



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Novas formulações lipossomais vectorizadas para
aplicação em terapia fotodinâmica

Maria Inês Santos

2012



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Novas formulações lipossomais vectorizadas para aplicação em terapia fotodinâmica

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Sérgio Simões (Universidade Coimbra)

Maria Inês Santos

2012

Índice

Agradecimentos	v
Resumo da tese	vii
<i>Thesis Abstract</i>	ix
Abreviaturas	xi
Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xvi
Capítulo 1 - Introdução	1
1.1) Terapia Fotodinâmica.....	3
1.1.1) Vantagens e limitações da terapia fotodinâmica	4
1.1.2) Mecanismos de acção da terapia fotodinâmica <i>in vivo</i>	5
1.1.3) Reacção fotodinâmica em terapia fotodinâmica	8
1.1.4) Fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica	9
1.1.4.1) Características de um fotossensibilizador ideal	10
1.1.4.2) Classes de fotossensibilizadores	10
1.2) Sistema de entrega de fármacos	16
1.2.1) Nanotransportadores como sistema de entrega de fármacos	17
1.2.2) Lipossomas	18
1.2.2.1) Formulações lipossomais de fármacos aprovadas para aplicação clínica	20
1.2.2.2) Comportamento <i>in vivo</i> : lipossomas convencionais vs lipossomas estabilizados estereamente	21
1.2.2.3) Direcção de lipossomas	22
1.2.2.3.1) Direcção de lipossomas mediado por transferrina	25
1.2.2.4) Métodos de preparação de formulações lipossomais	28
1.2.2.5) Encapsulação de fármacos em formulações lipossomais	30
1.3) Objectivos	31

Capítulo 2 - Materiais e métodos	33
2.1) Materiais	35
2.2) Métodos	36
2.2.1) Desenvolvimento de formulações lipossomais encapsulando a bacterioclorina	36
2.2.1.1) Preparação dos lipossomas unilamelares	36
2.2.1.2) Tiolação do ligando transferrina e condições de acoplamento	37
2.2.2) Caracterização das formulações lipossomais encapsulando a bacterioclorina	39
2.2.2.1) Determinação do diâmetro médio e do índice de polidispersão	39
2.2.2.2.1) Ensaio de quantificação de fosfato inorgânico	40
2.2.2.2.2) Ensaio de quantificação do fármaco	40
2.2.2.2) Determinação do rácio final fármaco/lípido	41
2.2.2.3) Determinação da eficácia de encapsulação (E.E)	41
2.2.2.4) Determinação da eficácia de acoplamento (E.A) da transferrina	41
2.2.2.4.1) Ensaio de quantificação de transferrina acoplada aos lipossomas	41
2.2.3) Cultura da linha celular de cancro de pulmão (A549)	42
2.2.4) Identificação de receptores de transferrina (TrfR) na linha celular A549 por citometria de fluxo	43
2.2.5) Estudos de associação celular	44
2.2.6) Desenvolvimento e caracterização de formulações lipossomais encapsulando p-THPP	45
 Capítulo 3 - Resultados e discussão	 48
3.1) Desenvolvimento e caracterização de formulações lipossomais encapsulando a bacterioclorina.....	50
3.1.2) Desenvolvimento e caracterização de formulações lipossomais encapsulando a bacterioclorina e vectorizadas com transferrina	53
3.2) Identificação de receptores de transferrina (TrfR) na linha celular A549 por citometria de fluxo	57
3.3) Estudos de associação celular de formulações lipossomais encapsulando a bacterioclorina	58

3.4) Desenvolvimento e caracterização de formulações lipossomais encapsulando a p-THPP	60
3.5) Estudos de associação celular de formulações lipossomais encapsulando a p-THPP	62
Capítulo 4 - Conclusões e perspectivas futuras	65
Capítulo 5 - Bibliografia	69
Anexos	77

Agradecimentos

Este espaço é dedicado àqueles que de alguma forma contribuíram para que a realização desta dissertação fosse possível. A todos, o meu sincero agradecimento.

Em primeiro lugar, agradeço ao Professor Doutor Sérgio Simões, meu orientador, pela reconhecida orientação científica.

Em segundo lugar, agradeço profundamente à Doutora Ana Catarina Pinto, minha orientadora laboratorial, por toda a aprendizagem imprescindível para a concretização deste projecto, bem como a revisão crítica da dissertação. Um agradecimento, muito especial, por todas as palavras de incentivo e pela amizade sempre manifestada.

À Bluepharma, Indústria Farmacêutica, SA, o meu agradecimento pela possibilidade concedida para a concretização do meu projecto de Mestrado.

A todos os colegas da Bluepharma, especialmente ao Luís Rocha e ao Laboratório de Investigação e Desenvolvimento, agradeço o espírito de companheirismo e todo o apoio prestado.

À Doutora Isabel Nunes, do Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC) da Universidade de Coimbra, agradeço o auxílio prestado na realização da técnica de citometria de fluxo.

À minha família, um enorme agradecimento.

Resumo da tese

O cancro caracteriza-se como uma doença com elevada incidência e o seu índice de mortalidade continua a ser avassalador devido ao facto de, nalgumas neoplasias, não existir um tratamento eficaz. As modalidades terapêuticas convencionais como a cirurgia, quimioterapia e radioterapia têm em comum a falta de selectividade e o surgimento de efeitos secundários devido à elevada toxicidade para as células saudáveis.

Quando comparada com os métodos terapêuticos convencionais, a terapia fotodinâmica destaca-se pela elevada selectividade (acumulação e retenção) do fotossensibilizador para as células tumorais que permite minimizar os danos nos tecidos saudáveis. A PDT é uma modalidade terapêutica que se baseia na combinação de três factores: uma molécula fotossensibilizadora (PS), um feixe de luz de comprimento de onda específico e a presença de oxigénio molecular.

A encapsulação destes fotossensibilizadores em lipossomas “peguilados” e conjugados com ligandos de receptores sobreexpressos nas células tumorais permitem aumentar o índice terapêutico. Com este projecto, pretende-se desenvolver uma formulação lipossomal, encapsulando uma molécula fotossensibilizadora (bacterioclorina), com características físico-químicas adequadas a uma potencial administração intravenosa e vectorizada com transferrina, enquanto nova abordagem terapêutica para o cancro.

Diferentes formulações lipossomais (compreendendo diversas composições lipídicas e rácios fármaco/lípido) foram desenvolvidas, mediante várias condições experimentais, e caracterizadas com o objectivo de obter uma formulação com elevados parâmetros de encapsulação e propriedades físico-químicas compatíveis com uma futura aplicação PDT.

Estudos de associação celular em células de cancro do pulmão (A549), avaliados por espectroscopia de fluorescência, demonstraram que lipossomas encapsulando a bacterioclorina e vectorizados com transferrina, promoveram aproximadamente duas vezes mais internalização celular em comparação com lipossomas não vectorizados com transferrina (lipossomas controlo). Em estudos de associação celular adicionais, lipossomas vectorizados com transferrina e encapsulando outro fotossensibilizador hidrofóbico (p-THPP) não manifestaram diferença na internalização celular entre a formulação vectorizada com transferrina e a não vectorizada.

Palavras-chave: Cancro; terapia fotodinâmica; fotossensibilizador; lipossomas; vectorização.

Thesis abstract

Cancer is characterized as a disease with a high incidence and mortality rate essentially due to the absence of an effective treatment in some cancer types. The conventional treatments as surgery, chemotherapy and radiotherapy, have in common a lack of selectivity associated to a high toxicity effect in healthy cells which is the bases of the innumerable side effects of these treatments.

On the other hand, photodynamic therapy has elevated selectivity (accumulation and retention) of the photosensitizer in tumor cells, minimizing the damage on healthy cells. Briefly, PDT is the combination of three factors: a photosensitizer molecule (PS), a beam of a specific wavelength and the presence of molecular oxygen.

The encapsulation of these photosensitizers in pegylated liposomes conjugated with specific ligands, normally overexpressed in tumor cells, has been investigated in order to increase the therapeutic success. The aim of this project was to develop and evaluate a potential liposomal formulation targeted with transferrin, encapsulating a photosensitizer molecule (bacteriochlorin) as a new therapeutic approach for cancer.

Different liposomal formulations (including different lipid composition and different ratios drug/lipid) were developed by various experimental conditions, and characterized in order to obtain a formulation with the optimal parameters: high PS encapsulation and suitable characteristics for intravenous administration in PDT.

Cell association studies in lung cancer cells (A549), measured by fluorescence spectroscopy, showed that liposomes encapsulating bacteriochlorin and targeted with transferrin, promoted only, approximately, two-fold cell internalization, compared with liposomes non-targeted (control). Additional cell association studies, showed no difference concerning cell internalization between the liposomes encapsulating another hydrophobic photosensitizer (p-THPP) targeted with transferrin and non-targeted formulation.

Keywords: Cancer; photodynamic therapy; photosensitizer; liposomes; targeting.

Abreviaturas

- A549** - linha celular humana de adenocarcinoma do pulmão
- ATCC** - American Type Culture Collection
- ATP** - do inglês “adenosine-5'-triphosphate”, adenosina trifosfato
- ALA** - do inglês “aminolevulinic acid”, ácido 5-aminolevulínico
- BCA** - do inglês “bicinchoninic acid”, ácido bicinconínico
- BSA** - do inglês “bovine serum albumin”, albumina de soro bovino
- C₁₂E₈** - éter 8-lauril polixietileno
- CNC** - Centro de Neurociências e Biologia Celular
- DCs** - do inglês “dendritic cells”, células dendríticas
- DMEM** - Dulbecco's modified eagle medium
- DSPE-PEG** - 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N (metoxy(polietilenoglicol)2000)
- DSPE-PEG-(MAL)** - 1,2-distearoilfosfatidiletanolamina maleimido-(poli-etilenoglicol) 2000)
- DSPC** - diestearoilfosfatidilcolina
- DSPG** - diesteroilfosfatidilglicerol
- EA** - eficácia de acoplamento
- EDTA** - do inglês “ethylenediamine tetraacetic acid”, ácido etilendiaminotetracético
- EE** - eficácia de encapsulação
- EPR** - do inglês “enhanced permeability and retention”, efeito de permeabilidade e retenção aumentado
- FBS** - do inglês “fetal bovine serum”, soro bovino fetal
- FDA** - Food and Drug Administration
- FITC-anti CD71** - anti-receptor de transferrina humana marcado com a sonda fluorescente isotiocianato de fluoresceína
- HEPES** - do inglês “(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid”, ácido N-(2-hidroxietilo)-piperazina-N'-2-etanesulfônico
- H-ALA** - do inglês “aminolevulinic acid hexylester”, hexaminolevulinato
- HBS** - do inglês “HEPES-buffered saline”, solução tampão salina de Hepes
- HpD** - do inglês “hematoporfirin derivative”, derivado de hematoporfirina
- IARC** - International Agency for Research on Cancer
- IL's** - interleucinas
- LUV** - do inglês “large unilamellar vesicles”, vesículas unilamelares grandes

m-THPC - temoporfina

M-ALA - do inglês “methyl-esterified ALA”, aminolevulinato de metilo

MAL - maleimido

MAL - metilaminolevulinato

MLVs - do inglês “multilamellar vesicles”, vesículas multilamelares

O₂ - oxigénio molecular

PBS - do inglês “phosphate buffered saline”, solução tampão fosfato

PCS - do inglês “Photon Correlation Spectroscopy”, espectroscopia de correlação fotónica

PDT - do inglês “photodynamic therapy”, terapia fotodinâmica

PDR - do inglês “photodynamic reaction”, reacção fotodinâmica

PEG - do inglês “polyethylene glycol”, poli(etilenoglicol)

p-THPP - meso-tetra-(4-hydroxyphenyl) porphyrin

PI - do inglês “polydispersion index”, índice de polidispersão

PS - do inglês “photosensitizer”, fotossensibilizador

ROS - do inglês “reactive oxygen species”, espécies reactivas de oxigénio

SH - do inglês “thiol group”, grupo tiol

SLN - do inglês “solid lipid nanoparticle”, nanopartículas sólidas de lípidos

SPIONs - superparamagnetic iron oxide nanoparticles

SUV - do inglês “small unilamellar vesicle”, vesículas unilamelares pequenas

T_m - temperatura de transição de fase

TPDT - do inglês “targeted photodynamic therapy”, terapia fotodinâmica direccionada

Trf - transferrina

TrfR - receptor da transferrina

Trf-SH - transferrina tiolada

UV/VIS - ultravioleta / visível

2-IT - 2-iminotiolano

¹O₂ - oxigénio singuleto

³O₂ - oxigénio estado excitado tripleto

t_{1/2} - tempo de meia-vida

Lista de Figuras

Figura 1 - Ilustração esquemática do mecanismo de PDT envolvendo a acção de três factores: luz + fotosensibilizador + oxigénio	3
Figura 2 - O princípio da PDT no tratamento do cancro	6
Figura 3 - Efeitos induzidos PDT	7
Figura 4 - Reacções fotoquímicas em PDT	9
Figura 5 - Estrutura geral da porfirina e dos seus derivados: clorina (derivatizada no anel D) e bacterioclorina (derivatizada no anel B e D)	10
Figura 6 - Estruturas químicas de porfímero de sódio (Photofrin [®]) (A), ALA e MAL (Metvix [®]) (B), temoporfina (Foscan [®]) (C) e espectro de absorção do porfímero de sódio e da temoporfina	12
Figura 7 - Diferentes níveis de direccionamento dos fármacos	16
Figura 8 - Esquema das principais classes de primeira geração de nanopartículas utilizadas em ensaios clínicos de rotina	17
Figura 9 - Ilustração esquemática do processo de formação de lipossomas	19
Figura 10 - Diferentes tipos de lipossomas: lipossomas convencionais (A), lipossomas peguilados (B) e lipossomas direccionados (C)	21
Figura 11 - Ilustração esquemática do direccionamento passivo e activo em Terapia Fotodinâmica direccionada (TPDT)	24
Figura 12 - Ilustração esquemática da internalização de lipossomas vectorizados com transferrina por endocitose mediada pelos respectivos receptores	26
Figura 13 - Ilustração esquemática da reacção de acoplamento da transferrina ao lípido DSPE-PEG-(MAL) incorporado na bicamada membranar do lipossoma	28
Figura 14 - Ilustração esquemática da preparação de lipossomas segundo o método de hidratação do filme lipídico	29
Figura 15 - Citometria de fluxo para avaliar a expressão/ densidade de receptores de transferrina (TrfR) na superfície das células de adenocarcinoma do pulmão humano (A549)	57

Lista de Tabelas

Tabela I - Resumo das vantagens e limitações da PDT	5
Tabela II - Fotossensibilizadores comercializados para PDT	13
Tabela III - Fotossensibilizadores em desenvolvimento clínico para PDT	14
Tabela IV - Formulações lipossomais de fármacos aprovadas para aplicação clínica	20
Tabela V - Parâmetros de encapsulação (capacidade de carga e eficácia de encapsulação (E.E)) de formulações lipossomais (DSPC:DSPG (9:1) e DSPC:DSPG (7:3)) com diferentes rácios molares fármaco/lípido (%) e diferentes concentrações de lípido inicial (mM), preparadas pelo método de hidratação do filme lipídico.....	51
Tabela VI - Diâmetro médio final de formulações lipossomais de composição lipídica DSPC:DSPG (9:1), 1% de rácio molar fármaco/lípido e 40 mM de lípido inicial com 1 mol% de DSPE-PEG-(MAL) e direccionados com transferrina	55
Tabela VII - Capacidade de carga (<i>loading</i>) da formulação lipossomal convencional DSPC:DSPG (9:1) e da formulação vectorizada com transferrina DSPC:DSPG:DSPE-PEG-(MAL)-Trf (9:1:0,1) com 1% de rácio molar bacterioclorina/lípido e 40 mM de lípido inicial.....	56
Tabela VIII - Capacidade de carga (<i>loading</i>) de formulações lipossomais vectorizadas com transferrina (DSPC:DSPG:DSPE-PEG-(MAL)-Trf (9:1:0,1)), encapsulando a bacterioclorina e a molécula p-THPP	60
Tabela IX - Concentração de fármaco internalizada e associação celular da formulação lipossomal vectorizada (DSPC:DSPG:DSPE-PEG-(MAL)-Trf (9:1:0,1)), encapsulando a bacterioclorina e a molécula p-THPP	62

Capítulo 1:

Introdução

1.1) Terapia fotodinâmica (PDT)

A terapia fotodinâmica (PDT do inglês *photodynamic therapy*) é uma modalidade terapêutica minimamente invasiva, clinicamente aprovada no tratamento de doenças neoplásicas e não neoplásicas (Calzavara, P. G. *et al.*, 2007). A PDT pode exercer uma actividade citotóxica selectiva para as células alvo principalmente devido à formação de espécies reactivas de oxigénio que danificam as estruturas moleculares e as biomoléculas conduzindo, em última instância, a morte celular por apoptose ou necrose (Kessel, D., 2006). A PDT baseia-se na combinação simultânea de três factores: uma molécula fotossensibilizadora, a irradiação com um feixe de luz de comprimento de onda (λ) específico e a presença de oxigénio molecular (Hasan, H. *et al.*, 2000) (Figura 1).

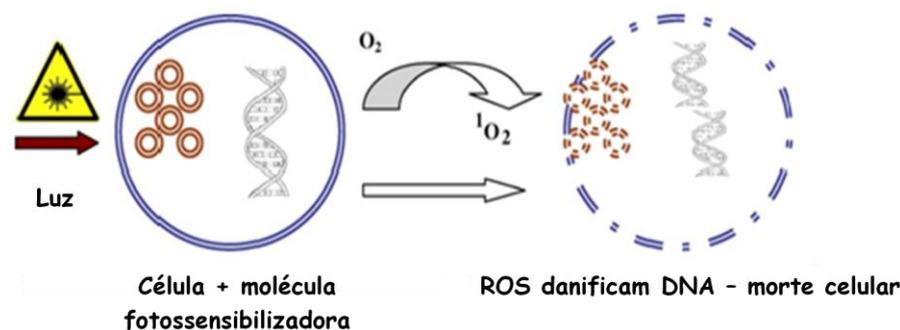


Figura 1 - Ilustração esquemática do mecanismo de acção da PDT envolvendo de três factores: luz + fotossensibilizador + oxigénio → morte celular. Imagem adaptada de Spyratou, E. *et al.*, 2012.

Embora a PDT já tenha sido aprovada há 25 anos pela autoridade regulamentar norte-americana (FDA do inglês *Food and Drug Administration*), só anos depois começou a ser utilizada regularmente na clínica no tratamento e diagnóstico de doenças oncológicas. Esta terapêutica tem demonstrado elevada eficácia no tratamento de pulmão, cabeça, pescoço e esófago. Além disso, é considerada o tratamento ideal para muitos casos de cancro de pele do tipo não melanoma. É ainda usada em patologias como a degeneração macular relacionada com a idade, psoríase, parasitoses cutâneas (leishmaniose) e acne (Brown, S. B. *et al.*, 2004).

No âmbito desta dissertação, a PDT será abordada como uma modalidade terapêutica actual para tratamento oncológico.

1.1.1) Vantagens e limitações da PDT

A PDT é um procedimento clínico que apresenta numerosas vantagens quando comparada com os métodos terapêuticos convencionais de tratamento de cancro como a quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia (Fayter, D. *et al.*, 2010). As intervenções terapêuticas convencionais têm em comum a falta de selectividade, o número de utilizações limitadas e o surgimento de efeitos secundários relevantes devido à elevada toxicidade para as células não tumorais (Feng, S. e Chien S., 2003). Neste sentido, os investigadores e a comunidade médica dedicam-se ao estudo e à aplicação de modalidades terapêuticas alternativas como a PDT.

Na PDT, a repetição do tratamento não resulta em toxicidade cumulativa e tanto o fotossensibilizador como a irradiação não afectam a acção de outros fármacos antineoplásicos. Sendo assim, é possível utilizar a PDT como adjuvante de métodos terapêuticos convencionais de tratamento de cancro (Triesscheijn, M. *et al.*, 2006).

A distribuição e acumulação do fotossensibilizador no tecido alvo, associado à administração da luz nesse tecido, permitem minimizar os danos nos tecidos saudáveis. É um tratamento minimamente invasivo, geralmente indolor, não possui efeitos secundários que afectem significativamente o bem-estar do paciente e, um único procedimento pode resultar na destruição do tecido alvo. No que se refere à arquitectura dos tecidos, a PDT não danifica elementos celulares como o colagénio e a elastina, ou seja, preserva a matriz permitindo assim uma regeneração sem cicatrização (Brown, S. B. *et al.*, 2004). Esta vantagem é de extrema importância no tratamento dermatológico pois o resultado cosmético final é um dos factores que mais influencia a decisão da dupla médico/paciente na escolha do tratamento a adoptar.

Uma das principais limitações da PDT consiste na impossibilidade de tratar tumores não sólidos (ex. leucemia), metastizados, não acessíveis a uma fonte de luz e ainda doenças dermatológicas com grande disseminação corporal. Adicionalmente, os fármacos aprovados para administração intravenosa em PDT (Photofrin[®] - porfímero de sódio e Foscan[®] - temoporfina) são caracterizados por um elevado tempo de eliminação (dias ou semanas), o que conduz inevitavelmente à fotossensibilidade cutânea a menos que o paciente permaneça em casa com presença de luz mínima (Grosswewer, L. I., 2005). A tabela I mostra as principais vantagens e limitações da PDT.

Tabela I – Resumo das principais vantagens e limitações da PDT.

Vantagens	Limitações
Elevada selectividade para o tecido alvo minimiza efeitos adversos.	Elevado tempo de permanência de alguns fármacos no organismo.
Ausência de mecanismos de resistência.	Aplicação exclusiva a tecidos acessíveis a uma fonte de luz.
Tratamento único pode resultar na destruição do tecido lesado.	Não aplicável a doenças dermatológicas com grande disseminação corporal.
Preservação da matriz celular e regeneração sem cicatrização.	Não aplicável a tumores não sólidos e metastizadas.
Possibilidade de administração intravenosa ou tópica.	

A investigação actual na área da PDT procura sintetizar novas gerações de compostos fotossensibilizadores (2^a e 3^a geração) com as seguintes características: i) rápida acumulação no tecido alvo que possibilite um período de tempo mais curto entre a administração do fármaco e a irradiação do tecido, ii) rápida eliminação do composto do organismo para minimizar o efeito de fotossensibilização e iii) absorção máxima de luz num comprimento de onda no vermelho próximo da gama de infra-vermelhos o que permite uma maior penetração da luz nos tecidos (Robertson, C. A. *et al.*, 2009; Agostinis, P. *et al.*, 2011).

Em termos clínicos, a PDT não só é aplicada no tratamento de diferentes tipos de cancro em fase inicial mas também em cuidados paliativos, com o objectivo de melhorar a qualidade de vida dos doentes em fase terminal (ex. cancro endobrônquico obstrutivo) (Igarashi, A. *et al.*, 2003; Fayter, D. *et al.*, 2010).

1.1.2) Mecanismos de acção da terapia fotodinâmica *in vivo*

A eficácia da PDT depende de múltiplos factores como o tipo de tecido alvo, os níveis de ATP, o tipo de fotossensibilizador, a sua concentração e localização intra ou extracelular, a dose de luz, o tempo entre a administração do fotossensibilizador e a exposição à luz, e a disponibilidade/pressão de oxigénio molecular (Nawalany, K. *et al.*, 2012; Castano, A. P. *et al.*, 2006). São estes factores que vão modular processos independentes que contribuem para uma destruição eficiente do tecido alvo: i) morte celular directa (apoptose e/ou necrose)

devido à acção nefasta das espécies reactivas de oxigénio nas estruturas e biomoléculas celulares, ii) autofagia associada à morte celular e iii) isquemia e destruição da microvasculatura do tumor, responsável pelo fornecimento de oxigénio e nutrientes ao tumor, o que induz uma resposta inflamatória aguda e consequente recrutamento de neutrófilos para o local (Kessel, D., 2006; Castano, A. P. *et al.*, 2006).

Além dos efeitos directos referidos no parágrafo anterior, estudos têm revelado que a resposta inflamatória aguda local gerada pela acção directa da PDT pode conduzir à activação local e sistémica do sistema imunitário (macrófagos, monócitos, linfócitos e células dendríticas) o que constitui um factor adicional na destruição do tecido alvo (Figura 2) (Mroz, P. *et al.*, 2010).

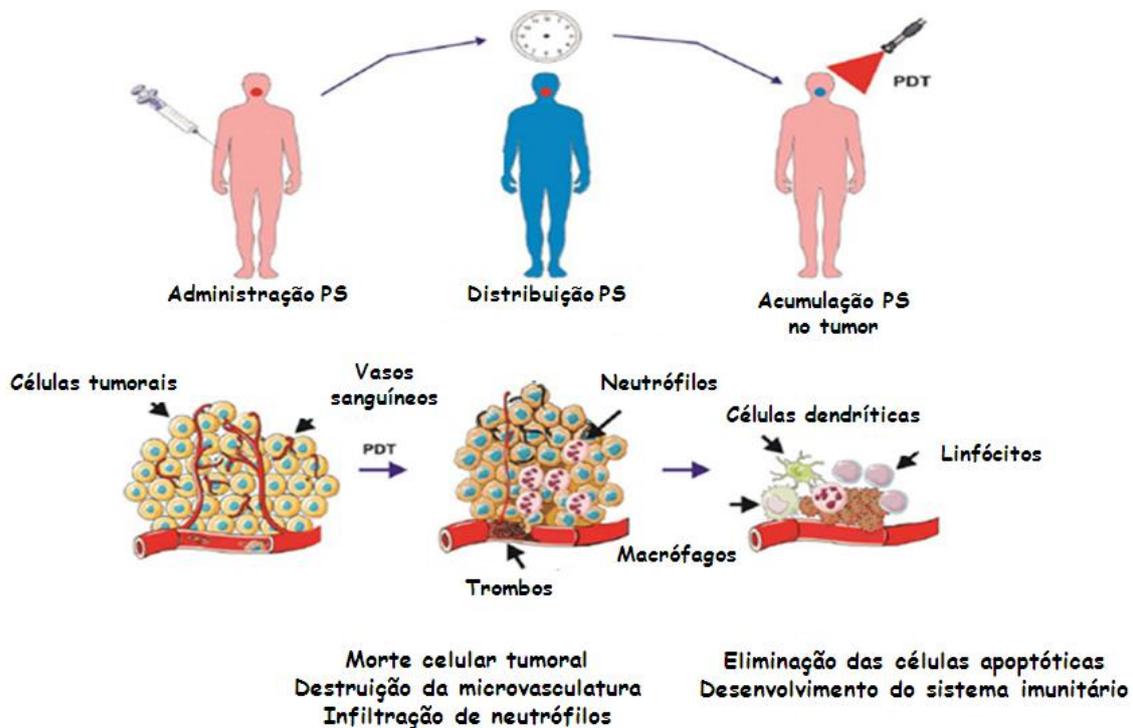


Figura 2 - O princípio da PDT no tratamento do cancro. O fotosensibilizador (PS) é administrado por via sistémica ou tópica e, após um período de tempo distribui-se e acumula-se preferencialmente no tumor. A irradiação activa o PS e na presença de oxigénio molecular ocorre uma reacção fotoquímica que culmina na produção de oxigénio singuleto (1O_2) e de outras espécies reactivas de oxigénio. Desta acção resulta a destruição e morte das células tumorais por via apoptótica, necrótica ou induzida pelo mecanismo de autofagia, acompanhada de uma reacção inflamatória local que participa na remoção das células apoptóticas, homeostase do tecido normal e activação do sistema imunitário. Imagem adaptada de Agostinis, P. *et al.*, 2011.

Os fotossensibilizadores absorvem a luz visível e ao reagir com moléculas ou estruturas intracelulares convertem o oxigénio molecular numa série de espécies de oxigénio altamente reactivas (ROS do inglês *reactive oxygen species*) (Agostinis, P. *et al.*, 2011). O tecido alvo é irradiado de modo a que a radiação penetre efectivamente no tecido, já que emissões abaixo de 600 nm são absorvidas por cromóforos bioendogénicos e/ou espalhadas pelos tecidos, tornando assim a foto-oxidação apenas superficial (Triesscheijn, M. *et al.*, 2006). As ROS têm um efeito directo sobre as células cancerígenas, provocando a morte celular por necrose e/ou apoptose mediante desintegração dos componentes celulares (proteínas, lípidos e ácidos nucleicos) (Yano, S. *et al.*, 2011) (Figura 3).

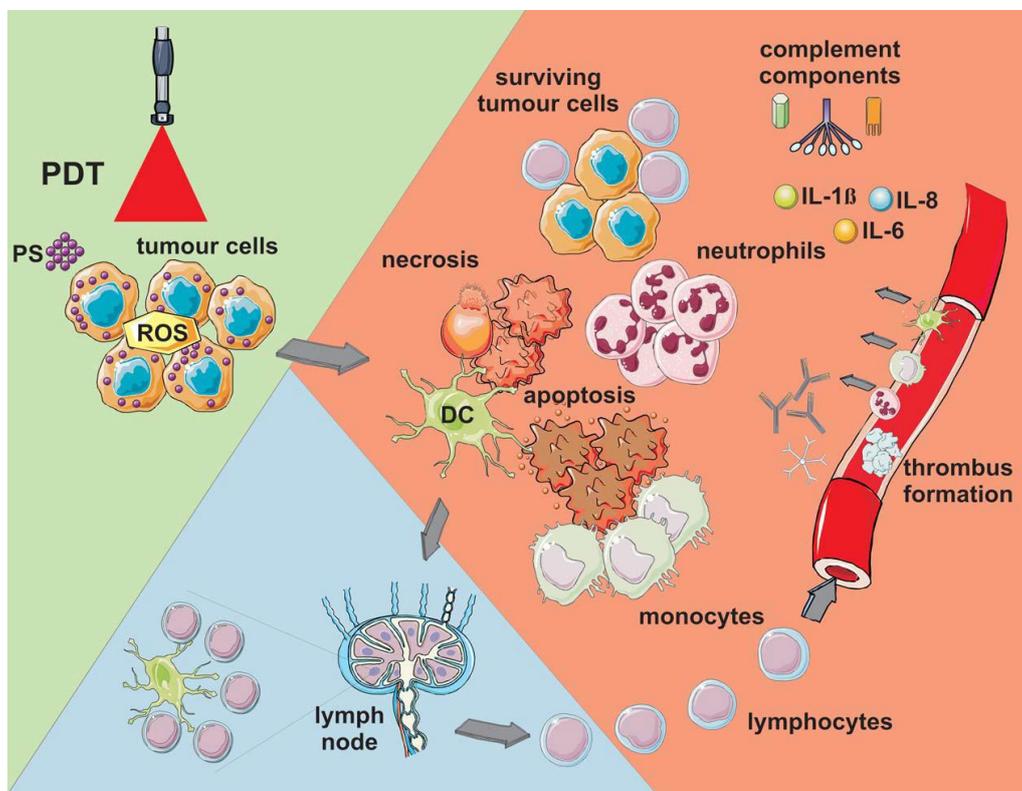


Figura 3 - Efeitos induzidos pela PDT. A excitação do fotosensibilizador (PS), mediada pela irradiação da luz num comprimento de onda específico, leva à produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) que, por sua vez, conduzem à morte celular (predominantemente por apoptose e necrose). A morte celular potencia ainda danos ao nível da microvasculatura (não ilustrado), que restringe ainda mais o fornecimento de oxigénio e nutrientes. A destruição do tecido é acompanhada pela activação do sistema complemento (interleucinas - IL's), libertação de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de células imunitárias (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (DCs) que migram para os gânglios linfáticos de forma a fagocitarem os restos celulares. Imagem adaptada de Agostinis, P. *et al.*, 2011.

Em geral, a morte celular ocorre por necrose quando a intensidade do tratamento fotodinâmico é excessiva, produzindo rápida lise celular (Nawalany, K. *et al.*, 2012). Quando o tratamento fotodinâmico é menos intenso, as ROS formadas provocam stress oxidativo na mitocôndria, fazendo com que a mesma liberte proteínas pró-apoptóticas que são responsáveis pela apoptose. Para além das mitocôndrias, diversos organelos celulares (lisossomas, membranas plasmáticas, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e núcleo) são danificados (Robertson, C. A. *et al.*, 2009; Nawalany, K. *et al.*, 2012).

1.1.3) Reacção fotodinâmica (PDR) em terapia fotodinâmica

O desenvolvimento de lasers foi um marco importante na PDT. A luz produzida pode facilmente irradiar, através de uma fibra óptica, a locais de difícil acesso e ser entregue de forma direccionada (Agostinis, P. *et al.*, 2011).

Para além da aplicação da luz, a excitação dos fotossensibilizadores é o sucesso da reacção fotodinâmica (PDR do inglês *photodynamic reaction*). A activação dos mesmos por absorção da luz induz a passagem da molécula de um estado fundamental para um estado excitado, onde a molécula pode reverter ao estado fundamental com emissão de luz por fluorescência, não existindo assim efeito fotodinâmico. Se possuir as características necessárias, a molécula pode passar por cruzamento intersistema, atingindo um estado excitado tripleto ($^3\text{O}_2$) e reagir com o oxigénio molecular (O_2) originando oxigénio singuleto ($^1\text{O}_2$) - tipo II (Calzavara, P. G. *et al.*, 2007). Alternativamente pode ocorrer o mecanismo do tipo I em que a molécula excitada reage com um substrato intracelular como, por exemplo, a membrana celular, onde há produção de radicais livres resultante da interacção com produtos oxigenados (Figura 4). Ambas as reacções ocorrem em simultâneo e a prevalência de uma face à outra, depende do tipo de fotossensibilizador e do oxigénio disponível, possuindo este último um tempo de meio vida reduzido ($< 0,1$ ms) e um raio de acção de 10-20 nm (Calzavara, P. G. *et al.*, 2007; Allison, R. *et al.*, 2011).

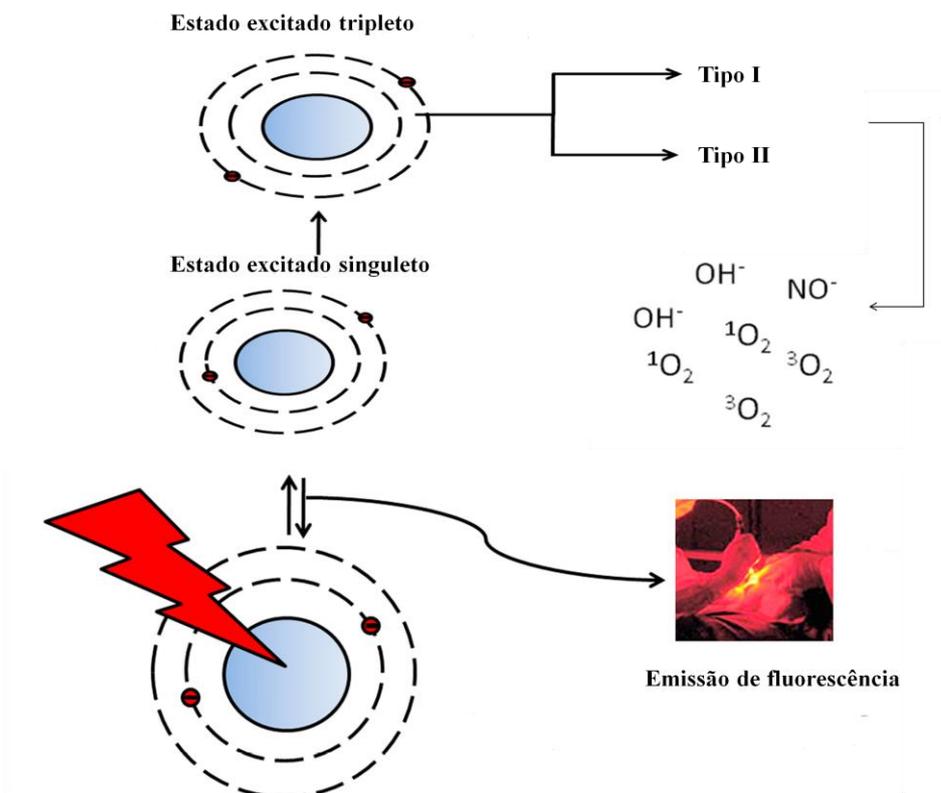


Figura 4 - Reações fotoquímicas em PDT. Quando o fotossensibilizador no estado fundamental é irradiado com luz a um comprimento de onda específico, este atinge um estado excitado singuleto que pode, por sua vez, decair por emissão de fluorescência ou, alternativamente, atingir um estado excitado tripleto mais estável. No seu estado tripleto, o fotossensibilizador pode reagir directamente com biomoléculas (mecanismo tipo I) ou com oxigénio produzindo oxigénio singuleto ($^1\text{O}_2$) (mecanismo tipo II). Ambos os mecanismos conduzem à fototoxicidade nas células tumorais por produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS). Imagem adaptada de Yano, S. *et al.*, (2011).

1.1.4) Fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica

De todos os componentes necessários na terapia fotodinâmica - oxigénio, luz e o fotossensibilizador, este último é o que pode ser mais facilmente manipulado de forma a aumentar a eficácia do tratamento (Castano, A. P. *et al.*, 2006).

1.1.4.1) Características de um fotossensibilizador ideal

Um fotossensibilizador aplicado em PDT deve apresentar-se como: i) uma molécula (PS) com o maior grau de pureza possível, ii) não-tóxica no escuro, iii) citotóxica apenas na presença de luz, iv) com composição química constante, v) elevados níveis de absorção dentro da “janela fototerapêutica” (600-900 nm), vi) elevada selectividade para os tecidos neoplásicos ou não neoplásicos, vii) elevado nível energético no estado tripleto de modo a

que se obtenha um elevado rendimento de oxigénio singuleto e, fundamentalmente, viii) deve ser eliminada do organismo de uma forma rápida de modo a não provocar irritação cutânea devido ao efeito de fotossensibilização (Allison, R. *et al.*, 2004; Robertson, C. A. *et al.*, 2009). Adicionalmente, o processo de síntese do PS deve ser facilmente reprodutível e de baixo custo de modo a que a sua produção seja possível em larga escala e, deve apresentar estabilidade para que seja possível o seu armazenamento em condições apropriadas previamente estudadas (ex. protecção da luz, temperatura, acondicionamento em azoto) (Hasan, H. *et al.*, 2000).

1.1.4.2) Classes de fotossensibilizadores

Hoje em dia, existem vários tipos de fotossensibilizadores. Apesar dos fotossensibilizadores naturais serem abundantes na natureza e os sintéticos apresentarem uma fácil produção, existem poucos disponíveis no mercado para uso terapêutico devido ao pequeno número de estudos clínicos (Agostinis, P. *et al.*, 2011).

Os fotossensibilizadores são geralmente classificados como porfirinas e não porfirinas (O'Connor, A. E. *et al.*, 2009). A maioria inclui na sua estrutura um anel tetrapirrólico (porfirinas e clorinas) ou estruturalmente relacionados com ele, como as bacterioclorinas (Allison, R. *et al.*, 2004) (Figura 5). Este macrociclo é o principal componente da hemoglobina e mioglobina e pode conter um átomo central metálico como o ferro ou o magnésio. A presença de um sistema de electrões 2π garante-lhe um elevado potencial de absorção, o que torna as porfirinas atractivas para aplicação neste tipo de terapia (O'Connor, A. E. *et al.*, 2009).

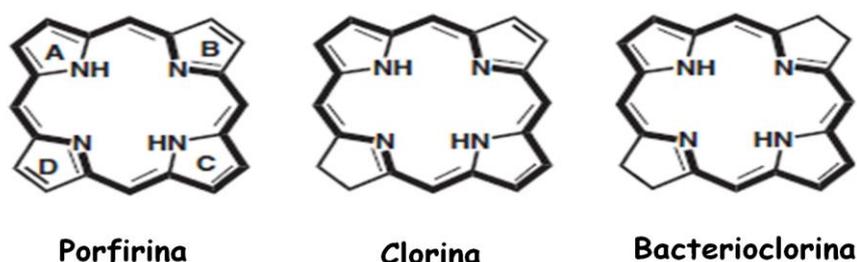


Figura 5 - Estrutura geral da porfirina e dos seus derivados: clorina (derivatizada no anel D) e bacterioclorina (derivatizada no anel B e D). Imagem retirada de Pereira, M. M. *et al.*, 2009.

Existem fotossensibilizadores de primeira geração que se baseiam em porfirinas de origem natural, sendo a hematoporfirina (HpD) a mais destacada uma vez que apresenta elevado potencial fototóxico e absorção na zona do visível, o que permite que a PDT actue em camadas profundas. A HpD desde cedo apresentou alta selectividade para células tumorais o que levou à síntese de um derivado da HpD (porfímero de sódio) com o nome comercial de Photofrin[®]. Este medicamento foi aprovado em 1993 no Canadá como o primeiro fármaco para o tratamento de degeneração macular relacionada à idade (Bonneau, S. e Vever-Bizet, C., 2008). O Photofrin[®] é um composto hidrofílico, tem como princípio activo uma mistura complexa de oligómeros de hematoporfirina e é usado maioritariamente no tratamento do cancro esofágico. Este fotossensibilizador também é usado no tratamento de células não pequenas de cancro do pulmão em pacientes em que as modalidades terapêuticas convencionais não são apropriadas (Igarashi, A., *et al.*, 2003).

A HpD apresenta algumas limitações, estando a principal desvantagem relacionada com o elevado tempo de permanência do fármaco no organismo, o que leva a que o paciente permaneça cerca de seis semanas sem exposição à radiação solar devido à fotossensibilidade cutânea (<http://cancer.gov>, Maio 2012). Outra desvantagem das porfirinas é que possuem banda de absorção em torno de 630 nm, o que não é suficiente para excitar a porfirina de forma muito eficaz num tratamento com PDT, uma vez que a luz com esse comprimento de onda não penetra profundamente no tecido (cerca de 1 cm) (Triesscheijn, M. *et al.*, 2006; Bonneau, S. e Vever-Bizet, C., 2008).

Os fotossensibilizadores de segunda geração como o Foscan[®] (temoporfina) e o Visudyne[®] (verteporfina) dizem respeito aos compostos sintéticos, hidrofóbicos e têm sido desenvolvidos para ultrapassar as limitações inerentes ao Photofrin[®]. Estes fármacos são quimicamente puros, absorvem luz a um comprimento de onda mais longo (650-800 nm) causando menos fotossensibilidade e permitindo o tratamento a maior profundidade (Paszko, E. *et al.*, 2011). Os fotossensibilizadores mais utilizados são o ácido 5-aminolevulínico (ALA) e o seu derivado lipofílico, o metilaminolevulinato (MAL), aplicados no tratamento dermatológico de cancro cutâneo não melanoma. O MAL é um derivado esterificado do ALA e apresenta maior selectividade para as células neoplásicas quando comparado ao ALA (Fukuda, H. *et al.*, 2005; Yano, S. *et al.*, 2011) (Figura 6).

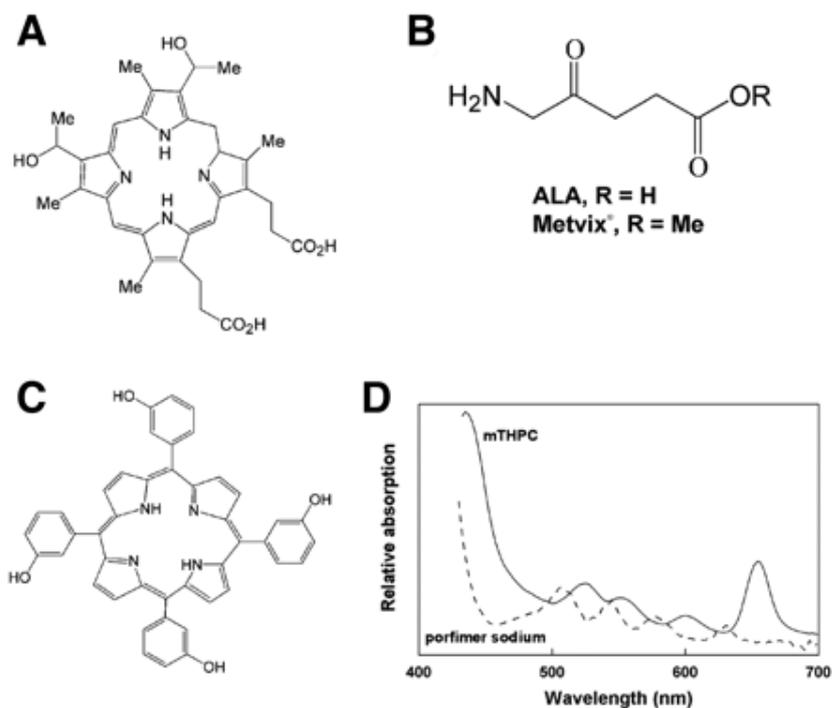


Figura 6 - Estruturas químicas de porfímero de sódio (Photofrin[®]) (A), ALA e MAL (Metvix[®]) (B), temoporfina (Foscan[®]) (C) e espectro de absorção do porfímero de sódio e da temoporfina. Imagem retirada de Hasan, H. *et al.*, 2000.

Dentro desta gama de fotossensibilizadores fazem parte compostos do tipo clorinas, bacterioclorinas, fitalocianinas e naftalocianinas. Estudos indicam as bacterioclorinas como candidatos ideais uma vez que apresentam melhores condições espectroscópicas, quando comparadas com as porfirinas e clorinas, devido a uma absorção na zona próxima dos 750 nm que equivale a uma absorvidade molar bastante elevada e a uma maior penetração da luz no tecido (cerca de 2 cm) (Pereira, M. M. *et al.*, 2009).

Embora a PDT seja uma terapêutica reconhecida em muitos países, possui um número limitado de fármacos fotossensibilizadores comercializados para tratamento de diferentes indicações terapêuticas (Tabela II).

No entanto, no presente existem várias moléculas em ensaios clínicos como intuito de serem aprovados para tratamentos oncológico e não oncológico (Tabela III).

Tabela II - Fotossensibilizadores comercializados para PDT. Adaptado de <http://www.fda.gov> (Maio, 2012) e <http://www.ema.europa.eu/ema/> (Maio, 2012).

Nome comercial	Substância Activa	Empresa/ Instituto	Indicação terapêutica
Alacare [®]	Ácido aminolevulinato (ALA)	Bayer Healthcare	Queratose actínica
Levulan [®] / Kerastick [®]		DUSA	
Gliolan [®]		Medac	Glioma (diagnóstico)
Hexvix [®]	Hexaminolevulinato (H-ALA)	PhotoCure ASA	Cancro bexiga (diagnóstico)
Metvix [®] / Metvixia [®]	Aminolevulinato de metilo (MAL)		Queratose actínica e carcinoma basocelular
Photofrin [®]	Derivado de hematoporfirina (HpD)	Axcan Pharma Inc.	Displasia cervical, cancro bexiga, esofágico e cancro do pulmão de células não pequenas
Photobarr [®]			Esôfago de Barret
Laserphyrin [®] / Leserfin [®]	Talaporfina	Light Sciences	Cancro pulmão
Foscan [®]	Temoporfina (m-THPC)	Biolitec Pharma	Cancro bucal e nasofaringe
Visudyne [®]	Verteporfina	QLT Inc./ Novartis	Degeneração da mácula relacionada com a idade

Tabela III - Fotosensibilizadores em desenvolvimento clínico para PDT. Adaptado de Agostinis, P. *et al.*, 2011.

Família	Nome comercial	Substância Activa	λ (nm)	Empresa/ Instituto	Indicação terapêutica
Porfirina	Photogem [®]	Derivado de hematoporfirina (HpD)	630	Moscow Research Oncological Institute	Cancro esófago e colon
	Levulan [®]	Ácido 5-aminolevulínico (ALA)	635	DUSA	Queratose actínica
	Metvix [®]	Aminolevulinato de metilo (MAL)	635	PhotoCure ASA	Doença de Bowen
Texafirina	Antrin [®] ; LuTex	Lutexaphyrin	732	Pharmacyclis	Cancro de mama
Clorina	LS11, Photolon [®]	Talaporfina	660	Light Sciences	Melanoma, Cancro de mama e colo-rectal
	Litx, Apoptosin, Laserphyrin [®]				
	Photochlor [®]	2- (1-Hexyloxyethyl) 2-devinylpyropheophorbidea (HPPH)	665	RPCI	Cancro pulmão e esófago
Fitalocianina	Photosens [®]	Fitalocianina	675	General Physics Institute	Degeneração macular relacionada à idade
	Pc4	Fitalocianina	675	CWRU	Micose fungóide e Síndrome de Sézary
Bacterioclorina	Tookad [®]	Palladium-Bacteriopheophorbide	762	The Weisman Institute of Science	Adenocarcinoma da prostate

Uma das razões que explicará o número reduzido de moléculas fotossensibilizadoras aprovadas, poderá ser a inexistência de compostos com as características ideais uma vez que estes fármacos absorvem luz que apresenta uma penetração limitada nos tecidos dado o comprimento de onda máximo de absorção não corresponder ao vermelho próximo da gama de infravermelhos.

Com os fotossensibilizadores de terceira geração pretende-se aumentar a selectividade para o tecido alvo, diminuir a fotossensibilidade ao promover o máximo efeito fotodinâmico ao nível da sua acumulação nas células tumorais, minimizar efeitos secundários e absorver luz que consiga uma maior penetração no tecido (Yano, S. *et al.*, 2011).

Com o surgimento destes compostos de terceira geração emergem novas estratégias de distribuição selectiva de fármacos, nomeadamente a conjugação com anticorpos monoclonais como a herceptina (anticorpo para o receptor HER2), ligandos específicos como vitaminas (folato), glicoproteínas (transferrina), factores de crescimento, peptídeos, lipoproteínas e a encapsulação em nanotransportadores como lipossomas, niossomas, dendrímeros, nanotubos de carbono e microcápsulas (Paszko, E. *et al.*, 2011).

1.2) Sistema de entrega de fármacos

O sistema de entrega de fármacos (do inglês *drug delivery system*) é uma abordagem que permite controlar o perfil farmacocinético e de biodistribuição de fármacos, melhorando a eficácia do tratamento e minimizando ou eliminando efeitos adversos.

Os sistemas de entrega de fármacos permitem alcançar diversas vantagens: i) proteger o fármaco da degradação precoce, ii) aumentar a absorção do fármaco por facilitar a sua difusão pelo epitélio vascular, iii) ultrapassar a resistência a fármacos pela penetração e distribuição em células/tecidos alvo, iv) possibilidade de realizar a entrega simultânea de vários fármacos permitindo controlar o seu rácio no local alvo e v) diminuir os efeitos adversos por regular espacial e temporalmente a sua libertação (Allen, T. M. e Cullis, P. R., 2004).

A entrega direccionada dos fármacos pode ser considerada a diferentes níveis dentro do corpo: 1) no órgão/tecido, 2) na célula alvo e 3) no compartimento subcelular dentro da célula alvo (Figura 7).

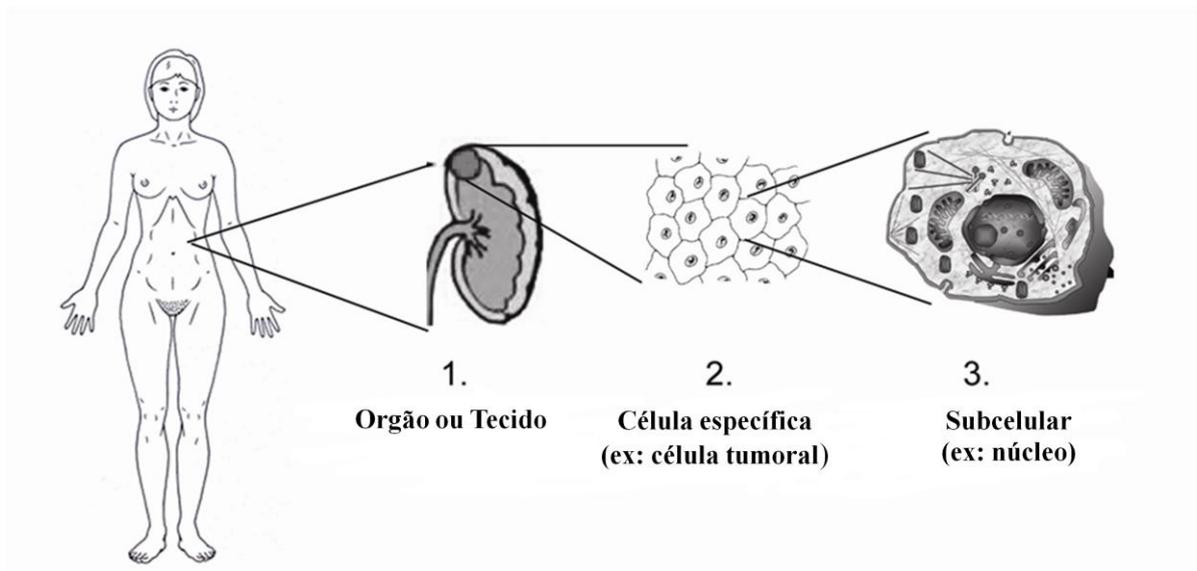


Figura 7 - Diferentes níveis de direccionamento dos fármacos. Imagem adaptada de Fretz Marjan, 2007.

1.2.1) Nanotransportadores como sistema de entrega de fármacos

No presente, encontram-se desenvolvidas várias estratégias de encapsulamento de fármacos que têm em comum a sua dimensão na escala nanométrica e podem ser classificados como nanopartículas “biodegradáveis” ou “biocompatíveis” e nanopartículas “não-biodegradáveis” (Duncan, R. e Gaspar, R., 2011) (Figura 8).

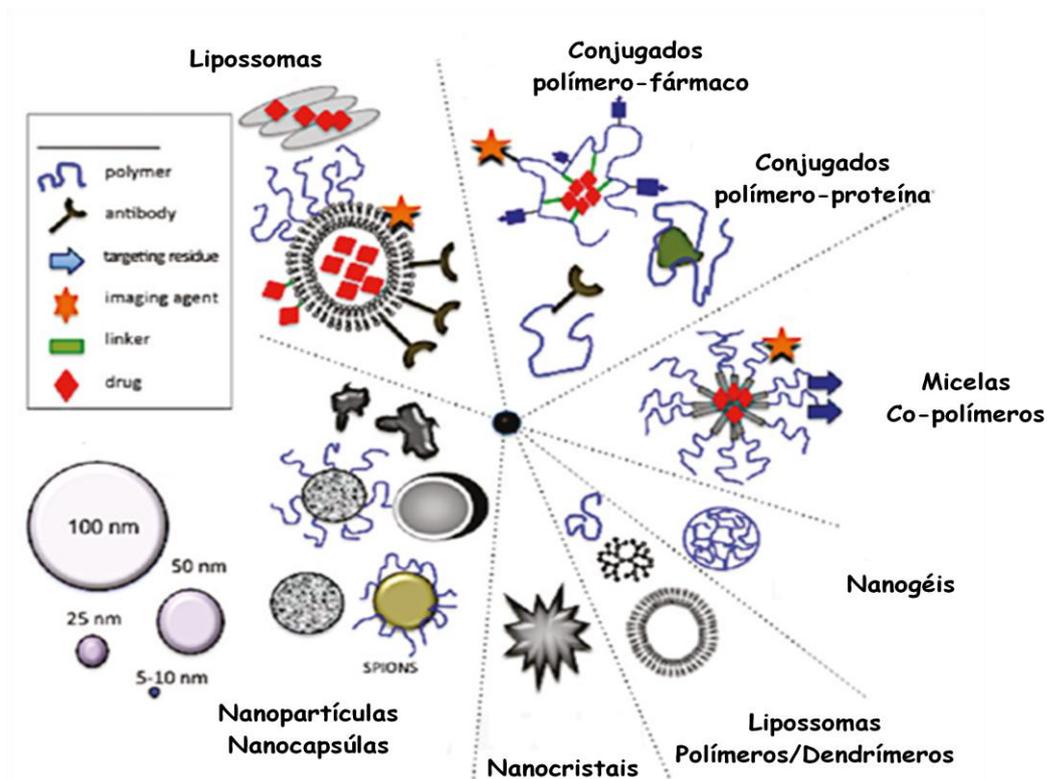


Figura 8 - Esquema das principais classes de primeira geração de nanopartículas. O painel de inserção dá uma ideia das dimensões relativas das diferentes nanopartículas. Adaptado de Duncan, R. e Gaspar, R., 2011.

Na classe das nanopartículas não-biodegradáveis fazem parte compostos baseados em cerâmicos ou metais como, por exemplo, a sílica (100-1000 nm) e o ouro (5-150 nm), óxidos metálicos como o óxido de ferro – SPIONs (20-150 nm), hidrogéis e nanotubos de carbono associados a nanopartículas de silicone conhecidos como quantum dots - QDs (1-100 nm). As nanopartículas biodegradáveis podem ser construídas a partir de uma base polimérica como conjugados de polímeros associados a fármacos e a proteínas, micelas associadas a co-polímeros (50-200 nm), nanopartículas poliméricas ou de base lipídica como lipossomas, dendrímeros e nanopartículas sólidas de lípidos – SLN (Duncan, R. e Gaspar, R., 2011).

A escolha do tipo de nanopartícula para cada aplicação médica baseia-se na sua dimensão, estrutura, composição, fármaco a encapsular e alvo pretendido resultando em características diferentes: i) capacidade de encapsular os fármacos, ii) estabilidade física e iii) capacidade de direccionamento específico.

No âmbito desta dissertação serão apenas abordados os lipossomas como sistema de entrega de fármacos, pois têm assumido um papel mais promissor, comparativamente com outros nanotransportadores na área da terapia fotodinâmica.

1.2.2) Lipossomas

Na década de 60 do século XX, estudos levados a cabo por Alec Bangham (1965) permitiram a primeira descrição dos lipossomas e despoletaram o seu amplo uso para estudos biofísicos como modelos de membranas biológicas (Torchilin, V. P., 2000).

Os lipossomas são nanovesículas artificiais, coloidais e esféricas compostas por uma ou mais bicamadas lipídicas (geralmente com lípidos anfipáticos) que englobam um meio aquoso central. Os lipossomas podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas, que ficam retidas no compartimento aquoso e na membrana, respectivamente (Lasic, D. D., 1993) (Figura 9).

No âmbito da nanotecnologia, os lipossomas são os veículos mais utilizados dadas as suas características muito favoráveis: elevada versatilidade de composição e tamanho, fácil produção e manuseamento, baixa toxicidade, biodegradabilidade da matriz, biocompatibilidade, ausência de imunogenicidade e possibilidade de acoplar à superfície ligandos de diferente natureza (Fonseca, C. *et al.*, 2005).

Os lipossomas podem conter uma ou várias bicamadas lipídicas em torno do compartimento aquoso interno e, portanto, são classificados em unilamelares e multilamelares, respectivamente (Mayer, L. D. *et al.*, 1986). Quanto ao tamanho, as vesículas unilamelares podem ser pequenas (25-50 nm, SUVs) ou vesículas unilamelares grandes (superior a 50 nm, LUVs) (Maurer-Spurej, E. *et al.*, 1999).

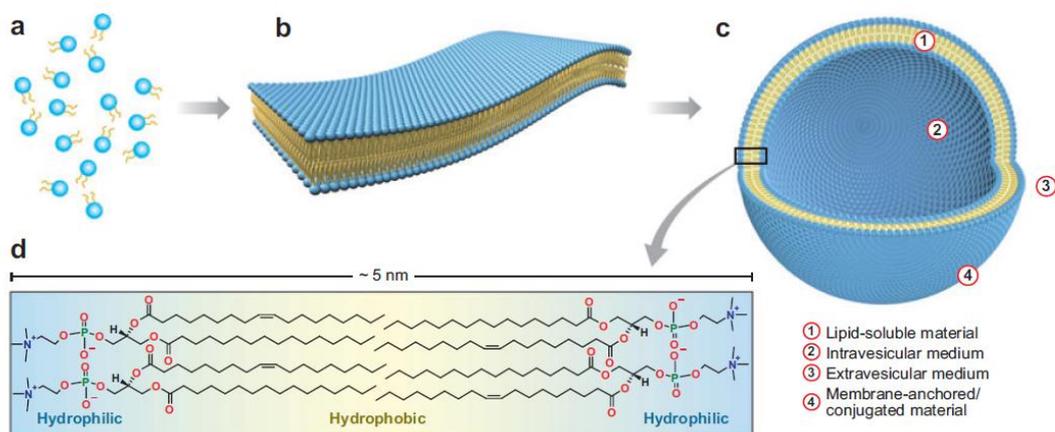


Figura 9 - Ilustração esquemática do processo de formação de lipossomas: auto-montagem de moléculas individuais de fosfolípidos (a) a folhetos de bicamada membranas (b), seguido da formação em lipossomas (c). A bicamada lipídica é composta por moléculas lipídicas individuais dispostas ordenadamente com as suas caudas hidrofóbicas voltadas para o interior da bicamada e com os seus grupos polares voltados para o meio aquoso e para o meio exterior ao lipossoma (d). Imagem adaptada de Jesorka, A. e Orwar, O. (2008).

Nas últimas décadas tem havido avanços significativos no desenvolvimento de formulações lipossomais adequadas a várias aplicações médicas: sistemas de entrega de fármacos no tratamento de cancro, infeções bacterianas ou patologias oftalmológicas, imagiologia de diagnóstico, adjuvante de vacina e dermatologia (Batista, C. M. *et al.*, 2007).

Os lipossomas têm a capacidade de modular o comportamento *in vivo* (perfil farmacocinético e biodistribuição) e/ou as propriedades de solubilidade do fármaco para o proteger da degradação prematura ou inativação após a administração intravenosa (Annelies, S. L. *et al.*, 2004). Em geral, quando um fármaco é encapsulado dentro de um nanotransportador, como os lipossomas, a eliminação a partir do plasma e o volume de distribuição diminuem, enquanto o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) no plasma e a área sob a concentração plasmática versus curva de tempo aumentam (Cattel, L. *et al.*, 2003; Gabizon, A. *et al.*, 2002).

A actividade farmacocinética e a biodistribuição das formulações lipossomais encapsulando fármacos são influenciadas pelo tamanho, composição lipídica, dose de fármaco, estabilidade e via de administração (Allen, T. M. e Cullis P. R., 2004). Os três requisitos fundamentais no desenvolvimento de uma formulação terapêutica bem-sucedida são: i) conhecimento claro da biologia e da fisiologia da doença a ser tratada, ii) compreensão das propriedades físico-químicas do transportador e do fármaco e iii) determinação das alterações farmacocinéticas e de biodistribuição induzidas pelo lipossoma como sistema de entrega de fármacos (Allen, T. M., 2003).

1.2.2.1) Formulações lipossomais de fármacos aprovadas para aplicação clínica

Na última década, os lipossomas estabeleceram-se como um sistema de entrega de fármacos para administração intravenosa e alguns já se encontram comercializados (Tabela IV). De destacar a primeira formulação lipossomal de um fármaco para PDT - Visudyne[®] (verteporfina) em 2000 para tratamento da degeneração da mácula relacionada com a idade. Em desenvolvimento encontra-se a formulação lipossomal de temoporfina (Foslip[®]), o mais recente fotossensibilizador de 3^a geração que, quando comparado à formulação não-lipossomal de temoporfina (Foscan[®]), apresenta elevada eficácia e baixa destruição ao nível dos tecidos saudáveis (Bovis, M. J. *et al.*, 2012).

Tabela IV – Formulações lipossomais de fármacos aprovadas para aplicação clínica. Adaptado de <http://www.fda.gov> (Maio, 2012) e <http://www.ema.europa.eu/ema/> (Maio, 2012).

Nome comercial	Substância activa	Empresa	Ano de comercialização	Indicação terapêutica
Abelcet [®]	Anfotericina B	Enzon	1995	Infecções fúngicas em doentes com sistema imunitário comprometido
AmBisome [®]		Astellas Pharma	1997	
Amphotec [®]		Three Rivers Pharms	1996	
DaunoXome [®]	Daunorrubicina	Diatos S.A	1995	Sarcoma de kaposi e cancro da mama
DepoCyt [®]	Citarabina	Pacira Pharmaceuticals Inc.	1999	Meningite linfomatosa
DepoDur [®]	Sulfato de morfina	Pacira Pharmaceuticals Inc.	2004	Anestésico
Doxil [®] (USA)	Daunorrubicina	Centocor Ortho Biotech	1995	Sarcoma de kaposi
Caelyx [®] (Europa)	Doxorrubicina.HCl	Schering Poulgh Europe	1996	Cancro da mama (metastático) Cancro dos ovários (avançado)
Myocet [®]	Doxorrubicina.HCl	Elan Pharma	2000	Metástases do cancro da mama (combinação c/ ciclofosfamida)
Visudyne [®]	Verteoporfina	QLT Inc./ Novartis	2000	Degeneração da mácula relacionada com a idade

1.2.2.2) Comportamento *in vivo*: lipossomas convencionais vs lipossomas estabilizados estereamente

Ao longo dos últimos anos, a aplicação de lipossomas como sistema de entrega de fármacos, tem sofrido alterações na estrutura base dos lipossomas possibilitando uma maior aplicação terapêutica, sendo também classificados quanto às características de interação com os sistemas biológicos (Torchilin, V. P., 2007).

Existem vários tipos de lipossomas: lipossomas convencionais, lipossomas estabilizados estereamente ou peguilados e lipossomas direccionados (Figura 10).

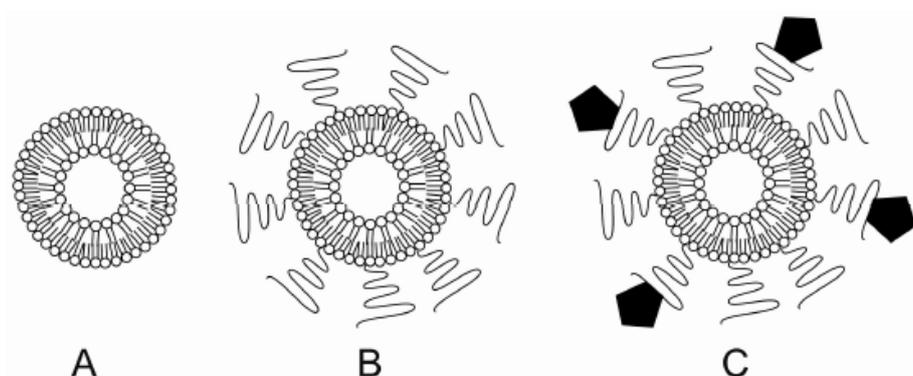


Figura 10 - Diferentes tipos de lipossomas: lipossomas convencionais (A), lipossomas estabilizados estereamente (B) e lipossomas direccionados (C). Imagem adaptada de Fretz Marjan, 2007.

Os lipossomas designados “convencionais”, constituídos apenas pela bicamada lipídica rodeando um núcleo central de natureza aquosa, estão longe de cumprirem os requisitos de sistema “ideal”. Estes lipossomas são reconhecidos pelo sistema fagocitário mononuclear, também conhecido como sistema retículo-endotelial e, são desprovidos, ao nível da superfície, de componentes susceptíveis de prolongar o tempo de circulação sanguínea ou de permitir um direcionamento e acumulação num alvo (Torchilin, V. P., 2000). No entanto, os lipossomas convencionais permitem encapsular fármacos hidrofílicos ou hidrofóbicos e proteger o organismo da toxicidade inerente a um fármaco livre (Derycke, A. S. L. *et al.*, 2004).

Os lipossomas estabilizados estereamente, também designados como lipossomas *Stealth*[®] demarcam-se dos lipossomas convencionais por possuírem à superfície moléculas que permitem aumentar o tempo de circulação dos lipossomas (Moreira, J. N., 2001). Este tipo de lipossomas são revestidos por componentes hidrofílicos como, por exemplo, o

poli(etilenoglicol) (PEG). Geralmente, para a constituição destes lipossomas “peguilados” recorre-se à incorporação na bicamada lipossomal do fosfolípido 1,2-distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) para formar o conjugado DSPE-PEG que se revela muito eficaz em diminuir a remoção pelo sistema fagocítico mononuclear (Moghimi, S. M. e Szebeni, J., 2003). A camada hidrofílica superficial do polímero PEG reduz as forças de Van der Waals atractivas entre os lipossomas e aumenta a repulsão, evitando a agregação dos mesmos. Adicionalmente permite o aumento do tempo de circulação dos lipossomas, para aproximadamente 45 horas em humanos, prevenindo o reconhecimento e conseqüente ligação com as opsoninas plasmáticas inibindo, deste modo, o processo de reconhecimento e a captura pelas células do sistema fagocitário mononuclear (Moghimi, S. M. e Szebeni, J., 2003; Fretz Marjan, 2007).

1.2.2.3) Direcçãoamento de lipossomas

Na tentativa de aumentar a especificidade de interacção dos lipossomas com as células alvo e aumentar a quantidade do fármaco libertado nessas células, a investigação actual foca-se no desenvolvimento de lipossomas direcctionados. Estes lipossomas recorrem a ligandos acoplados na superfície lipossomal, que conferem selectividade para distribuir preferencialmente o fármaco encapsulado para um local alvo. A superfície dos lipossomas pode ser modificada através da escolha de lípidos que permitam a conjugação com uma variedade de ligandos de reconhecimento como anticorpos (imunolipossomas), glicopeptídeos, polissacarídeos, proteínas virais e lectinas (Vladimir, P. T. *et al.*, 2005; Batista, C. M. *et al.*, 2007).

Os lipossomas como veículo transportador e de direcctionamento de fármacos anti-tumorais permitem usufruir do efeito aumentado de permeabilidade e retenção (EPR do inglês *enhanced permeability effect*) (Annelies, S. L. *et al.*, 2004). Os lipossomas unilamelares (SUVs e LUVs) ao serem vesículas pequenas (80-200 nm) permitem atingir uma acumulação significativa no tumor mediante extravasação a partir da vasculatura permeável do tumor (Torchilin, V. P., 2007).

No sentido de melhorar o efeito fotodinâmico de um composto fotossensibilizador (PS), surgiu uma nova estratégia de direcctionamento em terapia fotodinâmica (TPDT do inglês *targeted photodynamic therapy*) que promove o encapsulamento do PS de modo a minimizar obstáculos à sua aplicação clínica, nomeadamente ao nível da agregação,

solubilidade, internalização reduzida na célula, baixa selectividade para o tecido tumoral e biotransformação do PS desde a administração até ao alvo (Torchilin, V. P., 2007; Duncan, R. e Gaspar, R., 2011).

A estratégia de direccionamento em TPDT subdivide-se em dois tipos distintos: passivo e activo, do inglês *passive targeting* e *active targeting*, respectivamente (Figura 11). No *passive targeting*, a entrada do fármaco para o interior da célula tumoral é determinada por factores físicos dos transportadores tais como: composição, tamanho, propriedades da superfície e factores fisiopatológicos do organismo, microambiente do tumor, bem como a sua permeabilidade e retenção aumentados - efeito EPR. A vasculatura de um tecido tumoral distingue-se de um tecido saudável, pela maior permeabilidade devido a um maior espaçamento (600-800 nm) entre células endoteliais adjacentes. Este defeito arquitectónico vascular, juntamente com a dilatação dos vasos e com uma drenagem linfática reduzida, possibilita que fotossensibilizadores ligados a macromoléculas possam selectivamente acumular-se no interstício do tecido tumoral. O *active targeting* envolve a internalização celular do fármaco com reconhecimento específico por ligação a receptores sobre-expressos nas células tumorais ou a células endoteliais. O *active targeting* pode ser conseguido pelo acoplamento de ligandos directamente à superfície lipossomal ou à extremidade reactiva de PEG (Torchilin, V. P., 2007; Bugaj, A. M., 2011).

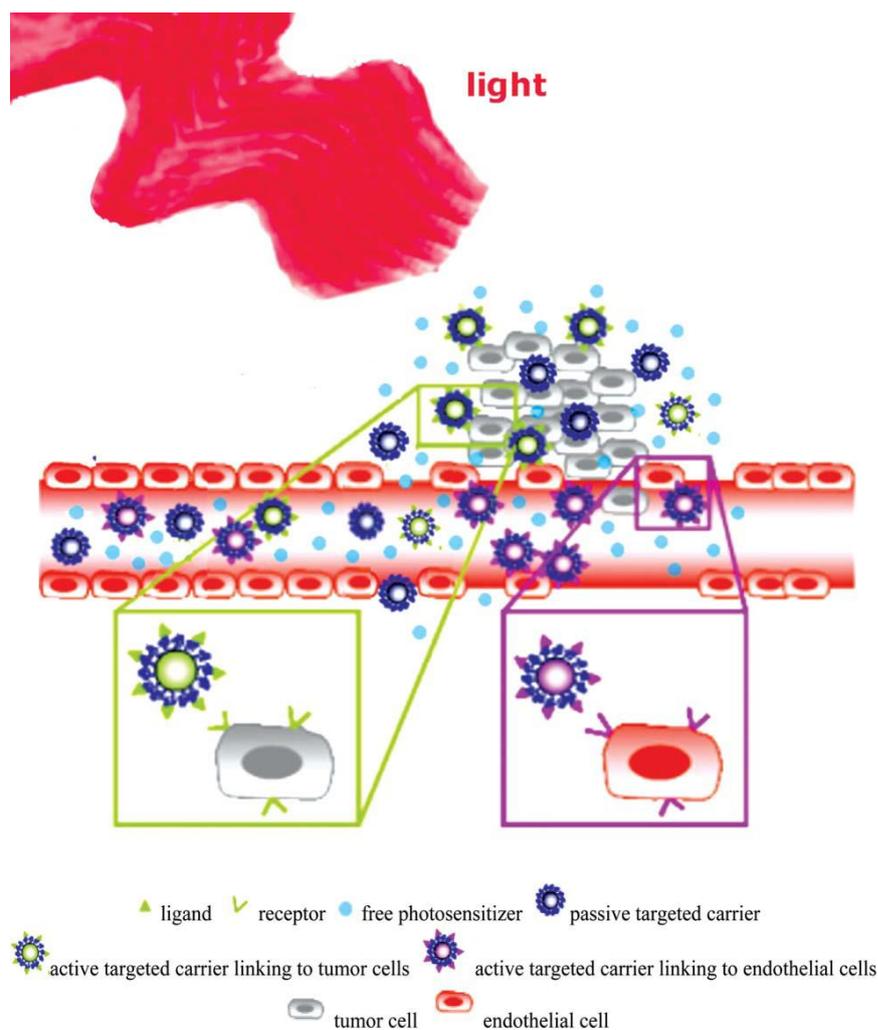


Figura 11 - Ilustração esquemática do direccionamento passivo e activo em Terapia Fotodinâmica direccionada (TPDT). Os fotossensibilizadores livres de ligandos podem atingir selectivamente as células tumorais através do efeito de permeabilidade e retenção (EPR) - direccionamento passivo. A presença de ligandos permite o direccionamento activo e maior acumulação por ligação dos ligandos aos receptores sobre-expressos nas células tumorais ou células endoteliais. Imagem retirada de Bugaj, A. M., 2011.

A escolha do ligando é crucial no desenvolvimento de um sistema direccionado de transporte de fármacos (Allen, T. M., 2003). O primeiro aspecto a ter em conta é a aplicação que se pretende e os potenciais alvos moleculares de direccionamento que são sobreexpressos nas células tumorais (Lasis, D. D., 1993). Esta estratégia requer a selecção de ligandos desprovidos de toxicidade e imunogenicidade, que garantam a estabilidade dos lipossomas e sejam acessíveis ao receptor na membrana da célula alvo. Adicionalmente, o acoplamento do ligando deve manter os perfis farmacocinético e de biodistribuição dos lipossomas (Allen, T. M., 2003).

A selecção de um ligando: anticorpo ou uma molécula agonista de receptor engloba vários factores. As moléculas agonistas de receptores são menos dispendiosas e mais fáceis de obter e manusear contudo são, em geral, ligandos menos específicos pois, de uma maneira geral, todas as células expressam os receptores, embora sejam sobre-expressos no caso das células tumorais. Alguns ligandos agonistas de receptores existem livres na circulação sanguínea (ex: transferrina) ou fazem parte da dieta (ex: folato) e vão competir pela ligação ao alvo molecular. O uso de anticorpos apresenta problemas de imunogenicidade, estabilidade, armazenamento e custo elevado (Vladimir, P. T. *et al.*, 2005; Batista, C. M. *et al.*, 2007).

1.2.2.3.1) Direcção de lipossomas mediado por transferrina

Até ao momento, a transferrina é o ligando melhor caracterizado e que proporciona um mecanismo de associação celular bastante eficiente. Esta proteína ligante de ferro activa o seu receptor na superfície membranar das células (Li, H. e Qian, Z. M., 2002).

A expressão dos receptores de transferrina (TrfR) está associada com a taxa de proliferação da célula dada a necessidade de ferro durante o processo de divisão celular. Assim, células com elevada taxa de proliferação expressam um maior número de receptores de transferrina. Uma vez que as células tumorais apresentam um elevado potencial proliferativo, o TrfR encontra-se sobreexpresso na superfície celular (Li, H. e Qian, Z. M., 2002).

A transferrina, sendo uma proteína produzida no corpo humano não apresenta imunogenicidade e possui elevada afinidade pelo receptor. Adicionalmente pode ser acoplada a lipossomas (ou outra nanopartícula) sem perder a capacidade de ligação ao receptor ou diminuir a sua actividade biológica (Anabousi, S. *et al.*, 2006).

Existem vários mecanismos de interacção dos lipossomas com as células. A interacção pode acontecer por adsorção, transferência inter-membranar ou libertação por contacto. A interacção mais relevante para o uso de lipossomas como sistemas de entrega de fármacos é a endocitose, sendo este o mecanismo com maior taxa de ocorrência *in vivo* (Allen T. M., 2003).

Os receptores de transferrina sobreexpressos em células tumorais medeiam o mecanismo de endocitose do lipossoma vectorizado com transferrina contendo o fármaco encapsulado, possibilitando assim uma maior eficácia de internalização. Na referida endocitose, a internalização dos lipossomas ocorre por invaginação membranar e formação do endossoma (Nie, S. *et al.*, 2007) (Figura 12).

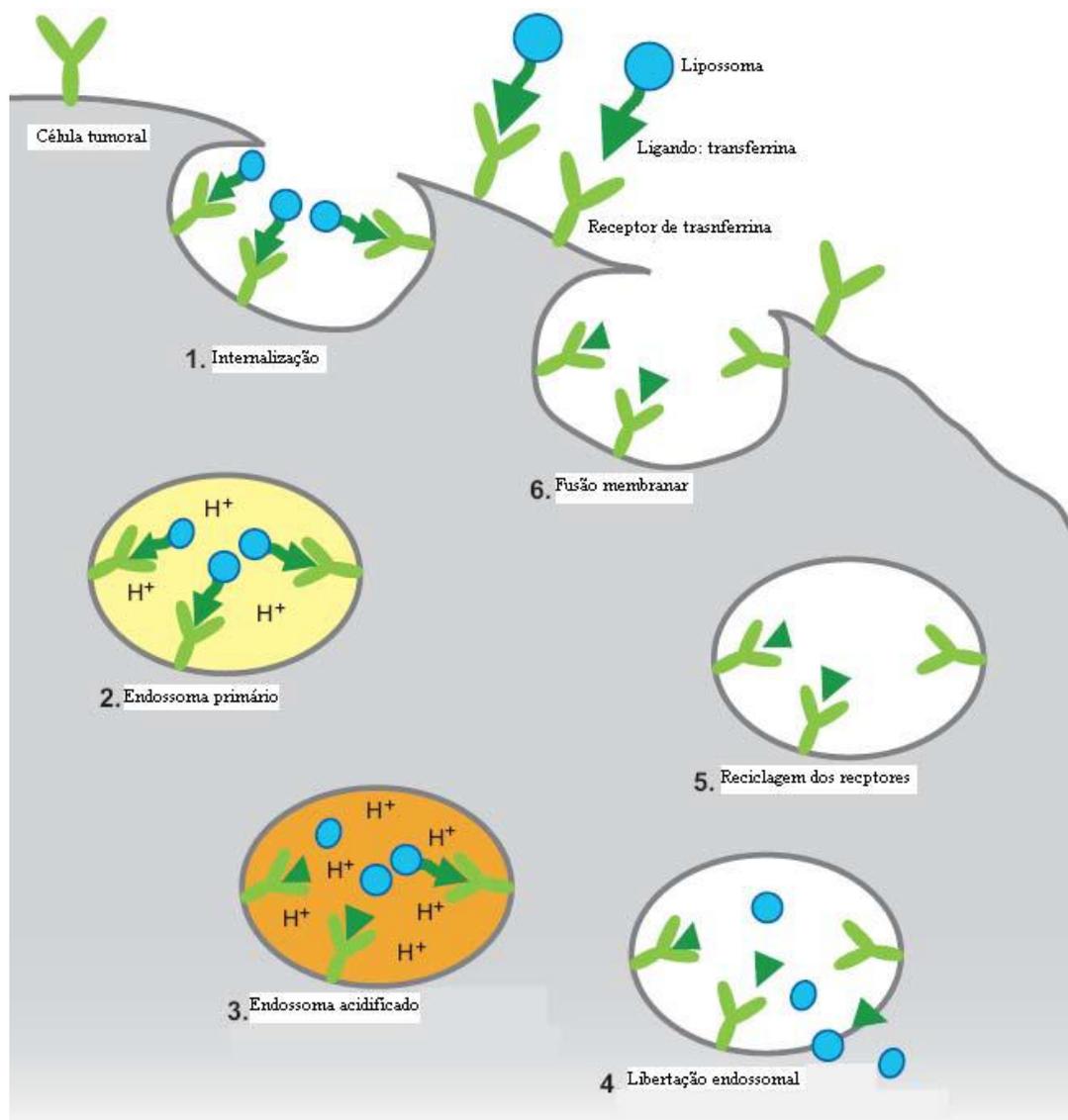


Figura 12 - Ilustração esquemática da internalização de lipossomas vectorizados com transferrina por endocitose mediada pelos respectivos receptores. A transferrina acoplada aos lipossomas interage com os receptores da transferrina sobreexpressos na célula tumoral (1). A ligação do receptor de transferrina ao lipossoma promove a internalização numa vesícula endossômica (2), cujo lúmen acidifica (3). A acidificação induz a libertação endossomal do fármaco para o citoplasma (4). Os receptores de transferrina são reciclados e repostos na membrana por um processo de fusão membranar (5 e 6), podendo ser activados por novos lipossomas vectorizados com transferrina. Imagem adaptada de Nie, S. *et al.*, 2007.

O percurso do endossoma no citoplasma depende do tipo de processo endocítico estimulado, podendo ser fagocitose ou endocitose mediada por receptor. No caso de se tratar de fagocitose, o endossoma faz parte de uma via de degradação e ocorre o aprisionamento do fármaco na via digestiva de exocitose citoplasmática. O destino do endossoma na endocitose

depende do tipo de receptor membranar estimulado e permite a libertação do fármaco espacialmente mais próximo do núcleo celular (Allen, T. M., 2003).

A reciclagem natural dos TrfR permite que a entrada de lipossomas vectorizados aconteça em maior escala uma vez que não é necessária a síntese de novos receptores. Desde modo, o mesmo receptor pode ser usado várias vezes para favorecer a internalização de um maior volume de lipossomas, sendo esta uma vantagem da transferrina face a outros ligandos activadores de receptores (Li, H. e Qian, Z. M., 2002).

O acoplamento da transferrina à superfície lipossomal pode ser alcançado por reacção com grupos modificados na extremidade do polímero PEG (Roberts, M. J. *et al.*, 2002). O uso de lípidos modificados com PEG reactivo a cisteínas cria uma ligação tioéster entre o grupo reactivo na superfície do lipossoma e a proteína. No caso da transferrina é necessário conferir um grupo tiol (SH) na superfície da proteína para que o acoplamento seja possível (Veronese, F. M., 2001) (Figura 13).

Estudos mostraram que estes receptores são expressos significativamente em células alveolares brônquicas e que células de cancro de pulmão (A549) apresentavam um maior nível de expressão de TrfR comparativamente a células epiteliais alveolares saudáveis. Estes estudos também revelaram que os níveis elevados de expressão de TrfR apresentavam boa correlação com uma maior captação de Trf-lipossomas e aumento dos níveis de citotoxicidade (Anabousi, S. *et al.*, 2006).

Perante os factos acima mencionados, a transferrina foi o ligando seleccionado para o desenvolvimento de novas formulações lipossomais vectorizadas.

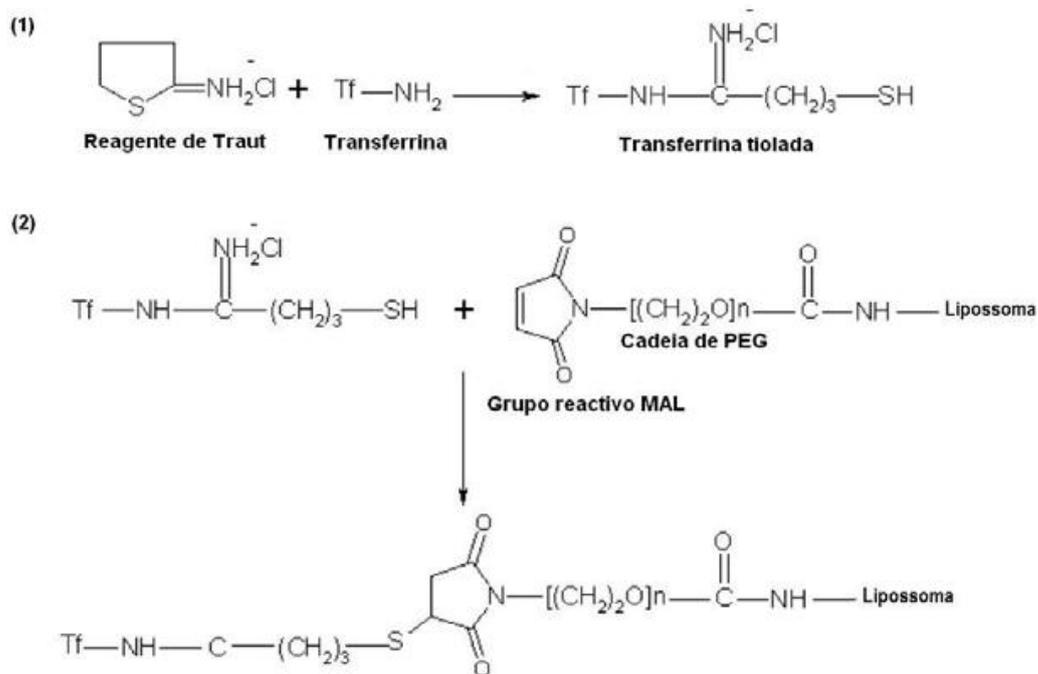


Figura 13 - Ilustração esquemática da reacção de acoplamento da transferrina ao lípido DSPE-PEG-(MAL) incorporado na bicamada membranar do lipossoma. Como a transferrina não possui grupos tiol (SH) à superfície, é necessário que ocorra uma reacção prévia de tiolação (1). O grupo reactivo maleimido (MAL) reage com o grupo tiol na transferrina tiolada formando uma ligação estável entre o ligando e o lipossoma (2). Imagem adaptada de Anabousi, S. *et al.*, 2005.

1.2.2.4) Métodos de preparação de formulações lipossomais

Um pré-requisito para o uso de lipossomas como veículos transportadores de fármacos é a utilização de métodos que permitam o controlo de factores como preparação, tamanho das vesículas, composição, estabilidade e eficácia de encapsulação de fármacos, uma vez que estes factores influenciam directamente o comportamento dos lipossomas *in vivo* (Lasic, D. D. e Papahadjopoulos, D., 1998).

O método de preparação de lipossomas mais usado é o método de hidratação do filme lipídico e será este o método utilizado na presente tese (Figura 14). Outros métodos de preparação de lipossomas não serão abordados pois encontram-se fora do âmbito deste trabalho.

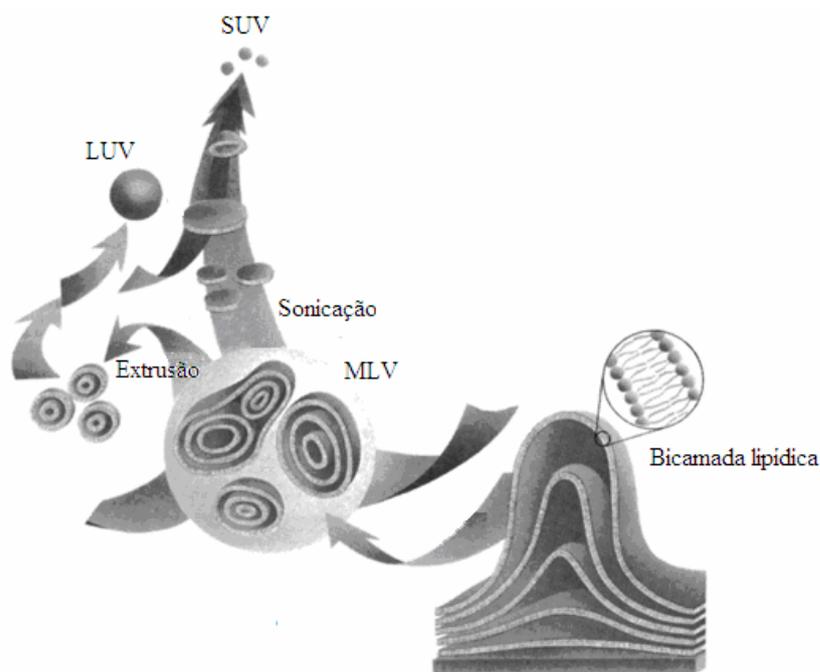


Figura 14 - Ilustração esquemática da preparação de lipossomas segundo o método de hidratação do filme lipídico. Imagem adaptada de www.avantilipids.com (2012).

Neste método, os lípidos seleccionados são dissolvidos num solvente orgânico ou mistura de solventes suficientemente volátil, seguido da evaporação do(s) solvente(s) com consequente formação de um filme lipídico que será posteriormente hidratado. A hidratação será efectuada com uma solução aquosa sob agitação magnética vigorosa, promovendo, assim, a formação de lipossomas multilamelares (MLVs do inglês *multilamellar vesicles*). Após a obtenção de MLVs, diferentes métodos são utilizados para produzir dispersões homogêneas de SUVs (do inglês *small unilamellar vesicles* ou LUVs (do inglês *large unilamellar vesicles*), podendo utilizar-se processos mecânicos, electrostáticos ou químicos. Os mais frequentes são os processos mecânicos, em que estão incluídos: extrusão através de membranas de policarbonato com diferentes porosidades, prensa de French ou uso de homogeneizador e a sonicação.

Os lipossomas do tipo SUVs e LUVs também podem ser preparados por métodos mais recentes como o método de injeção de etanol ou éter (Jesorka, A. e Orwar, O. 2008; Samad, A. *et al.*, 2007) mas estes métodos não serão abordados pois encontram-se fora do âmbito da presente tese.

1.2.2.5) Encapsulação de fármacos em formulações lipossomais

De acordo com a literatura é possível distinguir dois mecanismos de incorporação de fármacos em lipossomas: a encapsulação passiva e a encapsulação activa (do inglês *remote loading*).

A encapsulação passiva é aplicável a fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos, sendo o fármaco previamente dissolvido juntamente com os lipídios no caso de apresentar carácter hidrofóbico ou hidratado o filme lipídico com uma solução aquosa do fármaco quando este apresenta características hidrofílicas. A formação espontânea dos lipossomas, por agitação mecânica vigorosa, por exemplo, captura passivamente o fármaco dissolvido, no entanto a maior desvantagem deste método é a reduzida eficácia de encapsulação para os dois tipos de fármacos (Daniel, A. B. e Godbey, W. T., 2011).

A encapsulação activa tira partido do facto de alguns fármacos como, por exemplo, a doxorubicina, poderem existir tanto na forma carregada como neutra, dependendo do pH. O fármaco é adicionado a lipossomas pré-formados e, na forma neutra, permeia a membrana à custa de um gradiente crescente (do exterior para o interior lipossomal) de iões H^+ (gradiente de pH) ou de um ião capaz de gerar um gradiente de pH, como por exemplo sulfato de amónio ou sulfato de magnésio. Este método apresenta diversas vantagens face à encapsulação passiva, entre as quais, obtenção de elevadas eficácias de encapsulação (90-100%), possibilidade de encapsular o fármaco imediatamente antes da utilização e maior estabilidade, em armazenamento e meio biológico, em termos de retenção de fármaco (Daniel, A. B. e Godbey, W. T., 2011).

Uma vez que a bacterioclorina utilizada neste projecto apresenta um carácter marcadamente hidrofóbico, um elevado peso molecular (1135 g/mol) e um coeficiente de partição octanol/água de 2.7, o método de encapsulação teve de ser necessariamente o passivo.

1.3) Objectivos

O projecto descrito na presente tese teve como principal objectivo o desenvolvimento de uma formulação lipossomal vectorizada com transferrina, encapsulando uma molécula fotossensibilizadora (bacterioclorina), que apresentasse elevados parâmetros de encapsulação e que demonstrasse propriedades físico-químicas compatíveis com uma futura aplicação intravenosa em terapia fotodinâmica (PDT). Neste sentido foram realizados diferentes estudos experimentais com os seguintes objectivos específicos:

- i) Desenvolver diferentes formulações lipossomais de uma molécula fotossensibilizadora (bacterioclorina e numa fase final p-THPP) com diferentes composições lipídicas, diferentes rácios fármaco/lípido e diferentes condições experimentais no método de preparação dos lipossomas.
- ii) Caracterizar físico-quimicamente as formulações lipossomais desenvolvidas em termos de diâmetro médio e parâmetros de encapsulação (eficácia de encapsulação e capacidade de carga (*loading*)).
- iii) Realizar estudos de associação celular das formulações lipossomais desenvolvidas e vectorizadas com transferrina com as células de cancro do pulmão (A549) e avaliar os resultados obtidos por microscopia de fluorescência.

Em suma, tendo por base a realização do plano de actividades acima enunciado, pretende-se avaliar o potencial de desenvolver uma formulação lipossomal vectorizada com transferrina e encapsulando uma molécula fotossensibilizadora para futura aplicação intravenosa em terapia fotodinâmica (PDT) no tratamento do cancro do pulmão.

Capítulo 2:

Materiais e métodos

2.1) Materiais

A molécula fotossensibilizadora utilizada neste trabalho foi uma bacterioclorina fornecida pela Luzitin SA (Coimbra, Portugal). Esta bacterioclorina caracteriza-se como sendo uma molécula marcadamente hidrofóbica, com um coeficiente de partição octanol/água de 2.7, um peso molecular de 1135 g/mol. Adicionalmente revela sensibilidade à luz, ao oxigénio e à humidade.

Os lípidos diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) e diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG) foram adquiridos em estado sólido à Lipoid[®] (Darmstad, Alemanha), enquanto que o lípido 1,2-distearoilfosfatidiletanolamina maleimido-(poli(etilenoglicol)-2000) (DSPE-PEG-(MAL)) foi adquirido à Avanti Polar Lipids (Alabaster, LA, EUA). A holo-transferrina humana (Trf) foi adquirida em pó à AppliChem[®] (Darmstadt, Alemanha) e o reagente de tioração 2-iminotiolano em pó (2-IT), juntamente com o kit do método do ácido bicinónico (BCA), foram adquiridos à Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, MO, EUA). Os géis Sephadex[®] G-50, Sepharose[®] (CL-4B) foram fornecidos pela Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, MO, EUA). O dihidrogenofosfato de potássio e o ácido perclórico 70% foram fornecidos pela Panreac[®] (Barcelona, Espanha). As membranas de policarbonato, usadas durante a extrusão, foram adquiridas à Avestin[®] (Ottawa, Canadá). A água ultra-pura utilizada provém de um sistema interno e é recolhida num equipamento apropriado (ELGA Process Water, Marlow, Reino Unido). Os restantes reagentes utilizados foram fornecidos pela Merck[®] (Darmstadt, Alemanha).

A linha celular A549 (células de adenocarcinoma do pulmão humano) foi utilizada mediante descongelamento de vials previamente congelados pela Bluepharma, Indústria Farmacêutica SA e armazenados em contentores de azoto líquido no Centro de Neurociências e Biologia Celular (Coimbra, Portugal).

2.2) Métodos

2.2.1) Desenvolvimento de formulações lipossomais encapsulando a bacterioclorina

Todas as etapas experimentais que envolveram a molécula fotossensibilizadora foram realizadas em condições de baixa luminosidade, uma vez que a molécula é activada na presença de luz e, ao produzir oxigénio singuleto, provoca destruição da bicamada dos lipossomas por peroxidação. A temperatura também foi um parâmetro igualmente controlado uma vez que tanto a molécula fornecida no estado sólido como a respectiva solução *stock* em clorofórmio, foram armazenadas a -20°C sob atmosfera de azoto.

A preparação dos lipossomas foi realizada à temperatura de 65°C (cerca de 10°C mais elevada que a maior temperatura de transição de fase (T_m) exibida pelos lípidos presentes). A T_m corresponde à temperatura necessária para induzir a mudança no estado físico dos lípidos de uma fase gel ordenada (fase sólida), que se caracteriza pela extensão completa das cadeias acil, para uma fase líquida desordenada, em que as cadeias carbonadas apresentam maior fluidez e desorientação.

2.2.1.1) Preparação dos lipossomas unilamelares

De modo a alcançar o objectivo do presente trabalho, inicialmente foram desenvolvidas diferentes formulações lipossomais da molécula fotossensibilizadora na ausência de PEG (denominadas convencionais) com diferentes composições lipídicas, em diferentes concentrações de lípido inicial e diferentes razões molares de fármaco/lípido. Após seleccionar a formulação convencional com base numa extrusão bem sucedida e na obtenção de parâmetros de encapsulação satisfatórios, procurou-se desenvolver uma nova formulação, incluindo o fosfolípido DSPE-PEG-(MAL) conjugado com transferrina e direccionada para os respectivos receptores.

Para todas as formulações desenvolvidas, o método de preparação de lipossomas utilizado foi o método de hidratação do filme lipídico, em que volumes adequados das soluções *stock* de lípidos (100 mM) em clorofórmio foram misturados, dependendo da concentração de lípido pretendida. Como a molécula tem um carácter marcadamente hidrofóbico, a sua encapsulação em lipossomas teve de ser necessariamente passiva, ou seja,

o volume de fármaco (relativo à concentração de fármaco inicial pretendida) foi retirado da solução *stock* em metanol (2 mM) e misturado com a solução dos lípidos. De seguida, essa mistura foi homogeneizada por agitação no vórtex e procedeu-se à formação do filme lipídico por evaporação dos solventes orgânicos no evaporador rotativo (Heidolph Laborata 4003, Schwabach, Alemanha) num banho de água termostaticado a 65°C durante o tempo necessário à evaporação total dos solventes.

Seguidamente, o filme lipídico preparado num balão de vidro foi hidratado com uma solução tampão HBS (do inglês *HEPES-buffered saline*) (10 mM HEPES/140 mM NaCl, pH 7,4) no banho de água do evaporador rotativo a 65°C sob agitação, até se obter uma emulsão homogénea de lipossomas multilamelares (MLVs). No caso da formulação lipossomal DSPC:DSPG:DSPE-PEG-(MAL), a hidratação foi realizada com solução tampão HBS pH 6,5, uma vez que se trata do valor de pH ao qual o grupo maleimido demonstra óptima reactividade para acoplamento de ligandos (Anabousi, S. *et al.*, 2005).

As suspensões de MLVs foram sujeitas a centrifugações de baixa rotação (500 rpm, durante 1 minuto) com o objectivo de remover a maioria do fármaco não-encapsulado nos lipossomas. O número de centrifugações realizadas foi decidido com base na observação visual da amostra.

Para a obtenção de lipossomas unilamelares a partir de MLVs, procedeu-se à extrusão das vesículas (extrusor da Avanti Polar Lipids[®], Alabaster, AL, EUA) através de membranas de policarbonato com diâmetro de poro de 0,2 µm. O equipamento foi previamente aquecido ligeiramente acima de 65°C e lavado, juntamente com os seus filtros e membranas, com água ultrapura também aquecida. Em certas ocasiões procedeu-se à extrusão preliminar dos MLVs através de membranas de policarbonato de diâmetro de poro de 0,4 µm e só depois através de 0,2 µm.

2.2.1.2) Tioação do ligando transferrina e condições de acoplamento

O acoplamento do ligando transferrina exigiu uma reacção prévia de tioação de modo a que a proteína adquirisse grupos tiol com capacidade reactiva e ligasse covalentemente ao grupo maleimido da extremidade distal do fosfolípido DSPE-PEG-(MAL) incluído na membrana do lipossoma. A reacção de acoplamento da proteína tiolada ao grupo maleimido ocorreu com a formação de uma ligação tioéster.

Numa atmosfera inerte, à temperatura ambiente e com protecção da luz, quer a transferrina quer o reagente 2-iminotiolano foram preparados em solução tampão HBS (pH

8,0), imediatamente antes da respectiva mistura para ocorrer tiolação (Veronese, F. M., 2001). A incubação foi realizada na razão molar 1:10 (transferrina:2-iminotiolano) durante 1 hora sob agitação magnética, à temperatura ambiente e com protecção da luz. Após o procedimento de tiolação, procedeu-se ao acoplamento da transferrina tiolada com os lipossomas de composição DSPC:DSPG:DSPE-PEG-(MAL) na razão molar 1:1 (MAL:Trf). A mistura foi colocada a 37°C, sob agitação ligeira, durante a noite, com protecção da luz e em atmosfera inerte de azoto. No dia seguinte, com agitação ligeira e protecção da luz durante 30 minutos, inactivaram-se os grupos maleimido que não reagiram, através da incubação com 50 µL do agente redutor β-mercaptoetanol, na razão molar 1:5 (DSPE-PEG-(MAL):β-mercaptoetanol) (Fonseca, C. *et al.*, 2006). Esta inactivação evitou a ocorrência de interacções não específicas entre os lipossomas e as células (Anabousi, S. *et al.*, 2005).

Adicionalmente foram desenvolvidos em simultâneo lipossomas com a composição DSPC:DSPG:DSPE-PEG-(MAL), a partir do mesmo filme lipídico, mas não se realizou o acoplamento da transferrina. Estes lipossomas controlo diferenciaram-se dos direccionados com transferrina pois foram incubados na razão molar 1:1 com solução tampão HBS (pH 8,0) em vez de transferrina tiolada. Após a incubação com HBS, os grupos maleimido dos lipossomas controlo foram igualmente inactivados com β-mercaptoetanol.

No sentido de remover todos os compostos que participaram em todo o processo de desenvolvimento (transferrina tiolada não acoplada, fármaco não encapsulado e β-mercaptoetanol), os lipossomas direccionados com transferrina foram submetidos a uma cromatografia de exclusão molecular numa coluna de dimensões 1x7 cm preenchida com Sepharose[®] CL-4B e equilibrada com solução tampão HBS (pH 7,4). O gel Sepharose[®] CL-4B é reconhecido como sendo o mais adequado para uma cromatografia de exclusão molecular na presença de proteínas. Pelo contrário, dada a ausência de transferrina nos lipossomas controlo, estes foram submetidos à mesma cromatografia numa coluna de dimensões 1x7 cm mas preenchida com Sephadex[®] G-50, equilibrada igualmente com solução tampão HBS (pH 7,4) (Fonseca, C. *et al.*, 2006).

2.2.2) Caracterização das formulações lipossomais encapsulando a bacterioclorina

A caracterização das formulações lipossomais encapsulando a molécula fotossensibilizadora foi realizada mediante a determinação do diâmetro médio dos lipossomas e a distribuição dos tamanhos, da eficácia de acoplamento do ligando, do rácio final fármaco/lípido (capacidade de carga, denominada por *loading* em inglês) e da eficácia de encapsulação (%).

2.2.2.1) Determinação do diâmetro médio e do índice de polidispersão

O diâmetro médio dos lipossomas assim como a sua homogeneidade de distribuição de tamanho foram determinados por espectroscopia de correlação fotónica (PCS do inglês *Photon Correlation Spectroscopy*). Segundo este método, os diâmetros são determinados através da medição da dispersão provocada numa radiação laser incidente por parte das vesículas em suspensão. Uma vez que estas não são estáticas (possuem movimento Browniano), a difracção da luz ao longo do tempo varia em função do coeficiente de difusão (D) do meio de dispersão. Assim, as variações da intensidade da difracção da luz são tanto mais rápidas quanto menores forem as vesículas em suspensão. O coeficiente de difusão pode ser determinado analisando dados a diferentes tempos de amostragem. A partir destes dados e, juntamente com os da temperatura absoluta (T) e da viscosidade do meio (μ), é possível determinar o raio hidrodinâmico (R) das vesículas, através da equação de Stokes-Einstein: $D = KT / 6\pi\mu r$, em que K é a constante de Boltzmann, T a temperatura da solução, μ é a viscosidade do solvente e r o raio hidrodinâmico (Fonseca, C., 2006).

Diluiu-se 7 μ L de suspensão de lipossomas em 3 mL de NaCl 0,9% previamente filtrado com um filtro de nylon 0,45 μ m (VWR[®], Buffalo Grove, EUA) de forma a minimizar a presença de contaminantes. A análise foi realizada num espectrofotómetro (Beckman Coulter N4 Plus, Fullerton, CA) e a leitura foi efectuada num ângulo de 90° e à temperatura ambiente.

2.2.2.2) Determinação do rácio final fármaco/lípido

O rácio final fármaco/lípido também denominado capacidade de carga, consiste no quociente entre a concentração de fármaco final (mM) e a concentração de lípido final (mM) (Equação 1). A concentração de lípido final é igual à concentração de fosfato inorgânico (determinada pelo método de Bartlett) e a concentração de fármaco final foi determinada por espectroscopia UV/VIS.

$$\text{Capacidade de carga} = \frac{\text{concentração de fármaco final}}{\text{concentração de lípido final}} \quad (\text{Equação 1})$$

2.2.2.2.1) Ensaio de quantificação de fosfato inorgânico

Para determinar a concentração de fosfato inorgânico presente nas formulações recorreu-se a um procedimento adaptado do método de Bartlett (Bartlett, G. R., 1959), que se baseia numa análise colorimétrica que permite quantificar fosfato inorgânico na amostra. Este método caracteriza-se por uma elevada sensibilidade e baixo custo. Neste ensaio, procedeu-se à hidrólise ácida de 30 µL de suspensão de lipossomas com 0,5 mL de ácido perclórico a 70% durante 20 minutos, em banho de areia previamente aquecido a uma temperatura aproximada de 200°C.

Posteriormente, procedeu-se à conversão do fosfato inorgânico presente na amostra a ácido fosfomolibdico por adição de 4,5 mL de reagente de molibdato de amónio (molibdato de amónio a 0,22% em ácido sulfúrico a 2%). Após agitação em vórtex e por adição de 0,2 mL de reagente de Fiske e Subarrow (15% em bissulfito de sódio, 0,5% em sulfito de sódio e 0,25% em ácido 1-amino-2-naftil-4-sulfónico), o ácido fosfomolibdico foi reduzido a azul de molibdénio. A reacção de redução foi potenciada por incubação dos tubos em banho de água fervente durante 15 minutos. Após arrefecimento, a intensidade da cor azul das soluções foi sujeita a uma análise espectrofotométrica (espectrofotómetro Shimadzu® UV-160, Maryland, EUA) sendo a intensidade da cor proporcional à quantidade de fosfato inorgânico presente na amostra.

A determinação da concentração de fosfato inorgânico total nas amostras foi realizada em triplicado com base numa curva padrão elaborada com volumes crescentes de solução padrão de fosfato (0, 25, 50, 100, 200 e 300 µL de KH₂PO₄ 0,65 mM) sujeita às mesmas condições experimentais que as amostras.

2.2.2.2.2) Ensaio de quantificação do fármaco

A quantificação da bacterioclorina encapsulada foi realizada por espectroscopia UV/VIS (espectrofotómetro Shimadzu® UV-160, Maryland, EUA) a um comprimento de onda correspondente à absorvância máxima (344 nm). Este comprimento de onda foi previamente determinado a partir do espectro individual da molécula traçado nas mesmas condições experimentais às quais o ensaio iria decorrer. Um pequeno volume da suspensão de lipossomas (ex. 100 µL) foi sujeito a um tratamento com 2,4 mL de metanol de forma a libertar para o meio o fármaco encapsulado e os fosfolípidos não interferirem nas medições de absorvância. A concentração de fármaco foi determinada a partir de uma curva de calibração previamente estabelecida a partir de soluções de concentração conhecida.

2.2.2.3) Determinação da eficácia de encapsulação (E.E)

A eficácia de encapsulação (E.E) consiste na razão da concentração de fármaco final pela concentração de lípido final (após a cromatografia de exclusão molecular) a dividir pela razão da concentração de fármaco inicial pela concentração de lípido inicial, expresso em percentagem (Equação 2).

$$E. E = \frac{[fármaco]_{final}/[lípido]_{final}}{[fármaco]_{inicial}/[lípido]_{inicial}} \times 100$$

(Equação 2)

2.2.2.4) Determinação da eficácia de acoplamento (E.A) da transferrina

2.2.2.4.1) Ensaio de quantificação de transferrina acoplada aos lipossomas

Para determinar a massa de transferrina acoplada aos lipossomas, de forma a quantificar posteriormente a E.A, recorreu-se ao método do ácido bicinconínico (BCA do inglês *bicinchoninic acid*). Trata-se de um método colorimétrico para detecção e quantificação de proteína total. Este método consiste da redução do Cu^{2+} a Cu^{+} na presença de proteínas em meio alcalino, seguindo-se a complexação entre duas moléculas de BCA e o ião Cu^{+} o que leva à formação de complexos BCA- Cu^{+} azul-violeta com valores de absorvância entre os 540-590 nm, sendo que a absorção máxima se verifica aos 562 nm. A redução do ião cobre é proporcional à quantidade de proteína presente.

A absorvância foi determinada em placas de 96 poços (Corning[®], Nova Iorque, EUA) contendo 25 µL de lipossomas direccionados com transferrina/poço e 200 µL do reagente de trabalho/poço. O reagente de trabalho foi preparado imediatamente antes da sua aplicação pela mistura do reagente A (com ácido bicinconínico) e do reagente B (com 4% (m/v) de sulfato de cobre II penta-hidratado), na proporção de 50:1 (reagente A: reagente B). Após uma incubação com duração de 30 minutos a 37°C, a absorvância foi determinada a 540 nm (leitor de placas ThermoLabosystem Multiskan[®], Califórnia, EUA).

A quantificação de transferrina acoplada foi feita com base na curva padrão preparada, em triplicado, compreendendo 15 µL de diferentes concentrações (0, 100, 150, 400, 600 e 900 µg/mL) de albumina bovina sérica (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) e 200 µL do reagente de trabalho/poço.

A eficácia do processo de acoplamento da transferrina aos lipossomas (E.A) foi calculada com base na razão entre a massa de transferrina (µg) por quantidade de fosfolípido final (µmol) (Equação 3), após os ensaios de quantificação de proteína e de fosfato inorgânico, respectivamente.

$$E. A = \frac{\text{massa de transferrina } (\mu\text{g})}{\text{quantidade de fosfolípido final } (\mu\text{mol})}$$

(Equação 3)

2.2.3) Cultura da linha celular de cancro de pulmão (A549)

A linha celular humana de adenocarcinoma do pulmão (A549) foi fornecida pelo Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC) (Coimbra, Portugal). Ao nível morfológico, as células A549 são células epiteliais alveolares basais e caracterizam-se como aderentes no que diz respeito às suas propriedades de crescimento (ATCC[®], Manassas, VA, EUA).

A linha celular foi mantida em monocamada em frascos estéreis de cultura de 75 cm² (Orange Scientific[®], Braine-l'Alleud, Bélgica) em condições propícias a um crescimento exponencial: meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, EUA) enriquecido com 10% (v/v) de soro bovino fetal (FBS) (Lonza[®], Basileia, Suíça) previamente inativado por calor (30 minutos a 56°C), e mistura de antibióticos (penicilina e estreptomicina a 100 mg/mL) (Lonza[®], Basileia, Suíça). As células foram mantidas numa incubadora (Binder[®] CB 150, Nova Jersey, EUA), em atmosfera humidificada (95%) com 5% de dióxido de carbono a 37°C. A viabilidade e o crescimento

exponencial da linha celular foram mantidos com destacamento das células a cada 2/3 dias, por incubação (10 minutos a 37°C) com EDTA-versene (Lonza[®], Basileia, Suíça) e diluição de um pequeno volume de células em novo meio de cultura. O destacamento foi realizado com EDTA-versene e não com tripsina de modo a não comprometer a integridade dos receptores membranares de transferrina presentes nas células.

2.2.4) Identificação de receptores de transferrina (TrfR) na linha celular A549 por citometria de fluxo

Com o intuito de potenciar a internalização celular mediada por receptores, desenvolveu-se uma formulação lipossomal direccionada com transferrina e, nesta perspectiva, confirmar a presença e densidade dos receptores da transferrina à superfície das células A549 foi um passo crucial para os estudos posteriores de associação celular.

O ensaio foi realizado na Unidade de Citometria de Fluxo do CNC, por reconhecimento directo com um anticorpo monoclonal específico para o receptor de transferrina humana conjugado com a sonda fluorescente isotiocianato de fluoresceína antiCD71-FITC (BD Pharmingen[®], BD Biosciences[®], San Diego, CA, EUA).

A citometria de fluxo é uma técnica que permite uma análise rápida dos parâmetros celulares, como o tamanho e a complexidade, quando as células se encontram suspensas num meio líquido e orientadas num fluxo laminar. Embora as células sejam más condutoras de energia, quando se encontram imersas num meio condutor, podem ser contadas e medidas a partir dos impulsos eléctricos que geram, passando individualmente através de um feixe de luz, onde a luz é dispersa de uma forma específica e a sonda fluorescente é excitada.

As células A549 (na densidade 1×10^6 células viáveis /100 μL de PBS (do inglês *phosphate buffered saline*) foram incubadas com 10 μL do anticorpo antiCD71-FITC durante 10 minutos, mediante protecção de luz e à temperatura ambiente (Fonseca C., 2006). Após a incubação, procedeu-se a uma centrifugação (800 rpm durante 5 minutos) para retirar o excesso de anticorpo e ressuspendeu-se o sedimento em 500 μL de PBS (pH 7,4). A intensidade média de fluorescência associada às células foi monitorizada por análise no citómetro de fluxo (BD FACSCalibur, BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica) com os seguintes comprimentos de onda: 490 nm de excitação e 520 nm de emissão. Os níveis de fluorescência foram comparados com os do controlo que consistia em células A549 sem incubação com o anticorpo

2.2.5) Estudos de associação celular

Com o objectivo de determinar se o acoplamento covalente da transferrina na formulação lipossomal promovia uma maior internalização dos lipossomas nas células tumorais A549, foram realizados ensaios *in vitro* de associação celular seguidos de monitorização com a técnica de espectroscopia de fluorescência.

A linha celular A549 foi semeada em placas de 48 poços (Corning, EUA), numa densidade de 5×10^4 células/mL e incubadas durante 24 horas para adesão celular. Os lipossomas foram previamente submetidos a uma filtração estéril com filtros 0,2 μm (Acrodisc[®], Gaithersburg, MD, EUA) e realizada numa câmara de fluxo laminar vertical (Polaris 48 Steril, Reino Unido).

Após adesão celular, procedeu-se à substituição do meio de incubação por 200 μL da formulação lipossomal, diluída em meio de cultura completo. As células foram incubadas, em triplicado, com as formulações lipossomais (direccionadas com transferrina e não direccionadas com transferrina - controlo) durante 2 ou 4 horas a 37°C. Nos poços, em triplicado, que continham células não tratadas com formulação lipossomal de fármaco, o meio de incubação foi substituído por novo meio de cultura completo.

Concluído o tempo de incubação, as células A549 foram lavadas, por duas vezes, com 200 μL de PBS a 4°C (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄ e 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,4) suplementado com iões cálcio e magnésio (inibe o destacamento celular), para parar a internalização das formulações lipossomais pelas células. De seguida, procedeu-se à adição de 200 μL de tampão de lise (25 mM HEPES, 2 mM EDTA, 0,06 mM C₁₂E₈, pH 7,4) a cada poço e à respectiva incubação durante 20 minutos à temperatura ambiente. A lise celular foi conseguida por acção mecânica de pipetagens sucessivas e, posteriormente o volume de cada poço foi transferido para uma placa de 96 poços (Corning, USA).

Os níveis de fluorescência associados às células foram determinados recorrendo a um espectrofluorímetro (SpectraMax Gemini-EM, da Molecular Devices do CNC), usando comprimentos de onda de excitação e de emissão de 505 e 750 nm, respectivamente.

A quantificação da concentração da molécula fotossensibilizadora internalizada foi feita com base na curva de calibração realizada simultaneamente em tampão de lise com C₁₂E₈ (0,06 mM). A normalização dos resultados, tendo em conta o número de células em cada poço, foi executada após quantificação da massa de proteína celular total em cada poço, determinada pelo ensaio de BCA descrito na secção 2.2.2.4.1.

2.2.6) Desenvolvimento e caracterização de formulações lipossomais encapsulando p-THPP

O segundo fotossensibilizador utilizado neste trabalho foi a molécula 5,10,15,20-tetrakis(4-hidroxyphenyl)porphyrin (p-THPP), adquirida em estado sólido à TCI (EUA). A p-THPP é, comparativamente à bacterioclorina, uma molécula com maior carácter hidrofóbico mas com um peso molecular significativamente inferior (678,73 g/mol).

As formulações lipossomais encapsulando p-THPP, com as composições lipídicas DSPC:DSPG (9:1) e DSPC:DSPG (7:3) ambas incluindo 1 mol% do fosfolípido DSPE-PEG-(MAL), foram desenvolvidas com base na literatura descrita por Kuntsche J. *et al.*, 2010. Estas formulações lipossomais foram igualmente preparadas pelo método de hidratação do filme lipídico e extrusão através de membranas de policarbonato com diâmetro de poro de 400 nm.

As formulações DSPC:DSPG (9:1) e DSPC:DSPG (7:3) foram compostas por 18 mg/mL DSPC; 2 mg/mL DSPG e 14 mg/mL DSPC; 6 mg/mL DSPG, respectivamente (Kuntsche J. *et al.*, 2010). Após a pipetagem dos respectivos volumes da solução *stock* de lípidos em clorofórmio, foi adicionado o respectivo volume de p-THPP em metanol (1,5 mg/mL). A mistura foi homogeneizada por agitação manual do balão de vidro. Os solventes orgânicos foram evaporados recorrendo ao sistema de evaporação rotativa, durante 90 minutos a 65°C. O filme lipídico foi hidratado com uma solução glucose 5% (v/v) por agitação manual acima da temperatura de transição dos lípidos (65°C). Seguidamente, a solução foi sujeita a fluxo de azoto e permaneceu 14-16 horas (*overnight*) à temperatura ambiente. Para a obtenção de lipossomas unilamelares, procedeu-se à extrusão das vesículas através de membranas de policarbonato de diâmetro de poro de 0,4 µm, não sendo necessário recorrer a uma extrusão com membranas de diâmetro de poro de 0,2 µm dado que os lipossomas extruídos apresentaram um diâmetro próximo de 200 nm.

O protocolo de tiolação e acoplamento da transferrina às formulações lipossomais de p-THPP procedeu-se tal como descrito na secção 2.2.1.2.

A caracterização das formulações lipossomais encapsulando p-THPP foi realizada como descrito na secção 2.2.2., mediante determinação do diâmetro médio dos lipossomas, do rácio final fármaco/lípido, da eficácia de encapsulação e da eficácia de acoplamento da transferrina.

Capítulo 3:

Resultados e discussão

3.1) Desenvolvimento e caracterização de formulações lipossomais encapsulando a bacterioclorina

Com o objectivo de desenvolver uma formulação lipossomal vectorizada com transferrina, encapsulando a bacterioclorina, inicialmente foi necessário desenvolver e caracterizar diversas formulações convencionais (sem transferrina).

O desenvolvimento de lipossomas, encapsulando a bacterioclorina, foi uma tarefa bastante difícil uma vez que se trata de uma molécula de elevado peso molecular e apresenta características de elevada hidrofobicidade. A fase de preparação das formulações compreendeu a avaliação de um vasto número de variáveis experimentais que são susceptíveis de influenciar significativamente a capacidade dos lipossomas encapsularem fármacos (nomeadamente fármacos com carácter hidrofóbico):

- i) Composição lipídica qualitativa e quantitativa dos lipossomas;
- ii) Modo de preparação do filme lipídico (material laboratorial usado);
- iii) Tipo de solução de hidratação do filme lipídico;
- iv) Duração do passo de hidratação do filme lipídico;
- v) Ausência ou presença de vórtex na preparação das MLVs;
- vi) Número de centrifugações para separar fármaco não-encapsulado e que precipita.

Antes de seleccionar o método de preparação dos lipossomas, deve-se ter em consideração parâmetros como a eficácia de encapsulação e o rácio fármaco/lípido (capacidade de carga). Parâmetros de encapsulação elevados e a libertação do fármaco *in vivo* constituem, desde sempre, o principal alvo das pesquisas envolvendo lipossomas (Lasic, D. D., 1998).

O método de hidratação do filme lipídico em que o fármaco se encontra misturado com os lípidos antes da evaporação do solvente orgânico foi o método seleccionado neste projecto para preparar lipossomas encapsulando a bacterioclorina. Esta escolha teve por base os resultados de um trabalho anterior desenvolvido na Bluepharma, em que foram testados vários métodos de preparação (evaporação fase reversa, *film loading* e congelação-descongelação). Na altura, o método de hidratação do filme lipídico foi o método que permitiu alcançar os melhores parâmetros de encapsulação e obter lipossomas com um tamanho apropriado.

Em experiências preliminares, as formulações convencionais de composição lipídica DSPC:DSPG (9:1) e DSPC:DSPG (7:3) serviram de ponto de partida para o presente estudo. A escolha da composição lipídica teve por base os estudos realizados com o mais recente fotossensibilizador de terceira geração (temoporfina) encapsulada numa formulação lipossomal de composição lipídica dipalmitoilfosfatidilglicerol / dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC:DPPG (9:1)) patenteada com o nome de Foslip[®] (Kuntsche J. *et al.*, 2010). A molécula fotossensibilizadora temoporfina (nome comercial, Foscan[®]) é mais hidrofóbica que a bacterioclorina em estudo mas o seu peso molecular é quase duas vezes inferior. No presente trabalho utilizou-se a composição qualitativa DSPC:DSPG de forma a distinguir da formulação lipossomal da temoporfina patenteada (Foslip[®]). Adicionalmente, o uso de fosfolípidos com 18 e não 16 carbonos poderia favorecer a incorporação da bacterioclorina que possui um tamanho significativamente superior à temoporfina.

Os fosfolípidos fosfatidilcolina (PC) e fosfatidilglicerol (PG) são os lípidos mais utilizados na preparação de lipossomas devido à sua forma cilíndrica que lhes permite formar espontaneamente uma bicamada estável em solução aquosa, uma vez que o diâmetro do seu grupo polar é semelhante à região hidrofóbica (Muehlmann, L. A., *et al.*, 2011). Grande parte das formulações lipossomais de fármacos comercializadas, possui na sua composição o fosfolípido DSPC que, dada a sua cadeia saturada confere rigidez e menor permeabilidade à membrana, o que minimiza a libertação do(s) fármaco(s) encapsulado(s) para o meio extralipossomal (Daniel, A. B. e Godbey, W. T., 2011).

As características físico-químicas dos lipossomas determinam o seu comportamento *in vitro* e *in vivo* (Betageri, G. V. *et al.*, 1993). Estas características foram avaliadas através dos parâmetros de encapsulação (capacidade de carga e da eficácia de encapsulação), do diâmetro médio das formulações lipossomais e da sua distribuição de tamanho.

A tabela V mostra os parâmetros de encapsulação das formulações lipossomais DSPC:DSPG (9:1) e DSPC:DSPG (7:3) para diferentes rácios molares bacterioclorina/lípido e diferentes concentrações de lípido inicial.

Tabela V - Parâmetros de encapsulação (capacidade de carga e eficácia de encapsulação (E.E)) de formulações lipossomais (DSPC:DSPG (9:1) e DSPC:DSPG (7:3)) com diferentes rácios molares bacterioclorina/lípido (%) e diferentes concentrações de lípido inicial (mM).

Composição da formulação	Rácio molar bacterioclorina / lípido (%)	[Lípido] _i (mM)	Capacidade de carga ± SD	E.E (%) ± SD
DSPC:DSPG (9:1)	1	40	0,005 ± 0,001	52,2 ± 6,0
DSPC:DSPG (7:3)			0,004 ± 0,003	38,3 ± 0,0
DSPC:DSPG (9:1)	2	25,3	0,008 ± 0,000	39,1 ± 0,8
DSPC:DSPG (7:3)			0,005 ± 0,003	35,6 ± 11,6

Os valores representam médias e desvios padrão obtidos a partir de duas experiências independentes (n=2).

De um modo geral, é possível verificar que para ambas as formulações, a capacidade de carga (*loading*) não foi muito elevada o que traduz uma baixa capacidade de encapsular a bacterioclorina (para ambas as composições lipídicas testadas, verificou-se elevada agregação de lípido e de fármaco não-encapsulado, o que implicou o aumento do número de centrifugações no sentido de facilitar o passo de extrusão). Os valores de eficácia de encapsulação parecem não ser coerentes com valores de capacidade de carga reduzidos. Esta situação pode-se explicar pelo facto de durante as centrifugações também haver perda de lípido junto com o fármaco precipitado e só o sobrenadante é recolhido. Por este facto, o rácio bacterioclorina/lípido final (capacidade de carga), será o parâmetro mais importante a comparar.

A formulação de composição lipídica DSPC:DSPG (9:1) foi a seleccionada como a formulação convencional mais adequada para ser utilizada na fase experimental seguinte, ou seja, na vectorização com transferrina uma vez que foi a que proporcionou menor dificuldade no passo de extrusão das MLVs e a que apresentou parâmetros de encapsulação ligeiramente superiores, independentemente das concentrações iniciais de lípido (25,3 e 40 mM) e dos rácios molares bacterioclorina/lípido (1 e 2%) utilizados (Tabela V).

No sentido de aumentar a concentração de fármaco encapsulado, também foi testada a formulação DSPC:DSPG (9:1) para rácios molares bacterioclorina/lípido superiores (4 e 8,7%) mas esta hipótese foi eliminada devido à elevada precipitação de fármaco observada durante as centrifugações e a dificuldade em realizar extrusão dos lipossomas recolhidos da centrifugação.

Pelo exposto, a formulação e as condições adoptadas para as etapas experimentais seguintes foram um rácio molar bacterioclorina/lípido igual a 1% e uma concentração de lípido inicial de 40 mM. Com o aumento da concentração de lípido e a diminuição do rácio molar fármaco/lípido, pretendeu-se ultrapassar as dificuldades existentes no processo de extrusão e confirmar se o aumento da concentração de lípido influenciava positivamente a encapsulação da bacterioclorina nos lipossomas. Contudo, é sempre necessário fazer o balanço entre o *loading* do fármaco e o tamanho dos lipossomas.

Também foi necessária uma optimização ao nível da hidratação do filme lipídico. Inicialmente, o filme era preparado num tubo de vidro mas com a adopção da hidratação a decorrer num balão de vidro, conseguiu-se aumentar a área de contacto entre a solução da bacterioclorina e os lípidos no sentido de obter uma solução mais homogénea, que permitisse diminuir a agregação e posteriormente reduzir as perdas de lípido e de fármaco nas centrifugações.

Com base no trabalho realizado por Kuntsche J. *et al.*, 2010 em que foram desenvolvidas formulações DPPC:DPPG (9:1) encapsulando temoporfina, foi testada a hidratação do filme lipídico com uma solução de glucose 5% (v/v) tal como o artigo científico descrevia. Esta alteração ao procedimento foi posteriormente eliminada uma vez que não permitiu executar a extrusão das MLVs. A ausência de sais na solução de hidratação poderá ter minimizado a precipitação do fármaco e, por este motivo, uma maior encapsulação da bacterioclorina na bicamada terá originado MLVs de dimensões tão elevadas e rígidas que não foi possível executar a extrusão com sucesso, ao contrário dos estudos com a temoporfina (Kuntsche J. *et al.*, 2010), muito provavelmente por esta ter menores dimensões que a bacterioclorina.

No sentido de obter lipossomas com maior fluidez membranar, também se testou desenvolver formulações lipossomais encapsulando a bacterioclorina com a composição lipídica (DSPC:colesterol) num rácio molar 7:3. Após adicionar ao filme seco a solução de hidratação (tampão HBS), verificou-se a formação de duas fases distintas (lipossomas vazios e fármaco que não se dissolveu na solução tampão). A presença de colesterol terá competido com a bacterioclorina para a incorporação na membrana uma vez que o carácter hidrofóbico da bacterioclorina exige a sua incorporação exclusiva na membrana do lipossoma.

Os lipossomas convencionais desenvolvidos apresentaram um diâmetro médio (após extrusão) inferior a 200 nm e um PI (do inglês *polydispersion index*) médio de 0,31, embora existisse frequentemente uma população de 5 nm correspondente a uma pequena população (5 a 10%) que foi assumida como possíveis agregados de fármaco livre presentes na solução.

O tamanho é uma das características que define o comportamento *in vivo* dos lipossomas em vários processos, nomeadamente no mecanismo de internalização celular (Betageri, G. V., *et al.*, 1993). Lipossomas com diâmetro médio inferior a 200 nm, com ligandos hidrofílicos como por exemplo PEG, demonstram tempos de circulação mais prolongados uma vez que dificilmente são reconhecidos pelos macrófagos do sistema reticuloendotelial e, ao serem vesículas pequenas, conseguem atingir uma acumulação significativa no tumor devido à extravasação na vasculatura permeável e devido a uma drenagem linfática deficiente do tecido tumoral - efeito EPR, já discutido na Introdução (Fonseca C., 2006).

O índice de polidispersão (PI) é outro parâmetro igualmente afectado pelo método de preparação e fornece informação relativa à distribuição e homogeneidade da população lipossomal (Annelies, S. L. *et al.*, 2004). Um valor elevado de PI indica a existência de diferentes tamanhos de partículas ou agregados. O valor ideal de PI deve ser o mais pequeno possível, preferencialmente inferior a 0,2 pois indica homogeneidade das vesículas (Betageri, G. V. *et al.*, 1993). No presente trabalho, não foi possível obter valores de PI tão reduzidos devido à grande dificuldade de realizar extrusões bem-sucedidas num só passo, ou seja, sem troca de membranas ou utilizando preliminarmente membranas de 400 nm. Por estes motivos a média de valores para o índice de polidispersão obtido (0,31) não foi tão reduzido como o desejado.

3.1.2) Desenvolvimento e caracterização de formulações lipossomais encapsulando a bacterioclorina e vectorizadas com transferrina

Após a dificuldade em otimizar o método de preparação e após a escolha da formulação DSPC:DSPG (9:1) como sendo a formulação convencional mais apropriada, o próximo passou por realizar o acoplamento covalente da transferrina que exigiu a incorporação na formulação convencional, de um fosfolípido alterado com o polímero PEG modificado com um grupo reactivo para cisteínas (maleimido). Assim, à formulação DSPC:DSPG (9:1) foi adicionado 1 mol% do fosfolípido DSPE-PEG-(MAL).

Segundo estudos anteriores (Voinea, M. *et al.*, 2002), 1 mol% de PEG₂₀₀₀ é a concentração mínima para garantir o balanço entre a eficácia de acoplamento da proteína e o reconhecimento do *targeting*. Já estudos muito recentes (Bovis, M. J. *et al.*, 2012) com a molécula hidrofóbica temoporfina (Foscan[®]) mostraram que a % molar de PEG influencia a

concentração que maximiza o perfil farmacocinético, a biodistribuição do fármaco no plasma sanguíneo e no tecido pulmonar tumoral. Dependendo da densidade do PEG na formulação e do comprimento da cadeia polimérica, a estrutura organizacional do PEG é distinta e faz com que o lipossoma adquira características diferentes, nomeadamente tamanho e estabilidade (Wang, M. e Thanou, M., 2010). Neste trabalho, apenas foi testada a utilização de 1 mol% do fosfolípido DSPE-PEG-(MAL) uma vez que é a % mais comum na literatura. Igualmente não foi possível, por limitações de tempo, testar maiores % de PEG (ex. 2 e 8%) como foram testadas nos lipossomas encapsulando a temoporfina (Bovis, M. J. *et al.*, 2012).

A escolha da metodologia para a incorporação do fosfolípido DSPE-PEG-(MAL) foi motivada por duas razões: 1) elevada eficácia na reacção entre o grupo tiol da transferrina tiolada com o grupo maleimido e 2) a reacção de tiolação ocorrer de modo espontâneo, à temperatura ambiente e a valores de pH próximos da neutralidade (Fonseca, C. *et al.*, 2005). A reacção de tiolação foi realizada na razão molar 1:10 (transferrina:2-iminotiolano) tendo por base os estudos realizados por Fonseca, C. *et al.*, 2005, que indicaram ser este o rácio que melhor optimizava o processo de tiolação e potenciava o seu acoplamento ao grupo maleimido. Segundo este estudo, com o rácio molar 1:10 (transferrina:2-iminotiolano), foi possível maximizar a quantidade de transferrina à superfície dos lipossomas, atingindo uma densidade de aproximadamente 200 µg de Trf / µmol de fosfolípido. Contudo, é de salientar que as formulações apresentadas nesse estudo (Fonseca, C. *et al.*, 2005) apresentavam com composição lipídica e fármacos diferentes.

As condições (duração e temperatura) da reacção de acoplamento foram igualmente um parâmetro avaliado nesta actividade. Testou-se incubação de 2 horas à temperatura ambiente e 14-16 horas (*overnight*) a 37°C. As condições 14-16 horas a 37°C foram as que conduziram a um aumento na eficácia de acoplamento médio de 122 para 202 µg de Trf / µmol de fosfolípido (dados não mostrados). Sendo assim, a eficácia de acoplamento de transferrina obtida foi semelhante aos valores obtidos no estudo realizado por Fonseca, C. *et al.*, 2005.

Foram desenvolvidos em simultâneo lipossomas controlo (com fosfolípido DSPE-PEG-(MAL) mas sem transferrina acoplada) para a formulação direccionada com transferrina a partir do mesmo filme lipídico.

As características físico-químicas das formulações direccionadas e não direccionadas com transferrina foram igualmente avaliadas pela determinação do diâmetro médio dos lipossomas, dos parâmetros de encapsulação e da eficácia de acoplamento do ligando,

avaliada em termos da densidade de transferrina presente à superfície dos lipossomas (expressa em μg de Trf / μmol de fosfolípido).

Todas as formulações apresentaram um diâmetro médio inferior a 200 nm (Tabela VI).

Tabela VI - Diâmetro médio final de formulações lipossomais (vectorizadas e não vectorizadas com transferrina) de composição lipídica DSPC:DSPG:DSPE-PEG-(MAL) (9:1:0.1), 1% de rácio molar bacterioclorina/lípido e 40 mM de lípido inicial, após cromatografia de exclusão molecular.

Composição da formulação	Diâmetro médio final (nm) \pm SD
DSPC:DSPG:DSPE-PEG-(MAL)	124,8 \pm 3
DSPC-DSPG-DSPE-PEG-(MAL)-Trf	181,0 \pm 5

Os valores representam médias e desvios padrão obtidos a partir de duas experiências independentes (n=2).

Embora o número de experiências realizadas seja limitado para retirar conclusões mais robustas, perante estes valores é susceptível concluir que a incorporação de uma pequena % de um novo fosfolípido (DSPE-PEG-(MAL)) e a presença de transferrina a ele acoplada, aumentou ligeiramente o tamanho dos lipossomas (Tabela IV). No entanto, os lipossomas direccionados com transferrina apresentam ainda um diâmetro médio inferior a 200 nm tal como o referido anteriormente para os lipossomas convencionais.

Ao longo do trabalho, foi constante a dificuldade em obter lipossomas encapsulando a bacterioclorina (vectorizados ou não vectorizados com transferrina, tal como havia acontecido com os lipossomas convencionais), o que limitou o número de experiências independentes e reprodutíveis. Embora o resultado médio da eficácia de acoplamento da transferrina (200 μg de Trf / μmol de fosfolípido) esteja de acordo com o reportado na literatura (ex. Fonseca, C. *et al.*, 2005), os parâmetros de encapsulação da formulação DSPC:DSPG:DSPE-PEG-(MAL)-Trf da bacterioclorina foram igualmente reduzidos (Tabela VII).

Tabela VII - Capacidade de carga (*loading*) da formulação lipossomal convencional DSPC:DSPG (9:1) e da formulação vectorizada com transferrina DSPC:DSPG:DSPE-PEG-(MAL)-Trf (9:1:0,1) com 1% de rácio molar bacterioclorina/lípido e 40 mM de lípido inicial.

Composição da formulação	Capacidade de carga \pm SD
DSPC:DSPG (9:1)	0,005 \pm 0,001
DSPC:DSPG:DSPE-PEG-(MAL)-Trf	0,004 \pm 0,001

Os valores representam médias e desvios padrão obtidos a partir de duas experiências independentes (n=2).

3.2) Identificação de receptores de transferrina (TrfR) na linha celular A549 por citometria de fluxo

Com o intuito de avaliar a associação celular das formulações lipossomais desenvolvidas encapsulando a bacterioclorina, foi fundamental confirmar primeiramente a presença do receptor de transferrina à superfície das células A549 para assegurar ser possível uma ligação específica e uma efectiva internalização dos lipossomas por endocitose mediada pelos receptores de transferrina.

Estudos anteriores (Anabousi, S. *et al.*, 2006) mostraram que o nível de expressão de receptores de transferrina é significativamente elevado na linha celular de cancro de pulmão (A549) e, que a transferrina foi o ligando seleccionado para garantir o direccionamento activo da formulação lipossomal e proporcionar uma maior captação de Trf-lipossomas. (Anabousi, S. *et al.*, 2006; Li, X. *et al.*, 2009).

O ensaio de citometria de fluxo permitiu a confirmação da presença de receptores de transferrina (TrfR) na superfície das células A549. De acordo com o histograma da Figura 15, verifica-se um deslocamento do pico resultante do aumento significativo da intensidade média de fluorescência de 5,36 do controlo (células não marcadas) para 83,79 da amostra (células incubadas com o anticorpo CD71).

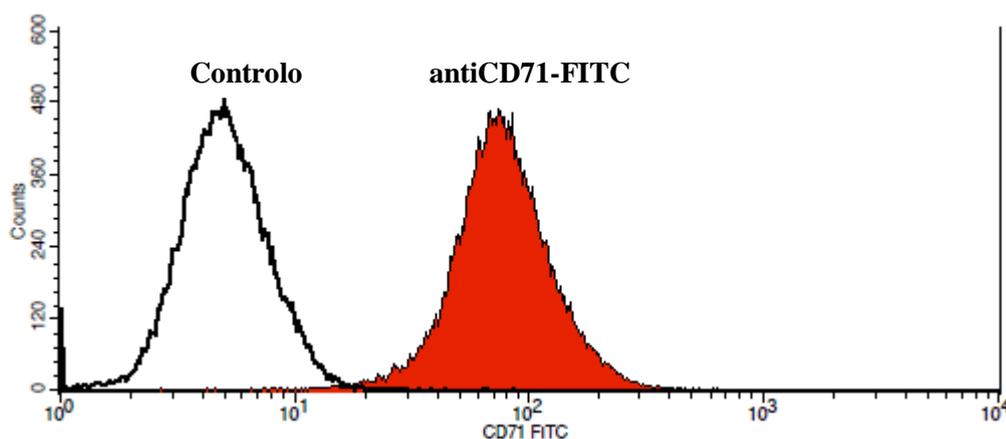


Figura 15 - Citometria de fluxo para avaliar a expressão/densidade de receptores de transferrina (TrfR) na superfície das células de adenocarcinoma do pulmão humano (A549). Histograma representativo das células A549 incubadas com o anticorpo antiCD71-FITC (vermelho). Como controlo foram usadas células com ausência de anticorpo (branco).

3.3) Estudos de associação celular de formulações lipossomais encapsulando a bacterioclorina

Apesar de as formulações lipossomais desenvolvidas não apresentarem parâmetros de encapsulação muito elevados (o que é perfeitamente compreensível visto se tratar de uma encapsulação passiva), a próxima tarefa experimental passou por verificar se a formulação direccionada com transferrina promovia uma maior associação celular (ligação e internalização), em células de cancro do pulmão (A549), relativamente à formulação não direccionada (controlo).

Inicialmente foi necessário fazer um estudo para otimizar a densidade celular em cada poço e definir as condições experimentais. Numa placa de 48 poços (Corning[®], Nova Iorque, EUA) foram testadas as densidades 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 e 5×10^4 células/mL. Por avaliação visual da confluência das células às 24 horas, a densidade inicial de 5×10^4 foi a seleccionada para prosseguir com os estudos de associação celular (resultados não mostrados).

O tempo de incubação (2 ou 4 horas) foi outro parâmetro avaliado por comparação da concentração de bacterioclorina internalizada na formulação direccionada versus bacterioclorina internalizada na formulação não direccionada para os dois tempos de incubação. Após este estudo preliminar, o tempo de incubação de 2 horas foi o seleccionado uma vez que 4 horas de incubação das formulações lipossomais de bacterioclorina com as células A549 não contribuíram para uma maior internalização celular do fármaco em relação aos resultados obtidos com 2 h de incubação. Para os dois tipos de formulação (direccionada com transferrina e não direccionada com transferrina - controlo), a concentração de fármaco incubado nas células foi igual e correspondeu ao valor mais baixo obtido no ensaio de quantificação do fármaco das duas formulações.

Perante as dificuldades do processo de preparação dos lipossomas, juntamente com os resultados de associação celular da formulação lipossomal (DSPC:DSPG:DSPE-PEG-(MAL)) de bacterioclorina direccionada com transferrina e, com os parâmetros de encapsulação reduzidos optou-se por recorrer a outra molécula fotossensibilizadora (p-THPP) disponível no laboratório e, desta forma, fazer uma prova de conceito. Por outras palavras, pretendeu-se confirmar que é possível desenvolver uma formulação lipossomal com a composição DSPC:DSPG:DSPE-PEG-(MAL)-Trf e encapsular uma molécula fotossensibilizadora com o mesmo procedimento experimental, mas mais exequível e, com

parâmetros de encapsulação mais satisfatórios. Todas as tarefas experimentais realizadas com a p-THPP serão descritas seguidamente na secção 3.4.

3.4) Desenvolvimento e caracterização de formulações lipossomais encapsulando a molécula p-THPP

Tal como afirmado na secção anterior, o objectivo principal do presente projecto era desenvolver uma formulação lipossomal vectorizada com transferrina, encapsulando uma molécula fotossensibilizadora, que apresentasse elevados parâmetros de encapsulação e que demonstrasse propriedades físico-químicas compatíveis com uma futura aplicação intravenosa em PDT. Perante as dificuldades já descritas recorreu-se a outro fotossensibilizador, igualmente hidrofóbico mas que manifesta a grande diferença no seu tamanho (679 g/mol) relativamente à bacterioclorina (1135 g/mol).

Foram realizados os mesmos estudos com as formulações lipossomais de p-THPP que haviam sido realizados com as formulações lipossomais encapsulando a bacterioclorina (formulações direccionadas ou não com transferrina): determinação do diâmetro médio dos lipossomas, da eficácia de encapsulação, da capacidade de carga e da eficácia de acoplamento da transferrina.

Tabela VIII - Capacidade de carga (*loading*) de formulações lipossomais vectorizadas com transferrina (DSPC:DSPG:DSPE-PEG-(MAL)-Trf (9:1:0,1)), encapsulando a bacterioclorina e a molécula p-THPP.

Composição da formulação	Fármaco	Capacidade de carga \pm SD
DSPC:DSPG:DSPE-PEG-(MAL)-Trf	Bacterioclorina	0,004 \pm 0,001
	p-THPP	0,083 \pm 0,023

Os valores representam médias e desvios padrão obtidos a partir de duas experiências independentes (n=2).

Fazendo um estudo comparativo entre a bacterioclorina e a p-THPP, com esta última foi possível alcançar concentrações finais de lípido e fármaco superiores que afectaram positivamente os parâmetros de encapsulação (tabela VIII). Também foi testada a formulação lipossomal vectorizada de composição lipídica (7:3), encapsulando p-THPP e, obtiveram-se igualmente parâmetros de encapsulação elevados tal como para a composição lipídica (9:1). Aparentemente, o principal factor responsável por estes resultados satisfatórios foi a redução muito significativa do tamanho da molécula fotossensibilizadora encapsulada na bicamada

lipossomal. Adicionalmente é de realçar que com a formulação lipossomal de p-THPP não ocorreram quaisquer dificuldades aquando da preparação dos lipossomas, nomeadamente na extrusão das MLVs e na necessidade de centrifugar a amostra devido à precipitação de fármaco.

Tal como nas formulações lipossomais encapsulando a bacterioclorina, os lipossomas encapsulando p-THPP apresentaram um tamanho inferior a 200 nm e eficácias de acoplamento da transferrina semelhantes às obtidas com a bacterioclorina.

3.5) Estudos de associação celular de formulações lipossomais encapsulando a molécula p-THPP

Após os resultados promissores na caracterização físico-química das formulações encapsulando p-THPP, manifestou-se grande curiosidade em regressar aos estudos de associação celular. Os estudos com a p-THPP foram realizados nos últimos dias de trabalho experimental da presente Tese de Mestrado e como tal, só foi possível realizar duas experiências independentes. Os resultados destes estudos de associação celular estão apresentados na tabela IX.

Tabela IX - Concentração de fármaco internalizada e associação celular da formulação lipossomal vectorizada (DSPC:DSPG:DSPE-PEG-(MAL)-Trf (9:1:0,1)), encapsulando a bacterioclorina e a molécula p-THPP.

Fármaco	[Fármaco]internalizado / [proteína celular]	Formulação vectorizada / não-vectorizada
Bacterioclorina	6,4E-05	1,5 x
p-THPP	2,1E-04	0,9 x

Os valores representam médias e desvios padrão obtidos a partir de duas experiências independentes (n=2).

Ao contrário do esperado, os resultados de associação celular obtidos após incubação de formulações lipossomais encapsulando p-THPP com as células A549, não manifestou diferença significativa entre a formulação direccionada com transferrina e a formulação não direccionada com transferrina (controlo). Adicionalmente verificou-se que a composição quantitativa dos lipossomas (DSPC:DSPG (9:1) e DSPC:DSPG (7:3)) não teve influência na internalização celular das formulações lipossomais (dados não mostrados).

As experiências com a p-THPP serviram para validar a formulação lipossomal anteriormente seleccionada (qualitativa e quantitativamente). Assim, os resultados de associação celular vieram demonstrar que a composição lipídica aparentemente não tem influência na internalização da formulação.

Embora a concentração de p-THPP internalizada tenha sido, mais de 3 vezes superior à internalizada com a bacterioclorina, o rácio entre ([p-THPP] internalizada / [proteína

celular] - formulação vectorizada com transferrina) e ([p-THPP] internalizada / [proteína celular] - formulação controlo) foi de, aproximadamente, 1. Assim, concluiu-se que presença da transferrina enquanto ligando não contribuiu para uma maior internalização. Além disso, os valores dos referidos rácios obtidos nas duas experiências realizadas com p-THPP foram inferiores aos rácios obtidos nos estudos com a bacterioclorina (Tabela IX).

Este resultado estranho levantou uma série de questões e discussões, nomeadamente se a quantidade de transferrina utilizada no acoplamento seria a correcta e se a internalização do fármaco efectivamente ocorria através de endocitose mediada por receptores da transferrina. É possível afirmar que quantidade de transferrina utilizada foi a correcta dados os resultados satisfatórios da eficácia de acoplamento para ambos os fármacos, comparando com a literatura (ex. (Fonseca, C. et al., 2005)) e por observação visual aquando da cromatografia de exclusão molecular, onde foi possível verificar que o gel da coluna adquiriu a cor da transferrina ao longo da eluição posteriormente à recolha das formulações lipossomais.

Outra hipótese levantada foi o facto de incubar nas células, uma concentração de p-THPP lipossomal (média 500 μM) 10 vezes superior à da bacterioclorina lipossomal (média 50 μM) e, inclusive, superior às concentrações normalmente usadas (aproximadamente 200 μM) em estudos de associação celular apresentados na literatura (Fonseca, C. et al., 2005). Possivelmente, a internalização não ocorreu por endocitose mediada por receptores mas por um mecanismo de fagocitose (inespecífico) mascarando o papel da transferrina enquanto ligando. Por outras palavras, as células foram de tal forma “sobrecarregadas” com uma concentração elevada de formulação lipossomal que não foi possível constatar o efeito direccionador da transferrina. O ideal seria fazer um estudo preliminar para inferir como a concentração de p-THPP lipossomal afecta a internalização celular e determinar qual a concentração óptima a incubar num estudo futuro.

Adicionar o fosfolípido DSPE-PEG não-reactivo na formulação vectorizada com transferrina, seria uma alternativa no sentido de conferir ao polímero uma organização em escova (do inglês *brush*). Com a adição deste polímero, é possível aumentar a exposição da transferrina, afastando-a da superfície lipossomal e assim maximizar a interacção com o seu receptor. Tal como referido anteriormente, a estrutura organizacional do polímero PEG é resultado do comprimento da cadeia polimérica e da sua densidade na superfície do lipossoma. Contudo, não é apenas a presença de PEG que irá determinar o comportamento

dos lipossomas mas também a quantidade molar seleccionada (Wang, M. e Thanou, M., 2010).

Outra possibilidade seria estudar a associação celular com outra linha celular, que apresentasse níveis de expressão dos receptores da transferrina ainda superiores às células A549. Outra abordagem poderia ser recorrer a outro ligando, como por exemplo, um anticorpo específico que esteja sobreexpresso na linha celular A549 ou noutra linha celular seleccionada. Na escolha de um novo ligando teria de se ter em conta que o acoplamento do ligando deve manter os perfis farmacocinético e de biodistribuição dos lipossomas, garantir a estabilidade dos lipossomas e a sua acessibilidade ao receptor na membrana da célula alvo. A grande limitação no uso de anticorpos deve-se, maioritariamente, para uma questão de imunogenicidade, não descurando a sua estabilidade, o seu armazenamento e o elevado custo.

Capítulo 4:

Conclusões e perspectivas futuras

Com este projecto, foi possível verificar que o desenvolvimento de uma formulação lipossomal encapsulando uma molécula hidrofóbica, com o tamanho da bacterioclorina usada acarreta grandes dificuldades, nomeadamente ao nível da optimização do método de preparação dos lipossomas. Estas limitações refletiram-se nos resultados obtidos com a bacterioclorina (dificuldades na extrusão, parâmetros de encapsulação significativamente baixos e internalização celular mínima por parte da formulação direccionada com transferrina).

Os estudos de associação celular com a bacterioclorina permitiram concluir que a diferença entre a formulação direccionada com transferrina e a formulação não direccionada é mínima e, que com a molécula p-THPP não se verifica maior extensão de associação celular entre as duas formulações.

Embora os estudos de associação celular com a molécula p-THPP não tenham sido satisfatórios, conclui-se que o tamanho da molécula tem um papel fulcral quando se pretende encapsular em lipossomas moléculas com características hidrofóbicas.

Assim, assentando no princípio de que os lipossomas são os veículos mais promissores enquanto sistema de entrega de fármacos, uma alternativa será a empresa Luzitin sintetizar uma molécula que apresente características fotossensibilizadoras satisfatórias, compatível com o seu plano de actividades e um tamanho semelhante à molécula p-THPP.

Com esta nova molécula, seriam realizadas todas as tarefas de desenvolvimento, optimização, caracterização das formulações lipossomais e estudos de associação celular realizados na presente tese com a bacterioclorina. Caso os resultados fossem promissores, os estudos futuros seriam: i) avaliar a estabilidade das formulações em armazenamento (4°C) e em condições fisiológicas (37°C) com vista à sua posterior utilização *in vivo*, ii) estudar os mecanismos de internalização celular das formulações direccionadas por incubação de fármacos inibidores dos processos de internalização celular que restringem a actividade metabólica das células inibindo globalmente a endocitose (quer a mediada por receptores quer os processos de fagocitose e pinocitose), iii) estudar a inibição competitiva do receptor da transferrina mediante saturação dos receptores com transferrina livre e iv) avaliar a citotoxicidade das formulações lipossomais desenvolvidas com uma nova molécula fotossensibilizadora após incubação com as células tumorais usadas nos estudos de associação celular.

Capítulo 5:

Bibliografía

- ❖ Agostinis, P. *et al.*, (2011). Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *Ca Cancer Journal for Clinicians*, 61: 250-281.
- ❖ Allen, T. M., (2003). Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Progress in Lipid Research*, 42: 439-462.
- ❖ Allen, T. M. e Cullis P. R. (2004). Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*, 303: 1818-1822.
- ❖ Allison, R. *et al.*, (2004). Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1: 27-42.
- Anabousi, S. *et al.*, (2006). In vitro assessment of transferrin-conjugated liposomes as drug delivery systems for inhalation therapy of lung cancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29: 367-374.
- ❖ Anabousi, S. *et al.*, (2005). Assessing transferring modification of liposomes by atomic force microscopy and transmission electron microscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60: 295-303.
- ❖ Annelies, S. L. *et al.*, (2004). Liposomes for photodynamic therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56: 17-30.
- ❖ Bartlett, G. R., (1959). Phosphorus Assay in Column Chromatography. *The Journal of Biological Chemistry*, 234(3).
- ❖ Batista, C. M. *et al.*, (2007). Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 43(2).
- ❖ Betageri, G. V. *et al.*, (1993). Liposome Drug Delivery Systems.
- ❖ Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit, Sigma.
- ❖ Bonneau, S. e Vever-Bizet, C., (2008). Tetrapyrrole photosensitisers determinants of subcellular localisation and mechanisms of photodynamic processes in therapeutic approach. *Expert Opin. Ther. Patents*, 18(9):1-15.
- ❖ Brown, S. B. *et al.*, (2004). The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncology*, 5: 554-563.
- ❖ Bovis, M. J. *et al.*, (2012). Improved in vivo delivery of m-THPC via pegylated liposomes for use in photodynamic therapy. *Journal of Controlled Release*, 157: 196-205.
- ❖ Bugaj, A. M., (2011). Targeted photodynamic therapy – a promising strategy of tumor treatment. *Photochem. Photobio.Sci.*, 10: 1097.
- ❖ Calzavara, P. G. *et al.*, (2007). Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: photochemistry and photobiology. *J Eur Acad Dermatol Venereol.*, 21: 293-302.
- ❖ Castano, A. P. *et al.*, (2006). Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer*, 6(7): 535-545.

- ❖ Cattel, L. *et al.*, (2003). From conventional to stealth liposomes: a new frontier in cancer chemotherapy, 89(3): 237-249.
- ❖ Daniel, A. B. e Godbey, W. T., (2011). Liposomes for Use in Gene Delivery. *Journal of Drug Delivery*.
- ❖ Derycke, A. S. L. *et al.*, (2004). Liposomes for therapy. *Advance Drug Delivery Reviews*, 56:17-30.
- ❖ Duncan, R. e Gaspar, R., (2011). Nanomedicine(s) under the Microscope. *Molecular pharmaceuticals*.
- ❖ Fayter, D. *et al.*, (2010). A systematic review of photodynamic therapy in the treatment of precancerous skin conditions, Barrett's oesophagus and cancers of the biliary tract, brain, head and neck, lung, oesophagus and skin. *Health Technology Assessment*, 14(37).
- ❖ Feng, S. e Chien S., (2003). Chemotherapeutic engineering: application and futher development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. *Chemical Engineering science*, 58: 4087-4114.
- ❖ Fonseca, C. *et al.*, (2005). Targeting of sterically stabilised pH-sensitive liposomes to human T-leukaemia cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59: 359-366.
- ❖ Fonseca, C., (2006). Nanovesículas de Base Lipídica para Vectorização de Oligonucleotídeos *Antisense*: Desenvolvimento, Caracterização Físico-Química e Avaliação da Actividade Antitumoral em Modelos Celulares e Animal de Leucemia Humana. Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra.
- ❖ Fretz Marjan, (2007). Strategies to improve intracellular drug delivery by targeted liposomes.
- ❖ Fukuda, H. *et al.*, (2005). Aminolevulinic acid: from its unique biological function to its star role in photodynamic therapy. *Int J Biochem Cell Biol.*, 37: 272-276.
- ❖ Gabizon, A. *et al.*, (2002). Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies. *Clin. Pharmacokinet.*, 42(5): 419-436.
- ❖ Grosswewer, L. I., (2005). *The Science of Phototherapy: An introduction*. Springer, The Netherlands. 245-273.
- ❖ Hanahan, D. e Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. 100: 57-70.
- ❖ Hasan, H. *et al.*, (2000). Photodynamic Therapy of Cancer. *Radiation Oncology*, 40: 605-622.
- ❖ Igarashi, A. *et al.*, (2003). Liposomal photofrin enhances therapeutic efficacy of photodynamic therapy against the human gastric cancer. *Toxicology Letters*, 145: 133-141.

Ishizuka, M. *et al.*, (2011). Novel development of 5-aminolevulinic acid (ALA) in cancer diagnosis and therapy. *International Immunopharmacology*, 11: 358-365.

❖ Ismael, G. F. *et al.*, (2008). Novel cytotoxic drugs: old challenges, new solutions. *Cancer Treat Rev.* 34(1): 81-91.

❖ Jesorka, A. e Orwar, O., (2008). Liposomes: technologies and analytical applications. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 1: 801-832.

❖ Kessel, D., (2006). Death pathways associated with photodynamic therapy. *Med. Laser Appl.*, 21: 219-224.

❖ Kuntsche J. *et al.*, (2010). Temoporfin-loaded liposomes: Physicochemical characterization. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40: 305–315.

❖ Lasic, D. D., (1993). *Liposomes – from Physics to Applications*.

❖ Lasic, D. D. e Papahadjopoulos, D., (1998). Novel applications of liposomes. *Tibtech*, 16: 307-320.

❖ Li, H. e Qian, Z. M., (2002). Transferrin/transferrin receptor-mediated drug delivery. *Medicinal Research Reviews*, 22(3): 225-250.

❖ Li, X. *et al.*, (2009). Targeted delivery of doxorubicin using stealth liposomes modified. *International Journal of Pharmaceutics*, 373: 116-123.

❖ Manual Pierce BCA Protein Assay kit, Thermo Scientific.

❖ Maurer-Spurej, E. *et al.*, (1999). Factors influencing uptake and retention of amino-containing drugs in large unilamellar vesicles exhibiting transmembrane pH gradients. *Biochimica et Biophysica*.

❖ Mayer, L. D. *et al.*, (1986). Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 161-168.

❖ Mendonça, L. S., *et al.*, (2010). Transferrin receptor-targeted liposomes encapsulating anti-BCR-ABL siRNA or asODN for chronic myeloid leukemia treatment. *Bioconjugate Chem.*, 21: 157-168.

❖ Moghimi, S. M. e Szebeni, J., (2003). Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Progress in Lipid Research*, 42: 463-478.

❖ Moreira, J. N., (2001). *Vectorização de lipossomas para o cancro humano de pequenas células do pulmão*. Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra.

❖ Mroz, P. *et al.*, (2010). Photodynamic Therapy of Tumors Can Lead to Development of Systemic Antigen-Specific Immune Response. *PLoS ONE* 5(12).

- ❖ Muehlmann, L .A. *et al.*, (2011). Liposomal photosensitizers: potential platforms for anticancer photodynamic therapy. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44: 729-737.
- ❖ Nawalany, K. *et al.*, (2012). Novel nanostructural photosensitizers for photodynamic therapy: In vitro studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 430: 129-140.
- ❖ Nie, S. *et al.*, (2007). Nanotechnology applications in cancer. *Annu Ver. Biomed Eng.*, 9: 257-288.
- ❖ O'Connor, A. E. *et al.*, (2009). Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*, 85: 1053-1074.
- ❖ Paszko, E. *et al.*, (2011). Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 8: 14-29.
- ❖ Pereira, M. M. *et al.*, (2009). Synthesis and photophysical properties of amphiphilic halogenated bacteriochlorins: new opportunities for photodynamic therapy of cancer. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 13: 567–573.
- ❖ Pogue, B. *et al.*, (2007). “Photosensitizer dosimetry controlled PDT: is there proof that improved tools improve treatment outcome?” *Proc. SPIE*, p. 6427: 6420.
- ❖ Qian, Z. M., (2002). Targeted Drug Delivery via the Transferrin Receptor-Mediated Endocytosis Pathway. *Pharmacol Rev.*, 54: 561-587.
- ❖ Roberts, M. J. *et al.*, (2002). Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54: 459-476.
- ❖ Robertson, C. A. *et al.*, (2009). Photodynamic therapy (PDT): a short review in cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 96: 1-8.
- ❖ Rodrigues, E. S. *et al.*, (2009). Photodynamic Therapy in the skin câncer treatment: concepts, utilizations and limitations. *Oncology Therapy*.
- ❖ Samad, A. *et al.*, (2007). Liposomal Drug Delivery Systems: An Update Review. *Current Drug Delivery*, 4: 297-305.
- ❖ Sibani, S. A. *et al.*, (2008). Photosensitiser delivery for photodynamic therapy. Part 2: systemic carrier platforms. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 5(11): 1241-1254.
- ❖ Spyratou, E. *et al.*, (2012). Biophotonic techniques for manipulation and characterization of drug delivery nanosystems in cancer therapy. *Cancer Letters*.
- ❖ Torchilin, V. P., (2000). Drug targeting. *Eur. J. Pharm. Sci.*, pp. 81-91.

- ❖ Torchilin, V. P., (2007). Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *AAPS J.*, 9: 128-147.
- ❖ Triesscheijn, M. *et al.*, (2006). Photodynamic Therapy in Oncology. *The Oncologist*, 11(9): 1034-1044.
- ❖ Veronese, F. M., (2001). Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. *Biomaterials*, 22: 405-417.
- ❖ Vladimir, P. T., (2005). Recent advances liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews. Drug discovery*, 4: 145-160.
- ❖ Vladimir, P. T., (2007). Targeted Pharmaceutical Nanocarriers for Cancer Therapy and Imaging. *The AAPS Journal*, 9 (2).
- Voinea, M. *et al.*, (2002). Binding and uptake of transferrin-bound liposomes targeted to transferring receptors of endothelial cells. *Vascular Pharmacology*, 39: 13-20.
- ❖ Wang, M. e Thanou, M., (2010). Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacological Research*, 62: 90-99.
- ❖ Yano, S. *et al.*, (2011). Current states and future views in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 12: 46-67.
- ❖ <http://www.cancer.org> (Maio, 2012)
- ❖ <http://www-dep.iarc.fr> (Maio, 2012)
- ❖ <http://www.fda.gov> (Maio, 2012)

Anexos

Tabela A – Exemplo dos valores de absorvância de amostras de soluções padrão (P1-P5) obtidas por diluição da solução *stock* de KH_2PO_4 (0,65 mM).

	<i>Stock</i> KH_2PO_4		Abs (830 nm)
	V (μl)	n fosfato (mol)	
Branco	0	0	0
P1	25	16	0,086
P2	50	33	0,169
P3	100	65	0,321
P4	200	130	0,648
P5	300	195	0,975

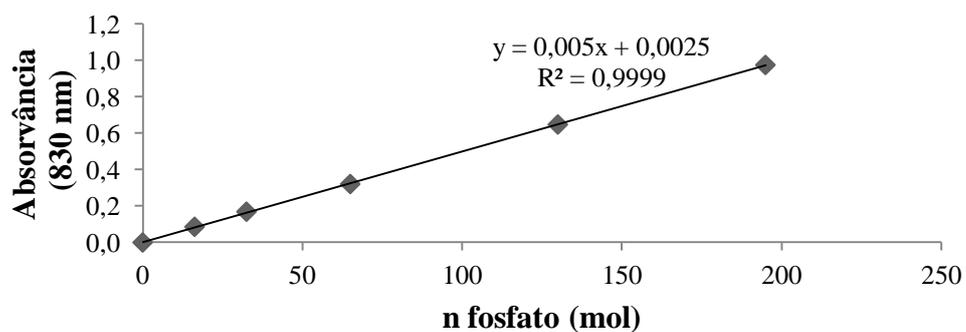


Figure A- Exemplo de uma curva de calibração das soluções padrão (P1-P5) obtidas por diluição da solução *stock* de KH_2PO_4 (0,65 mM).

Tabela B - Valores de absorvância de amostras de soluções padrão (P1-P5) obtidas por diluição da solução *stock* de bacterioclorina (2 mM).

	[bacterioclorina] (mM)	Abs (344 nm)
Branco	0	0
P1	0,0001	0,0185
P2	0,001	0,1105
P3	0,004	0,4525
P4	0,007	0,7865
P5	0,01	1,141

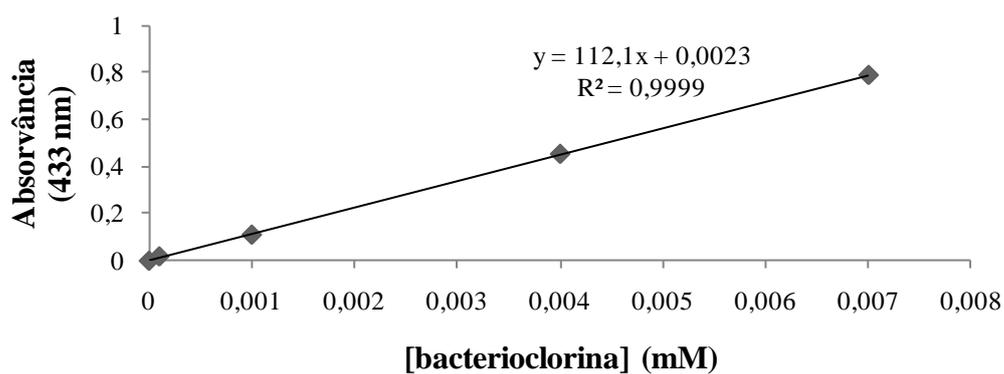


Figure B - Curva de calibração das amostras de soluções padrão (P1-P5) obtidas por diluição da solução *stock* de bacterioclorina (2 mM).

Tabela C - Valores de absorvância de amostras de soluções padrão (P1-P5) obtidas por diluição da solução *stock* de p-THPP (2 mM).

	[p-THPP] (mM)	Abs (418 nm)
Branco	0	0
P1	0,0001	0,023
P2	0,001	0,324
P3	0,002	0,647
P4	0,003	0,948
P5	0,04	1,26

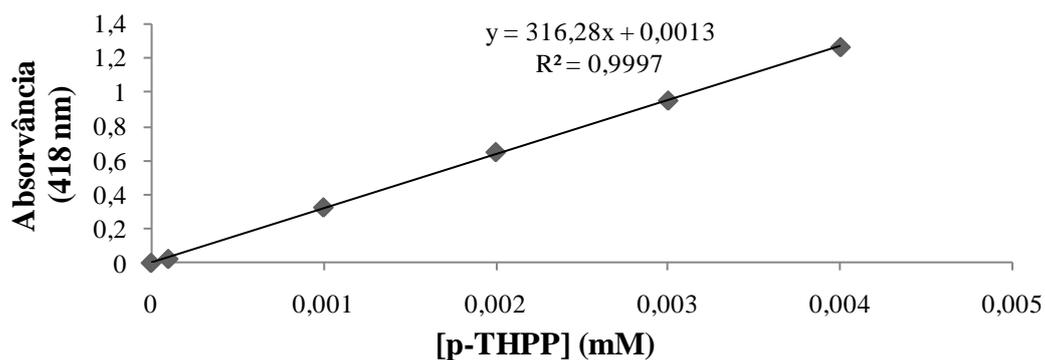


Figure C - Curva de calibração das amostras de soluções padrão (P1-P5) obtidas por diluição da solução *stock* de p-THPP (2 mM).

Tabela D - Valores de absorvância de amostras de soluções padrão (P1-P5) obtidas por diluição da solução *stock* de BSA (1000 µg/ml).

	[BSA] (µg/ml)	Abs (540 nm)
Branco	0	0
P1	100	0,100
P2	150	0,166
P3	400	0,394
P4	600	0,577
P5	900	0,809

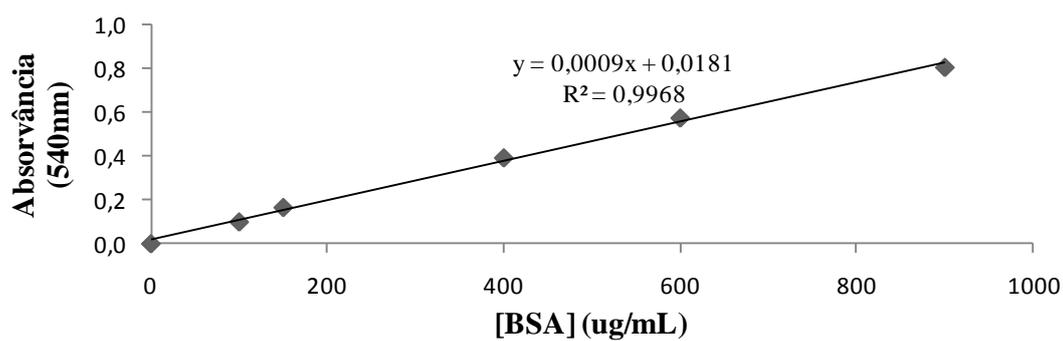


Figure D - Curva de calibração das amostras de soluções padrão (P1-P5) obtidas por diluição da solução *stock* de BSA (1000 µg/ml).

