatores pró-angiogénicos; B- Degradação proteolítica da membrana basal e da matriz extracelular que circunda o tumor; C- Proliferação e migração das células endoteliais em direcção à fonte de estímulo angiogénico; D- Remodelação de modo a formar túbulos que envolvem o tumor, permitindo uma nova rede de fluxo sanguíneo

É de realçar que a vasculatura formada pelo processo de angiogénese tumoral é muito diferente da vasculatura dita normal. Em comparação, a disposição das células endoteliais que compõem a nova vasculatura é muito mais desorganizada. Para além disso, apresentam uma menor resistência vascular e uma permeabilidade muito aumentada, que pode ser responsável pela migração de células tumorais para outros tecidos corporais, podendo dar origem a novas metástases [1,9].

3.1 “SWITCH” ANGIOGÉNICO

O termo “switch angiogénico” refere-se ao espaço temporal em que ocorre a transição do estado de dormência avascularizada de uma hiperplasia a um estado hipervascularizado e de possível rápida progressão de um tumor [14].

Trata-se de um processo complexo que envolve um desequilíbrio entre fatores pró e anti-angiogénicos e substâncias químicas externas ou produzidas pelas células tumorais, que através de cascatas de interações químicas celulares, promovem ou inibem a formação de uma nova vasculatura que envolve o tumor [15].

Segundo diversos estudos, um tumor continua em dormência enquanto há uma prevalência dos fatores anti-angiogénicos, sendo geralmente assintomático e dificilmente detetável. Quando existe uma atividade superior dos fatores pró-angiogénicos, o processo de angiogénese é iniciado e o tumor entra num estado de rápido crescimento [15-19].

3.2-MECANISMOS REGULATÓRIOS DA ANGIOGÉNESE

3.2.1-FATORES ENDÓGENOS ENVOLVIDOS NA INDUÇÃO DA ANGIOGÉNESE

O início da angiogénese é mediado por diversos fatores indutores que ativam mecanismos de sinalização celular que culminam na criação de uma nova vasculatura. Os mais amplamente estudados são o fator de crescimento endotelial vascular (do inglês “*vascular endothelial growth factor*” - VEGF) e o fator de crescimento fibroblástico básico (do inglês “*basic fibroblast growth factor*” - bFGF), embora existam muitos outros com atividade direta ou indireta na indução da angiogénese. A indução de uma nova vasculatura não é apenas induzida por um destes mecanismos, mas sim por uma sinergia de alguns ou todos os mecanismos de transdução de sinal envolvidos no processo [20].

3.2.1.1- FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF)

A superfamília VEGF é constituída por 5 famílias (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E), sendo que a família VEGF-A é a mais associada ao processo de angiogénese e o VEGF-E ao processo de linfoangiogénese. Através de um processo de splicing alternativo, o gene VEGF-A pode originar seis isoformas que variam no número de aminoácidos que as constituem (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ E VEGF₂₀₆), sendo que o VEGF₁₆₅ é a isoforma predominante na generalidade dos tumores sólidos [11].

Inibição da angiogénese em tumores sólidos: aplicação dos lipossomas catiónicos

O gene VEGF é regulado por estímulos como as condições de hipóxia, fatores de crescimento, mutações no gene p53, estrogénio, tireoestimulina (TSH), óxido nítrico ou fatores tumorais, sendo o seu produto produzido por diversos tipos de células como, por exemplo, macrófagos, células do estroma ou células tumorais [21-23].

O VEGF é ligando de dois recetores com atividade tirosina cinase, o VEGFR-1 (Flt-1) e o VEGFR-2 (KDR) e do recetor colapsina/semaforina Neuropilin 1 (NP1), um recetor envolvido no crescimento neuronal, que apenas se liga à isoforma VEGF₁₆₅. Os dois primeiros estão sobreexpressos nas células endoteliais próximas do tumor em comparação com as que constituem os vasos normais. O recetor VEGFR-2 possui menor afinidade para o VEGF, mas uma elevada atividade. Por outro lado, o recetor VEGFR-1 é o que possui maior afinidade para o VEGF, embora a sua atividade seja mais fraca, sendo que um estudo realizado concluiu que em ratinhos VEGFR-1^{-/-}, a angiogénese está aumentada devido a uma maior expressão do recetor VEGFR-2. Segundo outro estudo, o recetor NP1 contribui indiretamente para um aumento da angiogénese, ligando-se ao VEGF e aumentando a sua afinidade para o recetor VEGFR-2 [24-26].

Os efeitos do VEGF são importantes em toda a cadeia do processo angiogénico. Resultante da sua atividade, ocorre uma vasodilatação mediada pelo NO e um aumento da permeabilidade das células endoteliais, importante para a passagem de proteínas plasmáticas como o fibrinogénio e o plasminogénio, que servirão de molde para a organização das células endoteliais constituintes dos novos vasos. O aumento da permeabilidade vascular é devido ao aumento da secreção e ativação de metaloproteinases da matriz (do inglês “*matrix metalloproteinase*” - MMP1) que degradam a matriz extracelular próxima do tumor, favorecendo a migração de células endoteliais no sentido deste [20].

Diversos estudos correlacionam os níveis de VEGF com a progressão e prognóstico de alguns tipos de cancro. Num estudo publicado por Huang concluiu-se que elevados níveis de VEGF estão associados a uma diminuição do prognóstico em pacientes com cancro na bexiga. Noutros dois estudos, envolvendo pacientes com cancro gástrico ou cancro do pulmão, obtiveram-se as mesmas conclusões [27-29].

3.2.1.2-FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO BÁSICO (bFGF)

O fator de crescimento fibroblástico básico é um dos fatores pró-angiogénicos mais estudados no processo angiogénico, atuando ao nível de diferentes tipos de células, incluindo as células endoteliais [30].

A sua atividade angiogénica deve-se principalmente a interações com os recetores FGFR1 e FGFR2 e, indiretamente, com proteoglicanos heparínicos que se encontram presentes na superfície das células endoteliais e na matriz extracelular, cuja interação estabiliza e protege o bFGF da inativação [31].

O seu efeito é similar ao do VEGF e estende-se a todas as etapas da angiogénese, atuando a nível da migração, proliferação e organização das células endoteliais, na produção de metaloproteinases que degradam a matriz extracelular e na regulação da expressão de integrinas e caderinas envolvidas no processo angiogénico [20,31].

Num estudo publicado por Gualandris, onde se procedeu à transfeção com bFGF de uma linha de células endoteliais aórticas de um rato, verificou-se que, após inoculação destas células em diferentes tecidos de animais, ocorreu uma indução significativa da angiogénese [32].

3.2.1.3-OUTROS FATORES ENDÓGENOS INDUTORES DA ANGIOGÉNESE

Para além dos fatores acima referidos, existem muitos outros cuja atividade está envolvida no processo de angiogénese. Por exemplo, as integrinas possuem uma função ativa na indução da angiogénese. Funcionam como recetores de macromoléculas da matriz extracelular e de proteinases, sendo que o VEGF e o bFGF induzem a sua expressão. Por outro mecanismo actua o fator de crescimento derivado das plaquetas (do inglês *platelet derived growth factor*, PDGF) e as angiopoietinas, pois a sua função é mais restrita ao nível da organização da estrutura da nova vasculatura, sendo essencial para a sua maturação. No quadro 3.1 estão representados outros exemplos de fatores endógenos com atividade pró-angiogénica [20].

Quadro 3.1- Outros exemplos de fatores endógenos pró-angiogénicos [20].

FATOR PRÓ-ANGIOGÉNICO	EFEITO DA SUA ATIVIDADE
PlGF	Similar ao VEGF e muito importante na angiogénese patológica
Endoglina	Estabiliza os neovasos numa fase posterior, estimulando a produção da matriz extracelular
Ativadores do plasminogénio	Liberta e activa outros fatores pró-angiogénicos, com efeito importante na migração celular e remodelação da matriz
Óxido nítrico sintase e ciclooxigenase-2	Envolvidos nos processos de vasodilatação
HIF-1	Estimula a produção de VEGF e bFGF

3.2.2- FATORES ENDÓGENOS ENVOLVIDOS NA INIBIÇÃO DA ANGIOGÉNESE

Após o “switch” angiogénico, os mecanismos de inibição da angiogénese são menos ativos que os de indução. No entanto, estes são importantes para tentar atrasar o máximo possível a progressão do tumor. Embora existam muitos fatores inibitórios da angiogénese, os mais estudados são a angioestatina, a endostatina e as trombospondinas[14].

A angioestatina deriva do plasminogénio e está presente na circulação sanguínea. A sua ação anti-angiogénica não é consensual, sendo que vários mecanismos foram propostos. Um destes envolve a interação com subunidades da enzima ATP sintase nas células endoteliais, inibindo a sua proliferação através da redução das reservas de energia destas células. Outra teoria correlaciona o potencial inibitório de algumas integrinas com a diminuição da angiogénese, ao bloquear a cadeia de transdução de sinal na qual estão envolvidas [30].

Através de um mecanismo diferente, a endostatina também diminui a capacidade de migração e proliferação das células endoteliais. Derivada do colagénio XVIII, reduz a

Inibição da angiogénese em tumores sólidos: aplicação dos lipossomas catiónicos

angiogénese mediada pelos fatores VEGF e bFGF, simultaneamente á capacidade de inibir a expressão de VEGF pelas células tumorais [20,30].

Os trombospondinas, particularmente a trombospondina-1, são potentes inibidores da angiogénese. São proteínas glicosiladas que participam nas interações célula-célula e célula-matriz, sendo que a sua atividade é inibida após o “switch” angiogénico. Quando ligadas aos seus recetores, inibem a cadeia de transdução de sinal mediada pelo VEGF e bFGF. Segundo um recente estudo publicado por Fleitas em pacientes com carcinoma de pulmão de células não pequenas avançado, níveis baixos de trombospondina-1 e níveis elevados de VEGF contribuem para um aumento da progressão do tumor, piorando o prognóstico da doença. No quadro seguinte, estão representados mais alguns exemplos de fatores com atividade anti-angiogénica [30,33].

Quadro 3.2- Outros exemplos de fatores endógenos anti-angiogénicos [20].

FATOR ANTI-ANGIOGÉNICO	EFEITO DA SUA ATIVIDADE
Vasostatina e Calreticulina	Inibem replicação das células endoteliais
Factor plaquetário-4	Impede ligação do VEGF e do bFGF aos seus recetores
Inibidores de metaloproteases	Inibem degradação da matriz extracelular pelas metaloproteases
Interferão (IFN) e algumas interleucinas (IL-4, IL-12 e IL-18)	Impedem a migração das células endoteliais. O interferão reduz a expressão de bFGF

O conhecimento dos mecanismos que regulam o processo da angiogénese permite a investigação de estratégias inibitórias que poderão marcar uma mudança na forma como as doenças cancerígenas são tratadas.

3.3-INIBIÇÃO DA ANGIOGÉNESE

A inibição da angiogénese é uma estratégia importante no tratamento de diversos tipos de tumores sólidos cujo crescimento é dependente da formação de novos vasos. O objetivo deste tipo de terapêutica consiste na destruição das células tumorais por escassez de nutrientes e oxigénio essenciais para o normal funcionamento celular, impedindo o crescimento do tumor [34].

Inibição da angiogénese em tumores sólidos: aplicação dos lipossomas catiónicos

Depois de constatar que o crescimento tumoral depende essencialmente do processo angiogénico, Folkman, no início dos anos 70, foi o primeiro cientista a considerar a inibição da angiogénese como uma estratégia para o tratamento de tumores sólidos. Mas esta área só se tornou promissora nos anos 90, com a descoberta de compostos com uma potencial atividade anti-angiogénica por cientistas como Inger, que produziu o composto O-cloroacetilcarbamoil fumagilol (TNP-470), um análogo do antibiótico fumagilina, que bloqueia o ciclo celular das células endoteliais em G₁, inibindo a sua proliferação [35,36].

O primeiro composto anti-angiogénico aprovado foi o anticorpo monoclonal bevacizumab (Avastin®, Genentech), que inibe seletivamente o VEGF e que tem como indicação o tratamento do cancro do cólon metastático, cancro de pulmão de células não pequenas avançado (em combinação com carboplatina e paclitaxel) e do cancro renal metastático (em combinação com interferão alfa). Diversos ensaios clínicos têm sido efetuados para verificar a aplicabilidade terapêutica deste fármaco noutros tipos de tumores cujo crescimento é dependente dos níveis de expressão de VEGF [37-39].

A maior parte dos compostos desenvolvidos com capacidade anti-angiogénica encontram-se atualmente em ensaios clínicos. No quadro 3.3 estão representados alguns exemplos destes fármacos.

Quadro 3.3- Exemplos de fármacos com atividade anti-angiogénica.

FÁRMACO	MECANISMO DE AÇÃO	REFERÊNCIA
Vitaxin	Anticorpo monoclonal que inibe seletivamente uma classe de integrinas expressas na superfície das células endoteliais	[38]
VEGF-trap	Recetor solúvel que contém zonas idênticas aos recetores VEGFR-1 e VEGFR-2. Liga-se ao VEGF e inibe a cascata de transdução de sinal mediada por este fator	[41]
SU5416	Inibe a atividade tirosina cinase dos recetores do VEGF.	[42]
ZD6474	Bloqueia o VEGFR-2 e o EGFR	[43]
Marimastat	Inibidor das metaloproteases envolvidas na degradação da matriz celular	[43]
Combretastatina	Indução da apoptose das células endoteliais	[43]

O mecanismo de ação mais comum destes agentes terapêuticos é a inibição seletiva de moléculas envolvidas nas vias de transdução de sinal que ativam o processo angiogénico como, por exemplo, o complexo VEGF-recetor, o bFGF, as endoglinas, as integrinas ou metaloproteinases. A inibição da angiogénese pode ser conseguida através das mais diversas formulações, como por exemplo anticorpos monoclonais, fatores de crescimento dominantes (interagem com o mesmo recetor mas sem efeito angiogénico), terapia genética ou administração de moléculas com atividade anti-angiogénica [40].

O conhecimento dos fatores envolvidos no processo angiogénico é essencial para definir alvos terapêuticos, mas outros fatores deverão ser considerados de modo a aumentar a eficácia e segurança da terapêutica. Para isso, é necessário não só a descoberta de compostos com propriedades anti-angiogénicas, mas também o desenvolvimento de sistemas que permitam aumentar a seletividade da terapêutica para as células endoteliais próximas do tumor.

4. A vasculatura do tumor como alvo terapêutico preferencial

A vetorização de fármacos para as células tumorais é dificultada pelas condições fisiológicas anormais do microambiente do tumor. A proliferação excessiva de células tumorais leva a uma compressão dos vasos que rodeiam o tumor, afetando o transporte vascular do fármaco, bem como o seu extravasamento dos vasos para a região tumoral. Também a existência de uma rede vascular tortuosa e hiperpermeável afeta a eficácia terapêutica, devido à diminuição da irrigação sanguínea, provocada por uma resistência física aumentada, e à elevada pressão de líquido intersticial que diminui o transporte do fármaco dos vasos para as células tumorais. Por último, as condições de hipóxia alteram o pH em diversas zonas do tumor, tornando-se mais ácido, o que pode alterar a estabilidade e o efeito terapêutico dos fármacos utilizados [44].

As células endoteliais dos neovasos tumorais são muito mais acessíveis do que as células tumorais e igualmente suscetíveis aos agentes terapêuticos. Estima-se que a eliminação de apenas algumas células endoteliais próximas do tumor pode causar a destruição de milhares de células tumorais, devido à quebra do aporte de nutrientes e oxigénio necessários para a sobrevivência destas. Por outro lado, as células endoteliais que constituem os neovasos tumorais não são malignas e muito raramente adquirem resistências ao tratamento, ao contrário das células tumorais, onde este problema é uma barreira muito comum à eficácia terapêutica. No quadro 4.1, compararam-se algumas características entre os processos de vetorização de fármacos para as células tumorais e para as células endoteliais [45].

A eficácia deste tipo de terapêutica varia consoante o grau de dependência do tumor em relação à necessidade de formação de novos vasos para assegurar a sobrevivência das células tumorais que o constituem [46].

Como referenciado anteriormente, a angiogénese é também um processo fisiológico importante, por exemplo, na cura de feridas ou na inflamação crónica. Assim sendo, a terapia anti-angiogénica deverá ser seletiva para as células endoteliais que constituem os neovasos formados por estímulos tumorais. Esta seletividade é possível

Inibição da angiogênese em tumores sólidos: aplicação dos lipossomas catiónicos

através da elaboração de sistemas de transporte de fármacos que permitam explorar as diferenças entre os vasos normais e os vasos tumorais [10,47].

Quadro 4.1- Comparação entre a vetorização de fármacos para as células tumorais e a vetorização de fármacos para as células endoteliais dos neovasos tumorais[45].

VETORIZAÇÃO DE FÁRMACOS		
CARACTERÍSTICA	CÉLULAS TUMORAIS	CÉLULAS ENDOTELIAIS
Modelo farmacocinético	Modelo multicompartimental	Modelo monocompartimental
Célula-alvo	Células malignas do tumor	Células endoteliais não-malignas
Recetor-alvo	Antigénio tumoral	Marcadores angiogénicos
Expressão do recetor	Heterogénea entre diferentes tumores e entre as células malignas do mesmo tumor	Não foram evidenciados casos de heterogeneidade
Tipos de terapia	Fármacos citotóxicos	Fármacos citotóxicos e inibidores da angiogénese
Estabilidade genética da célula-alvo	Instável, facilmente adquirem mutações	Células diplóides e geneticamente estáveis
Desenvolvimento de resistências	Sim	Ainda não foram reportados casos de resistência

As diferentes junções intercelulares entre as células endoteliais classificam os vasos formados em três diferentes tipos: contínuo, descontínuo e fenestrado. Por outro lado, as células endoteliais que constituem os diferentes tipos de vasos também diferem ao nível da morfologia, dos fatores que libertam e nos tipos de glicoproteínas que apresentam na sua superfície celular [48].

Os vasos contínuos apresentam uma baixa permeabilidade devido à existência de um grande número de “uniões íntimas” ao nível das membranas das células endoteliais. Constituem não apenas os grandes vasos mas também alguns tipos de tecidos, sendo responsáveis, por exemplo, pela baixa permeabilidade dos capilares que constituem a barreira hematoencefálica. São responsáveis apenas pela troca de iões e pequenos solutos com os tecidos circundantes [48].

Os vasos descontínuos apresentam uma elevada permeabilidade devido ao diâmetro dos poros membranares das células endoteliais que podem ter tamanhos entre 100-1000 nm. São responsáveis, por exemplo, pela troca de partículas com o fígado ou pela hematopoiese na medula óssea. Apesar da sua presença em certos tumores, a vetorização de fármacos para este tipo de vasos não é vantajosa pois devido ao elevado diâmetro dos poros membranares, é provável que esta estratégia terapêutica também afete este tipo de células endoteliais em tecidos saudáveis [48].

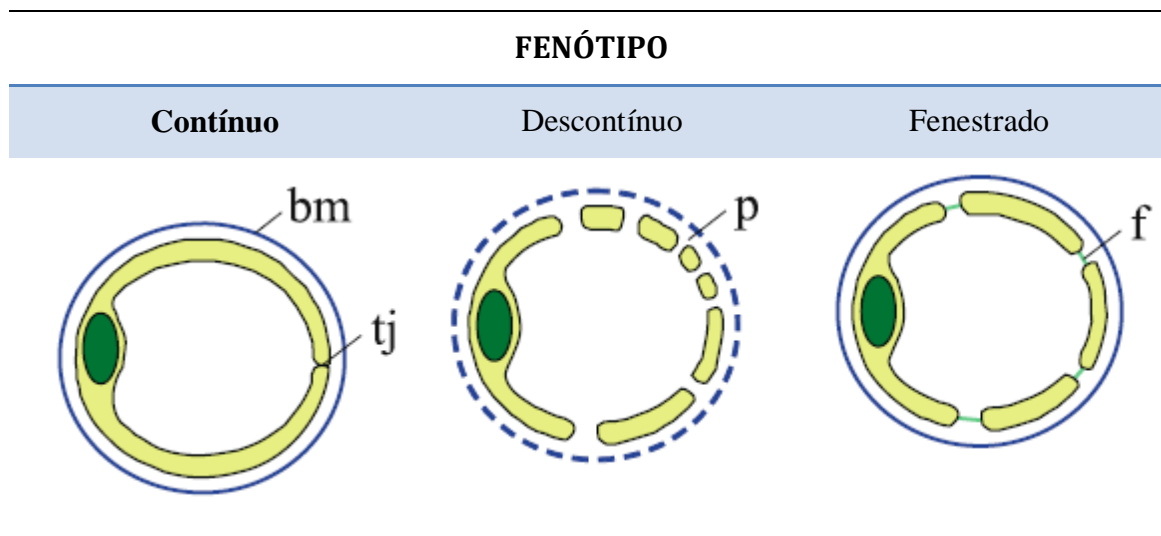


Figura 4.1- Classificação dos diferentes tipos de células endoteliais, de acordo com o seu fenótipo [48]. **Legenda:** bm-membrana basal; tj-“uniões íntimas”; f- fenestrações

A vasculatura fenestrada apresenta poros membranares com diâmetros de 50-60nm, sendo mais permeáveis para pequenas moléculas hidrofílicas e água. Estão presentes em tecidos caracterizados por uma elevada taxa de processos de secreção, absorção ou filtração [48,49].

Teoricamente, o tipo fenestrado é o predominante na neovasculatura tumoral formada através do processo de angiogénese. Num estudo publicado por Roberts e Palade em que se estudou a interação dos diferentes tipos de vasculatura com o VEGF (o principal fator de indução da angiogénese), verificou-se que este fator estimula a formação de uma vasculatura fenestrada [50].

Inibição da angiogénese em tumores sólidos: aplicação dos lipossomas catiónicos

Para além disso, a vasculatura fenestrada é a mais vantajosa para o crescimento do tumor, já que a elevada formação de ramificações por este tipo de vasos facilita o aporte de nutrientes e oxigénio a um maior número de células malignas [51] .

Muitos dos fatores indutores da angiogénese descritos neste capítulo estão sobreexpressos nas células endoteliais próximas do tumor e presentes em pouca quantidade nos tecidos normais. No entanto, num estudo publicado por Rettig foi identificado o composto endosialina, um fator ausente nos vasos normais e no vasos principais próximos do tumor mas presente nos pequenos capilares que derivam destes últimos. O desenvolvimento de sistemas que permitam reconhecer este fator poderá ser uma estratégia eficaz no aumento da seletividade da terapêutica anti-angiogénica [30,52].

Outra característica importante da vasculatura próxima do tumor é a exposição aumentada de compostos com carga negativa na superfície celular das células endoteliais como, por exemplo, diversos tipos de fosfolípidos ou proteoglicanos, favorecendo assim a interação com substâncias catiónicas. Uma das estratégias muito estudadas é a aplicação de lipossomas catiónicos na vetorização de fármacos ou de material genético para a vasculatura tumoral [53,54].

5. Lipossomas catiónicos

Os lipossomas podem ser definidos como compostos esféricos constituídos por uma bicamada fosfolipídica e um núcleo aquoso interior. São altamente biocompatíveis pois os seus constituintes básicos (por exemplo, fosfolípidos, triglicéridos e colesterol) são equivalentes aos presentes nas membranas biológicas. Formam-se espontaneamente quando ocorre a hidratação da mistura dos constituintes do lipossoma [55].

A sua classificação é feita com base em diversas características como o número de camadas, o diâmetro ou a carga iónica superficial. De acordo com o número de camadas e diâmetro, podem ser classificados em: vesículas multilamelares (MLVs), com diâmetro superior a 200 nm; vesículas unilamelares grandes, com diâmetros compreendidos entre 100-400 nm; ou vesículas unilamelares pequenas, com diâmetros inferiores a 100 nm. De acordo com a carga iónica superficial podem ser classificados em lipossomas catiónicos, neutros ou aniónicos [55].

Nos últimos anos, surgiu um grande interesse pela potencialidade dos lipossomas catiónicos em reconhecer seletivamente a vasculatura tumoral, surgindo daí a hipótese de vetorização de fármacos ou outros compostos com atividade anti-angiogénica para este tipo de vasos [56].

A aplicação mais estudada da utilização dos lipossomas catiónicos na inibição da angiogénese é a sua capacidade de transfeção de material genético nas células eucarióticas, de modo a inibir a expressão de certos genes regulatórios das vias de transdução de sinal envolvidas no processo angiogénico [55,57].

A capacidade de transfeção de material genético a partir de lipossomas foi pela primeira vez reportada por Felgner, em 1987. Antes disso, eram utilizados vetores virais que, apesar da maior eficácia na transfeção de genes, tinham problemas de segurança, imunogenicidade, um alto custo de produção e limitações ao nível do tamanho do material genético incorporado [58].

Através da seleção da composição lipídica e das proteínas presentes na superfície, os lipossomas formados podem possuir propriedades únicas como, por

exemplo, especificidade para um determinado tipo de células, alteração do tempo de circulação sistémica ou sensibilidade para diversos fatores como a temperatura ou o pH [55].

5.1-COMPOSIÇÃO DOS LIPOSSOMAS CATIÓNICOS

Existe uma enorme variedade de lípidos que podem ser utilizados na síntese de lipossomas catiónicos que reconhecem seletivamente a vasculatura tumoral. A composição lipídica é um dos fatores essenciais, bem como outros compostos de possível inserção na superfície do lipossoma com o objetivo de reconhecer as células-alvo ou garantir a estabilidade do complexo lipossoma/agente terapêutico [56].

Os lípidos catiónicos utilizados na formulação são divididos por três zonas: uma cauda hidrofóbica, um “linker” e uma cabeça hidrofílica [59].

Em relação à cauda hidrofóbica, a preferência recai para a utilização de uma dupla cadeia de hidrocarbonetos, já que os lipossomas compostos por cadeias lipídicas simples demonstraram problemas ao nível de toxicidade. Em relação ao tamanho das cadeias, os mais utilizados são o tetradecano (C14), o hexadecano (C16), o octadecano (C18) ou derivados destes, sendo que derivados do colesterol (Chol) também são muitas vezes incluídos na formulação [60].

O “linker” é definido como a porção que separa a cauda hidrofóbica da cabeça hidrofílica. A escolha do “linker” é importante para garantir uma boa interação entre a cabeça hidrofílica catiónica e as cargas aniónicas dos compostos a integrar [59,60].

De acordo com o número de cargas positivas presentes na porção da cabeça hidrofílica, podemos classificar os lípidos catiónicos de monovalentes ou multivalentes. A cabeça hidrofílica dos lípidos catiónicos monovalentes geralmente é composta por amins terciárias ou quaternárias. Os lípidos multivalentes são geralmente compostos por poliaminas e são mais eficientes na transfeção de material genético se as duas cadeias hidrocarbonadas que constituem a cauda hidrofóbica forem idênticas [60,61].

Existe uma grande diversidade de lípidos que podem constituir os lipossomas catiónicos. Os lípidos catiónicos mais utilizados são o 1,2-dioleoil-3-trimetilamónio-

Inibição da angiogênese em tumores sólidos: aplicação dos lipossomas catiónicos

propano (DOTAP) e o derivado do colesterol 3 β -(N-(N',N'-dimetilaminoetano)carbamoil)colesterol (DC-Chol). Também são geralmente utilizados lípidos neutros como o dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), que aumenta a eficácia de transfeção. Este aumento de eficácia é devido a uma transição da estrutura de interação com o material genético de lamelar para uma estrutura hexagonal invertida [62,63].

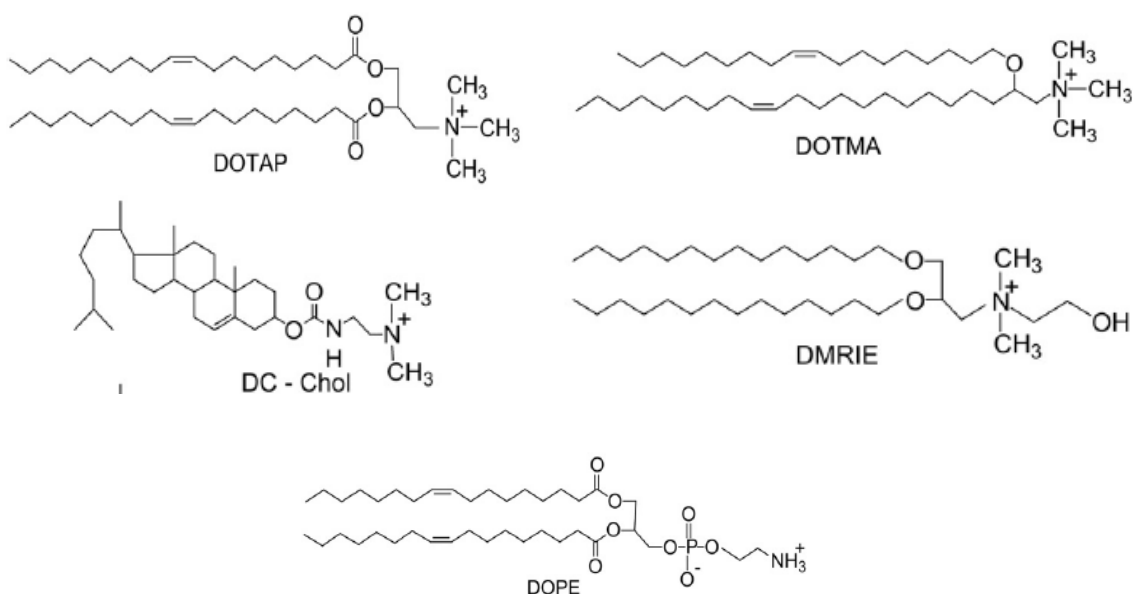


Figura 5.1- Exemplos de substâncias lipídicas utilizadas na formulação de lipossomas catiónicos. **Legenda:** DOTAP- 1,2-dioleil-3-trimetilamónio-propano; DOTMA- N-(2,3-dioleiloxipropil)-N,N,N-trimetilamónio; DC-Chol- 3 β -(N-(N',N'-dimetilaminoetano)carbamoil)colesterol; DMRIE- N-(2-hidroxi-etil)-N,N-dimetil-2,3-bis(tetradeciloxi-1-propano); DOPE- dioleoilfosfatidiletanolamina.

Existem muitos fatores que influenciam a eficácia de vetorização do agente terapêutico por parte dos lipossomas catiónicos, como o tamanho do lipossoma, a composição lipídica, a carga catiónica, a quantidade do lípido neutro utilizada ou o rácio lípidos/DNA. Assim, todos estes fatores devem ser ajustados para o tipo ou propriedades das células-alvo [64].

5.2- TOXICIDADE ASSOCIADA AOS LIPOSSOMAS CATIÓNICOS

Um problema associado à utilização *in vivo* de lipossomas catiónicos é a sua toxicidade, que depende primariamente da composição lipídica e dos outros fatores acima mencionados. Estudos revelam que os lipossomas catiónicos tendem a agregar-se

Inibição da angiogénese em tumores sólidos: aplicação dos lipossomas catiónicos

com células sanguíneas ou proteínas séricas, sendo que também podem estabelecer interações eletrostáticas com as células endoteliais da vasculatura normal. Ocorre assim o risco de diminuição de eficácia terapêutica devido à rápida eliminação do organismo ou a incidência de embolismos resultante da aderência entre eles e com os compostos presentes em circulação [56,65].

Num estudo publicado por Eichhorn et al. em ratinhos com melanoma amelanótico, verificou-se não só a melhoria do perfil farmacocinético mas também da seletividade para os vasos angiogénicos dos lipossomas catiónicos com uma pré-administração de protamina na corrente sanguínea. A protamina é uma proteína policatiónica que, ao ser administrada previamente aos lipossomas catiónicos, interage com as cargas negativas presentes nas células sanguíneas, proteínas séricas e células endoteliais dos tecidos normais, diminuindo a toxicidade associada aos lipossomas catiónicos e permitindo a sua acumulação na vasculatura tumoral [66].

Para além disto, também podem provocar respostas inflamatórias ou imunológicas devido à indução da produção de citocinas ou da ativação do sistema complemento [56].

5.3- A IMPORTÂNCIA DA UTILIZAÇÃO DO POLIETILENOGLICOL (PEG) NOS LIPOSSOMAS CATIÓNICOS

Os mecanismos de toxicidade acima referidos podem ser diminuídos através da inclusão de polietilenoglicol (PEG) nos lipossomas catiónicos [56].

O PEG é um polímero de peso molecular variável que pode ser incorporado na superfície dos lipossomas catiónicos. A incorporação deste polímero protege o lipossoma da interação com as células sanguíneas e proteínas séricas, através da formação de uma barreira física hidrofílica na superfície deste. Para além disso, protege o lipossoma catiónico do reconhecimento pelo sistema retículo-endotelial. Uma das grandes vantagens na inclusão do PEG é a possibilidade de formulação de lipossomas catiónicos com um elevado tempo de circulação sistémica, aumentando a capacidade de interação deste com as células-alvo [45].

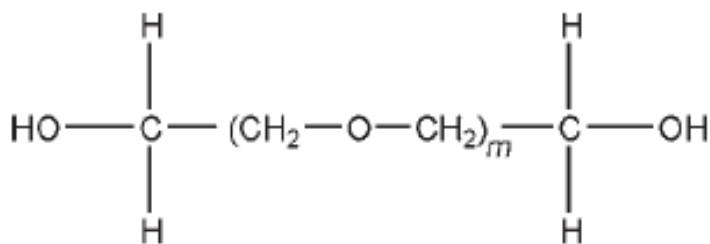


Figura 5.2- Estrutura química do polímero polietilenoglicol (PEG) [67].

Legenda: a letra *m* representa o número de moléculas de oxietileno.

A incorporação de PEG nos lipossomas catiónicos pode ser efetuada através da inclusão deste no fosfolípido 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), sendo adicionado na mistura lipossómica juntamente com os restantes constituintes. Este composto (DSPE-PEG) está comercialmente disponível [68,69].

Outro método, por exemplo, resulta na carboxilação do metiléter polietilenoglicol (mPEG), através de uma reação química com adição de acetona e reagente de Jones (CrO_3). Posteriormente, o PEG carboxilado é adicionado na mistura lipossómica, sendo conjugado com os diversos constituintes fosfolipídicos [70].

Num artigo publicado por Levchenko et al., estudou-se o efeito de diferentes quantidades de PEG nos lipossomas. Concluiu-se que quantidades iguais ou superiores a 6 mol% resultam na proteção dos lipossomas, mas que quantidades superiores a 15 mol% afetam a estrutura da bicamada lipídica lipossómica. Deste modo, a generalidade dos lipossomas catiónicos peguilados são formulados com quantidades de PEG entre 5 e 10 mol% [71].

A melhoria das propriedades farmacocinéticas induzidas pela incorporação de PEG na superfície dos lipossomas catiónicos aumenta a acumulação destes na neovasculatura dos tumores sólidos, principalmente devido ao aumento do tempo de circulação dos lipossomas. Em certos casos, a eficácia terapêutica com alguns citotóxicos, cuja atividade é específica para uma determinada etapa do ciclo celular, é aumentada com a utilização de lipossomas catiónicos peguilados que mantêm a dose mínima terapêutica em circulação durante muito mais tempo ao contrário das formulações sem a inclusão de PEG, que permitem uma elevada dose disponível logo

após a administração, mas que apresentam um período de semi-vida plasmática muito curta [13,71].

A peguilação permite a redução do tamanho dos lipossomas e a distribuição da carga positiva (proveniente da utilização dos lípidos catiónicos) por toda a superfície do lipossoma. No entanto, foi demonstrado que esta distribuição da carga positiva não afeta a interação dos lipossomas catiónicos com as cargas negativas na superfície das células-alvo [56].

A formulação de lipossomas catiónicos peguilados também permite uma maior retenção de fármacos a pH fisiológico, podendo também ser contruídos de forma a libertar o agente terapêutico apenas num microambiente de baixo pH, como é o caso das zonas hipóxicas dos tumores [45].

Num estudo publicado por Meyer et al., compararam-se os lipossomas catiónicos peguilados e sem PEG em termos de capacidade de incorporação de oligodeoxiribonucleótidos (ODN), de estabilidade dos complexos lipossoma/ODN e de especificidade para células de cancro mamário que sobreexpressam o fator HER2. Verificou-se que a capacidade de inclusão de ODN não se altera significativamente nos lipossomas peguilados, o que vem provar a teoria de que a inclusão de PEG nos lipossomas catiónicos não afeta a interação com superfícies ou compostos aniónicos. Por outro lado, com a utilização de PEG ocorre um aumento significativo da estabilidade dos complexos lipossoma/ODN e na capacidade de extravasamento dos vasos, devido não só à manutenção da estrutura e do tamanho reduzido dos lipossomas, mas também da inibição de processos de agregação e precipitação destes. Por último, a incorporação do fragmento F(ab') do anticorpo anti-HER2, na porção distal do PEG, aumentou significativamente a seletividade para as células de cancro mamário que sobreexpressam o fator HER2. A inclusão, nos lipossomas catiónicos peguilados, de compostos que permitam identificar fatores específicos presentes nas células-alvo pode então revelar-se uma enorme vantagem em termos de seletividade. [72]

5.4- A INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DOS LIPOSSOMAS NO TAMANHO, NA CARGA CATIÓNICA E NA INTERAÇÃO COM AS CÉLULAS-ALVO

A composição dos lipossomas é um fator essencial no desenvolvimento de sistemas de transporte de agentes terapêuticos na inibição da angiogénese. Existe um número muito elevado de formulações já testadas, que diferem nos lípidos ou outros compostos utilizados e também no rácio molar entre eles. A composição lipídica afeta parâmetros como, por exemplo, o tamanho e a carga iónica do lipossoma, o tempo de circulação sanguínea, a capacidade de incorporação do agente terapêutico, a seletividade para as células-alvo e a toxicidade. Assim sendo, a formulação de lipossomas deve ser cuidadosamente ajustada para a sua finalidade [45,56,63].

A primeira formulação de lipossomas catiónicos a ser utilizada foi a mistura DOTMA/DOPE (Lipofectin), que revolucionou o conceito de transfeção não-viral. Esta formulação é normalmente indicada quando se pretende transfectar células endoteliais, sendo particularmente útil na inibição da angiogénese [58].

Num estudo publicado por Dabbas et al. compararam-se as características físico-químicas e a capacidade de interação, com diversas linhas de células endoteliais primárias e transformadas, de diferentes formulações de lipossomas catiónicos peguilados diferindo apenas no tipo e quantidade de lípidos catiónicos utilizados. Os autores concluíram que não existe uma correlação entre a quantidade de lípido catiónico e o tamanho do lipossoma, ao contrário do efeito sobre o potencial zeta, onde se verificou um aumento com a maior quantidade de lípido catiónico utilizado. Verificou-se também que a interação com as linhas celulares utilizadas é tanto maior quanto maior for o potencial zeta do lipossoma, devido ao aumento das interações eletrostáticas com as cargas negativas presentes nas células-alvo. No mesmo estudo verificou-se a capacidade de incorporação dos fármacos citotóxicos etopósido e doxorubicina pelas diversas formulações estudadas. Nesta vertente, os autores concluíram que à medida que se aumenta a quantidade de lípidos catiónicos nas formulações, até um máximo de 50 mol%, verifica-se um aumento da capacidade de incorporação destes fármacos pelos lipossomas [73].

Vários estudos concluem que o DOTAP é, entre os lípidos catiónicos estudados, o que confere melhores resultados aos lipossomas formulados, ao nível das

características físico-químicas e da interação com células endoteliais da vasculatura tumoral [73-75].

Uma estratégia muito utilizada para melhorar a seletividade dos lipossomas catiónicos para os vasos tumorais é a inclusão de anticorpos ou moléculas que reconheçam determinados compostos sobreexpressos na superfície das células-alvo. Um composto muito utilizado nos lipossomas catiónicos é o tripéptido Arginina-Glicina-Aspartato (RGD), capaz de se ligar seletivamente a uma classe de integrinas sobreexpressas nas células endoteliais do tumor. Existem muitos outros compostos sobreexpressos neste tipo de células, sendo a generalidade deste conjunto fatores indutores do processo angiogénico referenciados anteriormente, como por exemplo o VEGF/VEGFR, as metaloproteinases, o bFGF, as endoglinas e a endosialina [76].

Devido à grande variedade de combinações lipídicas possíveis na formulação dos lipossomas, bem como a sua influência nas propriedades destes, é necessário que o desenvolvimento deste tipo de sistemas seja adequado para as características das células-alvo, de modo a obter-se os melhores resultados experimentais possíveis.

6. Interação dos lipossomas catiónicos com as células endoteliais

Como referido anteriormente, a acumulação dos lipossomas catiónicos na vasculatura tumoral deve-se principalmente à interação das cargas positivas presentes na superfície lipossomal com as cargas negativas da superfície exterior da membrana plasmática das células endoteliais dos vasos angiogénicos, derivado da presença de compostos aniónicos, como os proteoglicanos sulfatados [53,54].

Existem vários mecanismos que regulam a internalização dos lipossomas pelas células, sendo a fusão das membranas lipídicas do lipossoma e da membrana plasmática o mecanismo mais vantajoso. No entanto, no caso dos lipossomas catiónicos, a internalização é mediada por endocitose [77].

Entre os vários mecanismos de endocitose existentes, o predominante na internalização dos lipossomas catiónicos é a endocitose mediada pela clatrina por adsorção, devido à interação de cargas entre a superfície do lipossoma e os proteoglicanos na membrana plasmática. No entanto, caso o lipossoma possua na sua constituição compostos que visam aumentar a seletividade celular e que sejam reconhecidos por recetores presentes na membrana plasmática, o mecanismo de endocitose dependente da clatrina é mediado por recetores [61,77].

A clatrina é uma proteína fibrosa, que antes da internalização dos lipossomas, se concentra na zona interna da membrana plasmática, sendo responsável pela formação de uma depressão desta na zona onde a vesícula endossómica se irá formar. Esta proteína também confere a estabilidade do endossoma no interior da célula, pois permite manter a sua conformação [78].

Após a internalização, é necessário que o agente terapêutico seja libertado para o citoplasma o mais rapidamente possível, de modo a escapar à digestão pelos lisossomas, o que causaria a degradação do lipossoma e do agente terapêutico. O mecanismo de libertação do endossoma ainda não está completamente elucidado, mas existem diversas hipóteses [77].

Inibição da angiogénese em tumores sólidos: aplicação dos lipossomas catiónicos

A principal hipótese, no caso dos lipossomas catiónicos, envolve a destabilização da membrana endossômica através da interação entre as cargas positivas do lipossoma e as cargas negativas presentes na superfície externa do endossoma que, por um mecanismo de flip-flop, causa a rutura do endossoma e a consequente libertação do agente terapêutico no citoplasma [61].

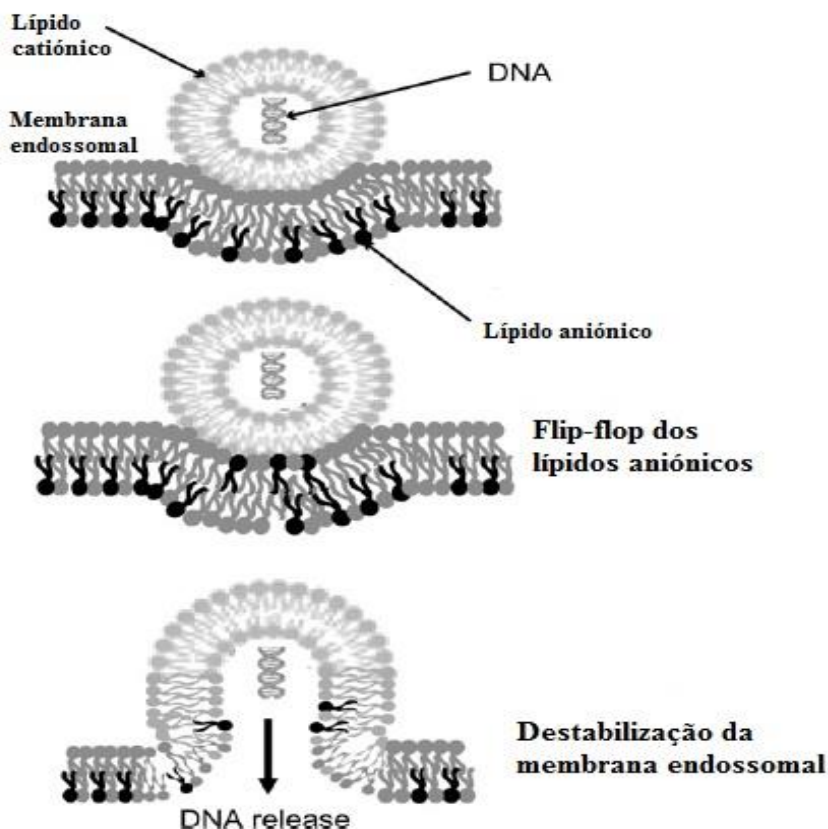


Figura 6.1- Mecanismo de libertação do complexo DNA/lipossoma, do interior da vesícula endossômica [61].

Após libertação do endossoma, algumas classes de agentes terapêuticos necessitam de chegar ao núcleo, onde são ativos. No caso, por exemplo, de terapia por RNA interferência (iRNA), este não necessita de entrar no núcleo celular, já que é no citoplasma que exerce o seu efeito [61].

O núcleo apresenta uma dupla membrana, também denominada por envelope nuclear, e o fluxo de substâncias é mediado por grandes proteínas transmembranares que constituem o complexo de poros nucleares. Este complexo apenas permite a troca

Inibição da angiogénese em tumores sólidos: aplicação dos lipossomas catiónicos

de partículas muito pequenas entre o citoplasma e o núcleo, como por exemplo cadeias de DNA ou RNA com um número reduzido de nucleótidos [78].

No entanto, observou-se que nas células em divisão ocorre a perda do envelope nuclear, aumentando a eficácia de transfeção de terapia genética ou de fármacos citotóxicos cujo mecanismo envolve a interação com o DNA, presente no núcleo celular. Este facto é útil porque, neste caso, pretende-se verificar o efeito de agentes terapêuticos com atividade anti-angiogénica nas células endoteliais da vasculatura tumoral, cuja proliferação está aumentada [61].

A interação dos lipossomas catiónicos com as células da vasculatura tumoral depende não só da composição lipídica e da presença de outros constituintes na formulação lipossómica, mas também das características da célula-alvo, que podem variar consoante o local do tumor e o tipo de vasos tumorais [61,77].

7. Aplicação dos lipossomas catiónicos na inibição da angiogénese

Nos últimos anos, muitos estudos têm sido publicados acerca da utilização dos lipossomas catiónicos como sistemas de transporte de agentes terapêuticos com atividade anti-angiogénica.

Como anteriormente referenciado, a terapia anti-angiogénica inclui várias classes de agentes terapêuticos, com diferentes abordagens. A grande parte dos estudos envolvendo formulações de lipossomas catiónicos é relativa à sua capacidade de incorporação e vetorização de material genético para as células endoteliais da neovasculatura tumoral. As formulações de lipossomas também permitem a incorporação de diversos fármacos citotóxicos como a oxaliplatina, a doxorubicina, o paclitaxel ou o etopósido [40,55,56].

A inclusão destes agentes terapêuticos em lipossomas catiónicos visa melhorar a eficácia e a segurança da terapêutica, através da diminuição da toxicidade, da diminuição de resistências adquiridas e no aumento da concentração do fármaco nas células-alvo, devido a interação aumentada dos lipossomas catiónicos com as cargas negativa expostas na superfície das células endoteliais dos vasos tumorais [55].

Ainda não existe nenhuma formulação de lipossomas catiónicos aprovada para uso em humanos, mas algumas já se encontram em ensaios clínicos. Deste modo, a grande parte dos estudos apresentados neste capítulo são estudos pré-clínicos.

A generalidade dos agentes terapêuticos inibe o processo angiogénico através do bloqueio de substâncias ativadoras e conseqüentemente das vias de transdução de sinal envolvidas na regulação da angiogénese. A destruição das células endoteliais que constituem os neovasos e a administração ou indução da expressão de moléculas endógenas, com conhecida atividade anti-angiogénica, são outras abordagens estudadas. O desenvolvimento de uma abordagem terapêutica única eficaz na inibição da angiogénese em vários tipos de tumores sólidos é, neste momento, uma tarefa quase impossível devido à variação das características dos vasos angiogénicos consoante o tipo de tumor associado. No entanto, a estratégia de inibir a formação da vasculatura

associada ao tumor pode futuramente revelar-se um grande passo na terapêutica contra o cancro, não apenas na inibição da progressão dos tumores mas também no aumento das taxas de cura [13,40].

7.1-TERAPIA GENÉTICA

A vetorização de terapia genética para os vasos angiogénicos, por parte de sistemas de lipossomas catiónicos, é uma área muito estudada na atualidade. As abordagens terapêuticas mais utilizadas nesta área são o uso de oligonucleótidos “*antisense*” (OAS), de pequenos fragmentos de RNA de interferência (siRNA) ou a transfeção de genes com atividade anti-angiogénica.

7.1.1- OLIGONUCLEÓTIDOS “ANTISENSE”

A terapia com oligonucleótidos “*antisense*” é uma área muito promissora, não só na terapia contra o cancro como também contra outras doenças. A utilização de OAS na inibição da angiogénese é devida à capacidade de inibição da tradução dos mRNA que codificam proteínas envolvidas na ativação da angiogénese [79].

Os OAS são formados por pequenas cadeias simples de DNA (ssDNA), com tamanho a rondar o 20 nucleótidos. A atividade dos OAS resulta da interação com um mRNA específico, por complementaridade de bases, formando uma dupla cadeia híbrida mRNA/DNA. Diversos mecanismos foram propostos para a inibição da tradução proteica pelos OAS. O mecanismo mais aceite pela comunidade científica envolve a degradação da cadeia de mRNA pela RNase-H, uma enzima endonuclease cuja atividade resulta na degradação das cadeias de RNA presente em duplas-cadeias híbridas RNA/DNA. Este tipo de mecanismo está ilustrado na figura 7.1 [80].



Figura 7.1- Mecanismo de clivagem da porção de mRNA complementar ao OAS [80].

Outro mecanismo proposto é a inibição do processo de *splicing* do mRNA, essencial para a produção da proteína correta. Neste mecanismo, a hibridização do OAS com o mRNA inibe a excisão dos intrões e, mesmo que a tradução continue, ocorre a produção de uma proteína anormal, teoricamente sem atividade [80].

A inibição da tradução também pode ser efetuada nas cadeias de mRNA que já estão ligadas aos ribossomas. Neste caso, a interação do OAS com a porção complementar do mRNA inibe estericamente as etapas de iniciação e de alongação da tradução, prevenindo a produção da proteína-alvo. Este mecanismo está ilustrado na figura 7.2 [79].



Figura 7.2- Mecanismo de bloqueio da tradução proteica pelos OAS. A produção da proteína-alvo pelos ribossomas é estericamente inibida pela interação específica do OAS com a cadeia

A generalidade dos estudos que envolvem esta estratégia são referentes à inibição do fator VEGF, o principal fator envolvido na indução do processo angiogénico. No entanto, ainda existem poucos estudos referentes à vetorização de OAS encapsulados em lipossomas catiónicos.

Num estudo publicado por Li et al., verificou-se o efeito anti-angiogénico, numa linha celular de cancro do pulmão, mediado pela utilização de OAS complementar ao mRNA do VEGF, encapsulado em lipossomas catiónicos. Os resultados comprovam uma diminuição significativa da expressão de VEGF com a utilização de OAS, comparado com o controlo. Esta diminuição da expressão de VEGF deve-se aos mecanismos de ação dos OAS explicados anteriormente. Consequentemente, verificou-se a diminuição do número de vasos próximos das células tumorais, bem como uma

diminuição da proliferação destas, derivado da diminuição dos níveis de VEGF, um fator com uma forte atividade pró-angiogénica [81].

Stuart et al. desenvolveram um lipossoma catiónico (DOTAP:Coolesterol:PEG-DSPE) de modo a vetorizar OAS complementares ao mRNA do gene da p-glicoproteína, uma proteína de efluxo conhecida por ser responsável pela maior parte das resistências ao tratamento com fármacos, numa linha celular de linfoma-B. Para obter uma maior seletividade para esta linha celular, os autores incorporaram um anticorpo monoclonal anti-CD19, pois sabe-se que o antígeno CD19 está sobreexpresso neste tipo de células. Para além de concluírem que a inclusão de PEG permite um maior tempo de circulação sistémica do lipossoma, pelos mecanismos referenciados anteriormente, verificou-se também uma diminuição significativa da atividade da p-glicoproteína. Esta diminuição da atividade deve-se ao mecanismo de ação dos OAS, que inibem a tradução do mRNA em proteína. Esta estratégia pode vir a ser útil em co-administração com fármacos citotóxicos, de modo a contornar as resistências à terapêutica e consequentemente melhorar a eficácia do tratamento [82].

7.1.2- siRNA

A RNA interferência é um processo endógeno de silenciamento genético pós-transcrição muito importante na resposta imunitária a vírus ou à presença de material genético exógeno. O seu efeito final é similar ao dos oligonucleótidos “*antisense*”, ou seja, ocorre a degradação do mRNA complementar, mas através de um mecanismo de ação diferente [83].

A nível endógeno, os siRNA são formados a partir de duplas cadeias de RNA processadas pela enzima nuclease Dicer, originando fragmentos de siRNA com tamanhos entre 21 e 23 nucleótidos. Na generalidade dos estudos, estes são quimicamente formulados para reconhecer a sequência do mRNA alvo. Quando presentes no citoplasma da célula, os siRNA são incorporados por um complexo proteico denominado RISC (do inglês, *RNA-induced silencing complex*), e nesse momento a cadeia modelo, que possui uma sequência similar ao do mRNA alvo, é degradada. Após hibridização com o mRNA complementar, a presença do complexo siRNA/RISC inibe estericamente a tradução proteica e, simultaneamente, degrada a

cauda poliadenilada da extremidade 3' do mRNA, induzindo a degradação deste por RNases. Este mecanismo está ilustrado na figura 7.3 [80,83].

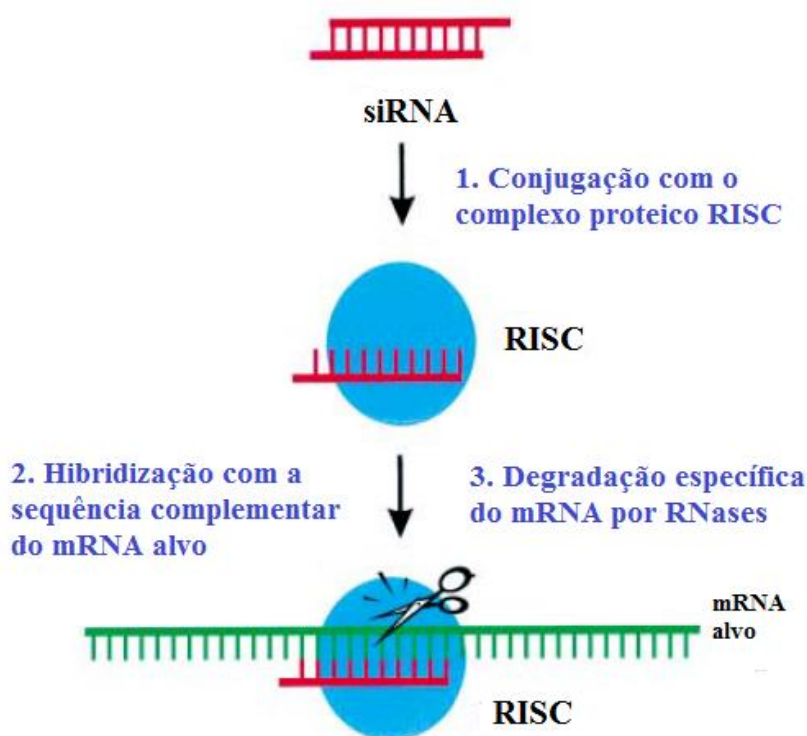


Figura 7.3- Mecanismo de ação do siRNA. Após conjugação com o complexo proteico RISC, a hibridização com a sequência complementar do mRNA alvo inibe a tradução pelos ribossomas e simultaneamente, induz a degradação do mRNA pelas RNases [80].

A vetorização de siRNA através de lipossomas catiónicos é, atualmente, uma das vertentes mais estudadas, com um enorme potencial ao nível do silenciamento de oncogenes na terapia contra o cancro. A conjugação dos siRNA nos lipossomas catiónicos é efetuada devido às interações eletrostáticas estabelecidas entre a carga aniónica dos grupos fosfatos dos nucleótidos que constituem o siRNA, e as cargas catiónicas presentes nas cabeças hidrofílicas dos lípidos catiónicos. As soluções de siRNA são adicionadas à solução lipossómica em quantidades que permitam um potencial zeta positivo do complexo siRNA/lipossoma, de modo a não afetar o mecanismo de interação dos lipossomas catiónicos com as células-alvo [84,85].

Inibição da angiogénese em tumores sólidos: aplicação dos lipossomas catiónicos

A peguilação dos complexos siRNA/lipossoma catiónico permite aumentar o tempo de circulação destes, embora possa causar a dissociação parcial do siRNA conjugado ao lipossoma. Num estudo publicado por Asai et al. comparou-se, através de métodos eletroforéticos, a presença de siRNA livre pré- e pós-peguilação de lipossomas catiónicos constituídos pelo lípido catiónico multivalente diacetilfosfato-tetraetilenopentamina (DCP-TEPA). Verificou-se que, após a inclusão de PEG, ocorreu uma dissociação parcial de siRNA presente nos lipossomas, talvez porque o PEG utilizado pelos autores possuía um elevado peso molecular, diminuindo significativamente o potencial zeta dos complexos siRNA/lipossoma, afetando as interações eletrostáticas entre o siRNA e a cabeça hidrofílica do lípido catiónico. Os autores conseguiram contornar esta adversidade através da modificação do siRNA, com a inclusão de uma molécula de colesterol na extremidade 3' da cadeia que é degradada após conjugação com o complexo RISC, não afetando a atividade do siRNA[86].

Esta abordagem pode revelar-se um grande avanço na terapia contra o cancro, sendo que já existem alguns estudos que demonstraram uma eficácia significativa ao nível da degradação do mRNA de certos genes envolvidos no processo angiogénico. No quadro 7.1 estão presentes alguns destes estudos que envolvem a vetorização de siRNA através de lipossomas catiónicos.

Quadro 7.1- Exemplos de estudos de aplicação dos lipossomas catiónicos na vetorização de siRNA com atividade anti-angiogénica.

mRNA-ALVO	COMPOSIÇÃO DO LIPOSSOMA	LINHA CELULAR	EFEITO
VEGF e outros oncogenes	DOTAP/Chol/DSPE-PEG ₂₀₀₀ /Protamina/siRNA	B16F10	Diminuição da progressão do tumor [87]
VEGF e outros oncogenes	DCP-TEPA/DOPE/DPPC/Chol/RGD-DSPE-PEG ₅₀₀₀ /siRNA-Chol	B16F10	Inibição do crescimento das metástases [88]
VEGFR-2	DOTAP/Chol/Protamina/RGD-DSPE-PEG	H5V	Redução do crescimento tumoral, por diminuição da atividade do VEGFR-2 [89]
Argonaute2 (indutor da apoptose)	DC-6-14/POPC/Chol/DOPE/DSPE-mPEG ₂₀₀₀	EOMA, B16BL6, LLC	Destruição dos vasos angiogénicos e redução do crescimento tumoral [85]

7.1.3- TRANSFEÇÃO DE GENES COM ATIVIDADE ANTI-ANGIOGÉNICA

Como anteriormente explicado, a transfeção de genes conjugados com lipossomas catiónicos apresenta muitas vantagens em relação aos vetores virais, como o custo económico, a toxicidade reduzida e uma maior seletividade para as células endoteliais que constituem os vasos angiogénicos [58].

A administração clínica de compostos endógenos com atividade anti-angiogénica, como a angiostatina e a endostatina, não é vantajosa devido à necessidade de doses muito elevadas e à dificuldade de produção destas. No entanto, a transfeção dos genes que codificam estes fatores pode ser uma estratégia eficaz na inibição do crescimento tumoral, devido ao aumento dos níveis destes compostos, subexpressos durante o processo angiogénico [90].

Num estudo *in vivo* (em ratos) publicado por Dutour et al., verificou-se a atividade anti-angiogénica e o seu efeito numa linha celular de osteosarcoma resultante da transfeção do gene da endostatina, incorporado em lipossomas catiónicos (DOTAP:Chol, 1:1). A formulação lipossómica permite uma maior acumulação do plasmídeo nas células endoteliais próximas do tumor, devido a interações eletrostáticas entre o lipossoma catiónico e as cargas negativas presentes em maior quantidade nos vasos angiogénicos. A administração desta formulação, comparado com o controlo, diminuiu o crescimento tumoral em cerca de 66% e o número de metástases pulmonares. Esta diminuição deve-se apenas ao seu efeito sobre as células endoteliais que constituem os vasos angiogénicos, pois *in vitro*, esta formulação não demonstrou qualquer atividade na proliferação das células tumorais [91].

Apesar das reconhecidas vantagens da utilização de lipossomas catiónicos na transfeção de genes, não existem muitos estudos relativamente a esta estratégia na inibição da angiogénese.

7.2-FÁRMACOS CITOTÓXICOS

A encapsulação de fármacos citotóxicos em lipossomas catiónicos, tem-se revelado uma grande inovação na terapia contra o cancro.

Este tipo de formulações permite uma maior acumulação do fármaco citotóxico na vasculatura próxima do tumor, devido às interações eletrostáticas explicadas anteriormente. Estima-se que a destruição de uma célula endotelial da vasculatura tumoral pode levar à eliminação de aproximadamente 100 células tumorais. Para além disso, as vantagens na vetorização de fármacos para as células endoteliais em comparação com as células tumorais, enumeradas no capítulo 4, faz com que este tipo de estratégia seja mais uma possibilidade na diminuição da progressão tumoral [56].

Em termos de segurança, a maior acumulação deste tipo de formulações nas células endoteliais que constituem os vasos tumorais, reduz a atividade dos fármacos citotóxicos nas células saudáveis. Este facto permite reduzir a incidência dos efeitos adversos, muitas das vezes graves, associados à quimioterapia [56].

Outra possibilidade neste tipo de formulações é a inclusão de PEG na superfície dos lipossomas. A inclusão deste polímero permite um maior tempo de circulação sistémica dos lipossomas catiónicos, devido à redução das interações eletrostáticas destes com outros constituintes em circulação, por exemplo, proteínas plasmáticas. Este facto permite que seja administrada uma menor dose em intervalos de tempo maiores, mais vantajoso que a administração de uma elevada dose do fármaco citotóxico em formulações cuja eliminação é mais rápida [92].

Existem, na atualidade, poucas formulações de lipossomas catiónicos em ensaios clínicos para a administração de fármacos citotóxicos. Recentemente, uma formulação de paclitaxel encapsulado em lipossomas catiónicos constituídos pelo lípido catiónico DOTAP e pelo lípido neutro 1,2-di-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina (DOPC), denominada EndoTAG®-1, passou num ensaio clínico de fase I/II, revelando um perfil de segurança melhorado e a diminuição da progressão tumoral em pacientes com cancro na cabeça e no pescoço [93].

Bode et al. publicaram um estudo em 2009, cujo objetivo era comparar o efeito do fármaco paclitaxel livre e encapsulado em lipossomas catiónicos (EndoTAG®-1) numa linha celular de adenocarcinoma prostático implantado em ratos. Concluiu-se que

Inibição da angiogénese em tumores sólidos: aplicação dos lipossomas catiónicos

o crescimento tumoral diminui significativamente com a utilização da formulação EndoTAG®-1, em comparação com o paclitaxel livre. O paclitaxel é um alcalóide estabilizador dos microtúbulos, que possui uma atividade reconhecida na inibição da proliferação das células tumorais. Neste estudo, verificou-se que este fármaco também exerce o seu efeito terapêutico nas células endoteliais próximas do tumor, cuja proliferação está aumentada, inibindo a progressão tumoral [94].

Num estudo publicado por Abu-Lila et al., verificou-se o efeito do fármaco citotóxico oxaliplatina encapsulado em lipossomas catiónicos numa linha de celular de carcinoma pulmonar de Lewis, em ratinhos. Os lipossomas catiónicos, neste estudo, são constituídos por fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPE), DSPE-mPEG, colesterol e 0,0-ditetradecanoil-N-(alfa-trimetilamóniaacetil) dietanolamina (DC-6-14). Verificou-se um aumento de mais de 150% no tempo de sobrevivência dos ratinhos e também a diminuição da progressão tumoral, em comparação com o grupo controlo. Os autores também concluíram que a formulação de oxaliplatina encapsulada em lipossomas catiónicos peguilados é mais vantajosa que a oxaliplatina livre e encapsulada em lipossomas neutros peguilados, tanto em termos de acumulação nas células-alvo, como em termos de eficácia terapêutica [95].

Outro fármaco que pode ser encapsulado em lipossomas catiónicos é a camptotecina, um inibidor da DNA topoisomerase I que inibe a replicação do DNA e assim, a divisão celular. Um estudo publicado por Eichhorn et al., utilizou uma formulação lipossômica constituída pelo lípido catiónico DOTAP, para encapsular a forma aniónica hidrofílica do fármaco camptotecina. Os autores verificaram que o fármaco se acumulava preferencialmente no tecido tumoral, devido à interação seletiva entre os lipossomas catiónicos e a vasculatura tumoral. Para além disso, verificaram uma diminuição da densidade dos microvasos tumorais, uma prova de que o fármaco possui também uma atividade inibitória na proliferação das células endoteliais dos vasos tumorais, e a diminuição significativa da progressão tumoral em comparação com o grupo controlo e a camptotecina livre [96].

Uma estratégia recentemente abordada é a vetorização combinada de siRNA e um fármaco citotóxico através de lipossomas catiónicos, de modo a obter-se uma supressão da progressão tumoral ainda mais eficaz.

Inibição da angiogénese em tumores sólidos: aplicação dos lipossomas catiónicos

Num estudo publicado por Chen et al., verificou-se o efeito de uma formulação de lipossomas catiónicos na vetorização de siRNA complementar ao mRNA do VEGF e doxorrubicina, em células de cancro do ovário resistentes à quimioterapia. Na constituição do lipossoma, estava presente o lípido catiónico N,N-diestearil-N-metil-N-2-(N'-arginil) aminoetilamina (DSAA). Neste estudo, verificou-se que o lípido DSAA inibe a atividade da p-glicoproteína, um transportador de efluxo responsável pelas resistências à terapêutica nas células cancerígenas. Esta inibição deve-se à presença do catião guanidínio na cabeça hidrofílica do DSAA, induzindo a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) que inibem a expressão de p-glicoproteína. A presença deste lípido na constituição lipossómica permitiu uma maior acumulação do siRNA e da doxorrubicina no interior das células-alvo, cuja atividade resultou numa maior inibição da progressão tumoral, em comparação com o grupo controlo e a formulação que apenas continha o siRNA [97].

8. Conclusão

Nesta monografia pretendeu-se demonstrar a aplicabilidade dos lipossomas catiónicos na inibição da angiogénese, um processo essencial para a progressão tumoral. A angiogénese é estritamente regulada por múltiplas vias de transdução de sinal, que envolvem muitos fatores endógenos, sendo o mais importante o VEGF.

Os lipossomas catiónicos permitem uma maior acumulação dos agentes terapêuticos na vasculatura tumoral, devido à interação eletrostática entre as cargas positivas do lipossoma e as cargas negativas sobreexpressas na superfície das células endoteliais dos vasos tumorais.

Não existe uma formulação lipossómica única capaz de vetorizar eficazmente todos os tipos de agentes terapêuticos, para todos os tipos de tumores sólidos. Logo, a constituição do lipossoma deverá ser ajustada de acordo com o tipo de agente terapêutico, com o tipo de célula-alvo e com as propriedades desejadas. Por exemplo, a alteração da composição lipídica tem influência no tamanho e no potencial zeta do lipossoma, enquanto a inclusão de PEG é importante para aumentar o tempo de circulação sistémica e diminuir a toxicidade associada a este tipo de formulações.

A formulação de lipossomas catiónicos para a vetorização de agentes terapêuticos com atividade anti-angiogénica pode, no futuro, ser uma estratégia muito importante no controlo da doença cancerígena. Os estudos pré-clínicos apresentados nesta monografia, em que se utilizaram diversas formulações de lipossomas catiónicos bem como diversos agentes terapêuticos, evidenciaram uma diminuição significativa na proliferação de diversas linhas celulares, tanto *in vitro* e *in vivo*. No entanto, são necessários estudos em humanos para comprovar a utilidade destas formulações.

É importante realçar que as formulações e estratégias apresentadas neste trabalho visam apenas diminuir a taxa de proliferação do tumor. A terapia com um fármaco anti-angiogénico encapsulado em lipossomas catiónicos, em combinação com radioterapia ou fármacos que atuem nas células tumorais, pode revelar-se uma estratégia inovadora no aumento da sobrevivência ou das taxas de cura dos doentes oncológicos.

9. Bibliografia

- [1] Mota Pinto, A. (2007). *Fisiopatologia: Fundamentos e Aplicações*. 1ª edição, LIDEL. Lisboa
- [2] OECD (2012), *Health at a Glance: Europe 2012*, OECD Publishing.
- [3] Zdanowicz, M. (2002). *Essentials of pathophysiology for pharmacy*. 1ª edição, CRC Press
- [4] De Gruijl, F. R. (1999). Skin cancer and solar UV radiation. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 35(14), 2003–9.
- [5] De Martel, C., & Franceschi, S. (2009). Infections and cancer: established associations and new hypotheses. *Critical reviews in oncology/hematology*, 70(3), 183–94.
- [6] Tomatis, L. (2006). Identification of carcinogenic agents and primary prevention of cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1076, 1–14.
- [7] Leonard, G., Fojo, T., & Bates, S. (2003). The role of ABC transporters in clinical practice. *The oncologist*, 411–424.
- [8] Liu, Z.-L., Onda, K., Tanaka, S., Toma, T., Hirano, T., & Oka, K. (2002). Induction of multidrug resistance in MOLT-4 cells by anticancer agents is closely related to increased expression of functional P-glycoprotein and MDR1 mRNA. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 49(5), 391–7.
- [9] Nagy, J. a, Benjamin, L., Zeng, H., Dvorak, A. M., & Dvorak, H. F. (2008). Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis*, 11(2), 109–19.
- [10] Dvorak, H. F. (2005). Angiogenesis: update 2005. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 3(8), 1835–42.
- [11] Bremnes, R. M., Camps, C., & Sirera, R. (2006). Angiogenesis in non-small cell lung cancer: the prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 51(2), 143–58.
- [12] Folkman, J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Seminars in oncology*, 29(6 Suppl 16), 15–8.

- [13] Campbell, R., & Ying, B. (2009). Fighting cancer: from the bench to bedside using second generation cationic liposomal therapeutics. *Journal of ...*, 98(2).
- [14] Ribatti, D., Nico, B., Crivellato, E., Roccaro, a M., & Vacca, a. (2007). The history of the angiogenic switch concept. *Leukemia*, 21(1), 44–52.
- [15] Baeriswyl, V., & Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in cancer biology*, 19(5), 329–37.
- [16] Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. (1995). Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature Medicine*, 1(2), 149-53.
- [17] Aguirre-Ghiso, J. (2006). The problem of cancer dormancy: understanding the basic mechanisms and identifying therapeutic opportunities. *Cell Cycle*, 5(16), 1740–1743.
- [18] Aguirre-ghiso, J. A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer*, 7(11): 834–846.
- [19] Udagawa, T., Fernandez, A., Achilles, E.-G., Folkman, J., & D'Amato, R. J. (2002). Persistence of microscopic human cancers in mice: alterations in the angiogenic balance accompanies loss of tumor dormancy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(11), 1361–70.
- [20] Conway, E. M., Collen, D., & Carmeliet, P. (2001). Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovascular research*, 49(3), 507–21.
- [21] Shibuya, M. (2001). Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell structure and function*, 26(1), 25–35.
- [22] Yamakawa, M., Liu, L. X., Date, T., Belanger, A. J., Vincent, K. a, Akita, G. Y., Kuriyama, T., et al. (2003). Hypoxia-inducible factor-1 mediates activation of cultured vascular endothelial cells by inducing multiple angiogenic factors. *Circulation research*, 93(7), 664–73.
- [23] Lee, J. E., Didier, D. N., Lockett, M. R., Scalf, M., Greene, A. S., Olivier, M., & Smith, L. M. (2007). Characterization of vascular endothelial growth factor receptors on the endothelial cell surface during hypoxia using whole cell binding arrays. *Analytical biochemistry*, 369(2), 241–7.

- [24] Ho, V. C., Duan, L.-J., Cronin, C., Liang, B. T., & Fong, G.-H. (2012). Elevated vascular endothelial growth factor receptor-2 abundance contributes to increased angiogenesis in vascular endothelial growth factor receptor-1-deficient mice. *Circulation*, *126*(6), 741–52.
- [25] Herzog, B., Pellet-Many, C., Britton, G., Hartzoulakis, B., & Zachary, I. C. (2011). VEGF binding to NRP1 is essential for VEGF stimulation of endothelial cell migration, complex formation between NRP1 and VEGFR2, and signaling via FAK Tyr407 phosphorylation. *Molecular biology of the cell*, *22*(15), 2766–76.
- [26] Shibuya, M. (2010). Tyrosine Kinase Receptor Flt/VEGFR Family: Its Characterization Related to Angiogenesis and Cancer. *Genes & cancer*, *1*(11), 1119–23.
- [27] Huang, Y.-J., Qi, W.-X., He, A.-N., Sun, Y.-J., Shen, Z., & Yao, Y. (2013). Prognostic Value of Tissue Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Bladder Cancer: a Meta-analysis. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, *14*(2), 645–9.
- [28] Peng, L., Zhan, P., Zhou, Y., Fang, W., Zhao, P., Zheng, Y., & Xu, N. (2012). Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in gastric cancer: a meta-analysis. *Molecular biology reports*, *39*(10), 9473–84.
- [29] Zhan, P., Wang, J., Lv, X., & Wang, Q. (2009). Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in patients with lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Journal of Thoracic Oncology*, *4*(9), 1094–1103.
- [30] Distler, J., & Hirth, A. (2003). Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *The quarterly journal of nuclear medicine*, *47*(3), 149–161.
- [31] Presta, M., Dell’Era, P., Mitola, S., Moroni, E., Ronca, R., & Rusnati, M. (2005). Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine & growth factor reviews*, *16*(2), 159–78.
- [32] Gualandris, A., Rusnati, M., & Belleri, M. (1996). Basic fibroblast growth factor overexpression in endothelial cells: an autocrine mechanism for angiogenesis and angioproliferative diseases. *Cell growth & Differentiation*, *7*, 147–160.
- [33] Fleitas, T., Martínez-Sales, V., Vila, V., Reganon, E., Mesado, D., Martín, M., Gómez-Codina, J., et al. (2013). VEGF and TSP1 levels correlate with prognosis in advanced non-small cell lung cancer. *Clinical & translational oncology: official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*.

- [34] Folkman, J. (2003). Angiogenesis inhibitors: a new class of drugs. *Cancer biology & therapy*, (August), 127–133
- [35] Folkman, J. (1971). Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *New England Journal of Medicine*, 285(21), 1182–1186
- [36] Ingber, D., Fujita, T., Kishimoto, S., & Sudo, K. (1990). Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature*, 348(6301), 555–7
- [37] Willett, C., Boucher, Y., & Tomaso, E. di. (2004). Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nature medicine*, 10(2), 145–147
- [38] Rosen, L. (2000). Antiangiogenic strategies and agents in clinical trials. *The Oncologist*, 20–27.
- [39] Hurwitz, H., & Fehrenbacher, L. (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 2335–2342.
- [40] Griffioen, A., & Molema, G. (2000). Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacological reviews*, 52(2), 237–68.
- [41] Verheul, H. M. W., Hammers, H., Van Erp, K., Wei, Y., Sanni, T., Salumbides, B., Qian, D. Z., et al. (2007). Vascular endothelial growth factor trap blocks tumor growth, metastasis formation, and vascular leakage in an orthotopic murine renal cell cancer model. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(14), 4201–8.
- [42] Haspel, H. C., Scicli, G. M., McMahon, G., & Scicli, a G. (2002). Inhibition of vascular endothelial growth factor-associated tyrosine kinase activity with SU5416 blocks sprouting in the microvascular endothelial cell spheroid model of angiogenesis. *Microvascular research*, 63(3), 304–15.
- [43] Dhanabal, M., Jeffers, M., & Larochele, W. J. (2005). Anti-angiogenic therapy as a cancer treatment paradigm. *Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents*, 5(2), 115–30.
- [44] Chauhan, V. P., Stylianopoulos, T., Boucher, Y., & Jain, R. K. (2011). Delivery of molecular and nanoscale medicine to tumors: transport barriers and strategies. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 2, 281–98.

- [45] Campbell, R. (2007). Positively-charged liposomes for targeting tumor vasculature. Em: Amiji, M., *Nanotechnology for cancer therapy*, CRC Press, Boca Raton.
- [46] Feron, O. (2004). Targeting the tumor vascular compartment to improve conventional cancer therapy. *Trends in pharmacological sciences*, 25(10), 536–42.
- [47] van der Schaft, D., Ramakrishnan, S., Molema, G. e Griffioen, A. (2001). Tumour vasculature targeting. Em: Molema, G. e Meijer, D. *Drug targeting Organ-specific strategies*, Wiley-VCH, Weinheim
- [48] Pries, A. R., & Kuebler, W. M. (2006). Normal endothelium. *Handbook of experimental pharmacology*, (176 Pt 1), 1–40.
- [49] Roberts, W. G., & Palade, G. E. (1995). Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *Journal of cell science*, 108 (Pt 6), 2369–79.
- [50] Roberts, W., & Palade, G. (1997). Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. *Cancer research*, 57(4), 765–772.
- [51] Tatematsu, M., Lurie, A., Rippey, R., & Conran, P. (1984). Possible mechanistic roles of anatomical and functional vascular changes in rat urinary bladder carcinogenesis induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *Cancer research*, 44, 278–284.
- [52] Rettig, W. J., Garin-Chesa, P., Healey, J. H., Su, S. L., Jaffe, E. a, & Old, L. J. (1992). Identification of endosialin, a cell surface glycoprotein of vascular endothelial cells in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(22), 10832–6.
- [53] Pieper, J. S., Hafmans, T., Van Wachem, P. B., Van Luyn, M. J. a, Brouwer, L. a, Veerkamp, J. H., & Van Kuppevelt, T. H. (2002). Loading of collagen-heparan sulfate matrices with bFGF promotes angiogenesis and tissue generation in rats. *Journal of biomedical materials research*, 62(2), 185–94.
- [54] Ran, S., He, J., Huang, X., & Soares, M. (2005). Antitumor effects of a monoclonal antibody that binds anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels in mice. *Clinical cancer research*, 11, 1551–1562.
- [55] Lipid-Based Nanoparticulate Drug Delivery Systems. (2007). *Nanoparticulate Drug Delivery Systems*. Informa Healthcare.

- [56] Abu Lila, A. S., Ishida, T., & Kiwada, H. (2010). Targeting anticancer drugs to tumor vasculature using cationic liposomes. *Pharmaceutical research*, 27(7), 1171–83.
- [57] Samadikhah, H. R., Majidi, A., Nikkhah, M., & Hosseinkhani, S. (2011). Preparation, characterization, and efficient transfection of cationic liposomes and nanomagnetic cationic liposomes. *International journal of nanomedicine*, 6, 2275–83.
- [58] Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., et al. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(21), 7413–7.
- [59] Dass, C. R. (2002). Biochemical and biophysical characteristics of lipoplexes pertinent to solid tumour gene therapy. *International journal of pharmaceutics*, 241(1), 1–25.
- [60] Chesnoy, S., & Huang, L. (2000). Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 29, 27–47.
- [61] Morille, M., Passirani, C., Vonarbourg, A., Clavreul, A., & Benoit, J.-P. (2008). Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials*, 29(24-25), 3477–96. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.036
- [62] Caracciolo, G., & Amenitsch, H. (2012). Cationic liposome/DNA complexes: from structure to interactions with cellular membranes. *European biophysics journal: EBJ*, 41(10), 815–29.
- [63] Ramezani, M., Khoshhamdam, M., Dehshahri, A., & Malaekheh-Nikouei, B. (2009). The influence of size, lipid composition and bilayer fluidity of cationic liposomes on the transfection efficiency of nanolipoplexes. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 72(1), 1–5.
- [64] Ewert, K., Slack, N. L., Ahmad, A., Evans, H. M., Lin, A. J., Samuel, C. E., & Safinya, C. R. (2004). Cationic lipid-DNA complexes for gene therapy: understanding the relationship between complex structure and gene delivery pathways at the molecular level. *Current medicinal chemistry*, 11(2), 133–49.
- [65] Zelphati, O., Uyechi, L. S., Barron, L. G., & Szoka, F. C. (1998). Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1390(2), 119–33.

- [66] Eichhorn, M., Strieth, S., Krasnici, S., & Sauer, B. (2004). Protamine enhances uptake of cationic liposomes in angiogenic microvessels of solid tumours. *Angiogenesis*, 133–141.
- [67] Rowe, R., Sheskey, P., & Owen, S. (2006). *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (pp. 517–521). Pharmaceutical Press.
- [68] Dos Santos, N., Allen, C., Doppen, A.-M., Anantha, M., Cox, K. a K., Gallagher, R. C., Karlsson, G., et al. (2007). Influence of poly(ethylene glycol) grafting density and polymer length on liposomes: relating plasma circulation lifetimes to protein binding. *Biochimica et biophysica acta*, 1768(6), 1367–77.
- [69] Ho, E., Ramsay, E., & Ginja, M. (2010). Characterization of cationic liposome formulations designed to exhibit extended plasma residence times and tumor vasculature targeting properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(6), 2839–2853.
- [70] Hyun, S., Hwa, S., Seong, H., Hang, S., Jeong, K., & Cheol, B. (2009). Polyethylene glycol-complexed cationic liposome for enhanced cellular uptake and anticancer activity. *International journal of pharmaceutics*, 382, 254–261.
- [71] Levchenko, T. S., Rammohan, R., Lukyanov, A. N., Whiteman, K. R., & Torchilin, V. P. (2002). Liposome clearance in mice: the effect of a separate and combined presence of surface charge and polymer coating. *International journal of pharmaceutics*, 240(1-2), 95–102.
- [72] Meyer, O. (1998). Cationic Liposomes Coated with Polyethylene Glycol As Carriers for Oligonucleotides. *Journal of Biological Chemistry*, 273(25), 15621–15627.
- [73] Dabbas, S., Kaushik, R. R., Dandamudi, S., Kuesters, G. M., & Campbell, R. B. (2008). Importance of the liposomal cationic lipid content and type in tumor vascular targeting: physicochemical characterization and in vitro studies using human primary and transformed endothelial cells. *Endothelium: journal of endothelial cell research*, 15(4), 189–201.
- [74] Campbell, R. B., Balasubramanian, S. V, & Straubinger, R. M. (2001). Phospholipid-cationic lipid interactions: influences on membrane and vesicle properties. *Biochimica et biophysica acta*, 1512(1), 27–39.
- [75] Campbell, R. B., Fukumura, D., Brown, E. B., Mazzola, L. M., Izumi, Y., Jain, R. K., Torchilin, V. P., et al. (2002). Cationic Charge Determines the Distribution of Liposomes between the Vascular and Extravascular Compartments of Tumors Advances in Brief Cationic Charge Determines the Distribution of Liposomes between the Vascular and Extravascular Compartments of Tumors. *Cancer research*, 62, 6831–6836.

- [76] Dubey, P. Mahor, S. e Vyas, S. (2007). RGD-modified liposomes for tumor targeting. Em: Amiji, M., *Nanotechnology for cancer therapy*, CRC Press, Boca Raton.
- [77] Düzgünes, N., & Nir, S. (1999). Mechanisms and kinetics of liposome-cell interactions. *Advanced drug delivery reviews*, 40(1-2), 3–18.
- [78] Junqueira, L. C. U., & Carneiro, J. (2000). *Biologia celular e molecular*. Guanabara-Koogan.
- [79] Pan, W.-H., & Clawson, G. a. (2006). Antisense applications for biological control. *Journal of cellular biochemistry*, 98(1), 14–35.
- [80] Kurreck, J. (2003). Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *European Journal of Biochemistry*, 270(8), 1628–1644.
- [81] Li, C., Cheng, X., Jiang, H., & Sun, X. (2006). Antiangiogenesis and damaging blood flow by antisense vascular endothelial growth factor oligodeoxynucleotides to suppress lung cancers. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 27(3), 158–65.
- [82] Stuart, D. D., Kao, G. Y., & Allen, T. M. (2000). A novel, long-circulating, and functional liposomal formulation of antisense oligodeoxynucleotides targeted against MDR1. *Cancer gene therapy*, 7(3), 466–75.
- [83] Zamore, P. D. (2001). RNA interference: listening to the sound of silence. *Nature structural biology*, 8(9), 746–50.
- [84] Aigner, A. (2007). Applications of RNA interference: current state and prospects for siRNA-based strategies in vivo. *Applied microbiology and biotechnology*, 76(1), 9–21.
- [85] Tagami, T., Suzuki, T., Matsunaga, M., Nakamura, K., Moriyoshi, N., Ishida, T., & Kiwada, H. (2012). Anti-angiogenic therapy via cationic liposome-mediated systemic siRNA delivery. *International journal of pharmaceutics*, 422(1-2), 280–9.
- [86] Asai, T., Matsushita, S., Kenjo, E., Tsuzuku, T., Yonenaga, N., Koide, H., Hatanaka, K., et al. (2011). Dicetyl phosphate-tetraethylenepentamine-based liposomes for systemic siRNA delivery. *Bioconjugate chemistry*, 22(3), 429–35.
- [87] Li, S., Chono, S., & Huang, L. (2008). Efficient oncogene silencing and metastasis inhibition via systemic delivery of siRNA. *Molecular Therapy*, 16(5), 942–946.

- [88] Kenjo, E., Asai, T., Yonenaga, N., Ando, H., Ishii, T., Hatanaka, K., Shimizu, K., et al. (2013). Systemic delivery of small interfering RNA by use of targeted polycation liposomes for cancer therapy. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 36(2), 287–91.
- [89] Vader, P., Crielaard, B. J., Van Dommelen, S. M., Van der Meel, R., Storm, G., & Schiffelers, R. M. (2012). Targeted delivery of small interfering RNA to angiogenic endothelial cells with liposome-polycation-DNA particles. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 160(2), 211–6.
- [90] Kim, K. S., Kim, H. S., Park, J. S., Kwon, Y. G., & Park, Y. S. (2004). Inhibition of B16BL6 tumor progression by coadministration of recombinant angiostatin K1-3 and endostatin genes with cationic liposomes. *Cancer gene therapy*, 11(6), 441–9.
- [91] Dutour, A., Monteil, J., Paraf, F., Charissoux, J. L., Kaletta, C., Sauer, B., Naujoks, K., et al. (2005). Endostatin cDNA/cationic liposome complexes as a promising therapy to prevent lung metastases in osteosarcoma: study in a human-like rat orthotopic tumor. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 11(2), 311–9.
- [92] Abu-Lila, A., Suzuki, T., Doi, Y., Ishida, T., & Kiwada, H. (2009). Oxaliplatin targeting to angiogenic vessels by PEGylated cationic liposomes suppresses the angiogenesis in a dorsal air sac mouse model. *Journal of controlled release*, 134(1), 18–25.
- [93] Strieth, S., Dunau, C., Michaelis, U., Jäger, L., Gellrich, D., Wollenberg, B., & Dellian, M. (2013). Phase I/II clinical study on safety and antivascular effects of paclitaxel encapsulated in cationic liposomes for targeted therapy in advanced head and neck cancer. *Head & neck*, 1–35.
- [94] Bode, C., Trojan, L., & Weiss, C. (2009). Paclitaxel encapsulated in cationic liposomes: a new option for neovascular targeting for the treatment of prostate cancer. *Oncology Reports*, 22, 321–326.
- [95] Abu Lila, A. S., Kizuki, S., Doi, Y., Suzuki, T., Ishida, T., & Kiwada, H. (2009). Oxaliplatin encapsulated in PEG-coated cationic liposomes induces significant tumor growth suppression via a dual-targeting approach in a murine solid tumor model. *Journal of controlled release*, 137(1), 8–14.
- [96] Eichhorn, M., & Luedemann, S. (2007). Cationic lipid complexed camptothecin (EndoTAG®-2) improves antitumoral efficacy by tumor vascular targeting. *Cancer biology & therapy*, 6(June), 920–929.
- [97] Chen, Y., Bathula, S. R., Li, J., & Huang, L. (2010). Multifunctional nanoparticles delivering small interfering RNA and doxorubicin overcome drug resistance in cancer. *The Journal of biological chemistry*, 285(29), 22639–50.