

Tiago Luís Pinto

A Utilização de Lipossomas como Vetores de Fármacos Anticancerígenos

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
orientada pelo Professor Doutor João Carlos Canotilho Lage e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Tiago Luís Pinto, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009010352, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo Monografia apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular Estágio Curricular. Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

(Tiago Luís Pinto)

Coimbra, 11 de Julho de 2014

O Tutor

João Carlos Canotilho Lage

(Professor Doutor João Carlos Canotilho Lage)

O aluno

Tiago Luís Pinto

(Tiago Luís Pinto)

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial ao Professor Doutor João Carlos Canotilho Lage pela disponibilidade, pela confiança e por toda a amizade demonstrada.

À minha família pelo apoio, confiança e compreensão. E ainda, por me terem ajudado e aconselhado durante todo o meu percurso académico.

Aos meus colegas e amigos por todo o apoio e amizade.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, principalmente aos seus professores, por todo o conhecimento transmitido.

Obrigado!

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	2
ABSTRACT/RESUMO	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. CANCRO	5
3. VETORIZAÇÃO DE FÁRMACOS ATRAVÉS DE LIPOSSOMAS	6
3.1. Constituição Química e Estrutural dos Lipossomas	6
3.2. Vetorização de Fármacos	7
3.3. Vantagens dos Lipossomas como Vetores de Fármacos	8
3.4. Interações dos Lipossomas com as Células e Metabolismo <i>in vivo</i>	9
3.5. Interação do Fármaco com o Lipossoma	11
4. LIPOSSOMAS USADOS COMO VETORES DE FÁRMACOS NO TRATAMENTO DO CANCRO	12
4.1. A Evolução dos Lipossomas como Vetores de Fármacos Anticancerígenos	12
4.2. Estratégias Avançadas de Vetorização.....	15
4.2.1. Direcionamento Ativo.....	15
4.2.1.1. Direcionamento Através de Anticorpos.....	16
4.2.1.2. Direcionamento Através do Folato	17
4.2.2. Libertação Desencadeada	17
4.2.2.1. Libertação Desencadeada por Variações de pH	18
4.2.2.2. Libertação Desencadeada por Enzimas	19
4.2.2.3. Libertação Desencadeada por Hipertermia Local	19
4.2.2.4. Libertação Desencadeada Através da Radiação	20
4.3. Formulações Lipossómicas Usadas no Tratamento do Cancro Existentes no Mercado.....	21
5. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS	23
6. BIBLIOGRAFIA	25

LISTA DE ABREVIATURAS

Bis-SorbPC	1,2-bis-[10 - (20,40-hexadeciloxi)-decanoil]-sn-glicero-3-fosfocolina
CHMES	Hemisuccinato de colesterol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOPE	Diacilfosfatidiletanolamina
DPPC	1, 2 - dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DPPE	1,2-Bis(difenilfosfino)etano
DSPC	Distearoilfosfatidilcolina
EPR	Permeabilidade e retenção melhorada
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
FR	Recetor do folato
IgG	Imunoglobulina G
IV	Administração intravenosa
MPS	Sistema mononuclear fagocitário
NO	Óxido Nítrico
PE	Fosfatidiletanolamina
PEG	Poli(etilenoglicol)
RES	Sistema retículoendotelial
RFC I	Transportador de folato reduzido
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

ABSTRACT

Cancer is the leading cause of death in economically developed countries and the second in developing countries. It is estimated about 12.7 million cancer cases and 7.6 million cancer deaths in 2008. In Portugal is the second leading cause of death. Currently, anticancer chemotherapy goal is to develop drugs with targeting abilities to avoid non-specific interactions, namely with healthy tissues, as occurs in traditional treatments.

Liposomes emerged as one of the nanomedicines with the potential to provide targeted chemotherapy directed to the tumor tissue, potentially targeting tumor tissues, improving treatment efficacy and patients life quality. The first generation of liposomes were used for local delivery, while the second generation, triggered liposomes, were also able to perform a controlled drug release providing a higher spatial and temporal control of therapy.

Despite all the efforts made in this field, there is still no commercially available formulation.

RESUMO

O cancro é a principal causa de morte nos países economicamente desenvolvidos e a segunda nos países em desenvolvimento. Estima-se que ocorreram cerca de 12,7 milhões de casos de cancro e 7,6 milhões de mortes por cancro em 2008, sendo que em Portugal é a segunda maior causa de morte.

Atualmente, o objetivo da quimioterapia é o direcionamento do fármaco para o tumor, de modo a evitar interações não específicas com os tecidos sãos. Os lipossomas, surgem assim, como uma classe promissora da nanomedicina com potencial para fornecer uma quimioterapia direcionada, melhorando a eficácia e segurança do tratamento, o que se traduz numa melhoria da qualidade de vida do doente oncológico.

A primeira geração de lipossomas foi utilizada no direcionamento de fármacos para os tecidos tumorais, enquanto que a segunda geração, além de permitir o direcionamento, apresentava também a capacidade para controlar a libertação do fármaco, proporcionando um maior controlo espacial e temporal da terapia.

Apesar de todas estas novas alternativas de vetorização já serem estudadas há bastante tempo, não há nenhum medicamento para o tratamento do cancro no mercado que se baseie nelas, pelo que ainda existe um longo caminho a percorrer.

I. INTRODUÇÃO

O cancro é a principal causa de morte nos países economicamente desenvolvidos e a segunda principal causa de morte nos países em desenvolvimento. Em resposta a estes factos, a investigação oncológica tem permitido enormes progressos na prevenção, diagnóstico e tratamento do cancro.

A área da quimioterapia, que comumente se refere à quimioterapia antineoplásica, está atualmente orientada para os fármacos com marcação molecular, visando alvos específicos das células e tecidos cancerosos, em detrimento dos tratamentos de quimioterapia tradicionais, que destroem as células e inibem a divisão celular, acabando por afetar tecidos sãos. Apesar de existirem diversos fármacos de extrema qualidade, a eficácia da maior parte deles é limitada, uma vez que não conseguem atingir o local de ação terapêutico (o DNA e o RNA das células tumorais) em quantidade suficiente para exercer o seu efeito.

A quimioterapia antineoplásica consiste na utilização de medicamentos que interferem por vários mecanismos de ação com os ácidos nucleicos, levando à destruição celular.

Inicialmente, o que se valorizou como sendo a maior diferença entre células normais e células neoplásicas foi a rápida taxa de divisão das segundas, mas os fármacos disponíveis não são específicos para estas pelo que, com frequência, lesam os tecidos normais, tendo uma margem terapêutica estreita.

Desta forma, as células saudáveis (que se dividem rapidamente em circunstâncias normais) são danificadas, o que leva a uma variedade de efeitos adversos, como a depressão do sistema imunitário (mielossupressão), inflamação e ulceração das membranas mucosas que revestem o trato digestivo (mucosite), perda de cabelo (alopecia), e toxicidades específicas de órgãos (cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, etc.).

Estes efeitos tóxicos restringem as doses administradas aos doentes e os tumores que sobrevivem a estas doses mais baixas, muitas vezes, desenvolvem resistência à quimioterapia, o que torna bastante mais difícil a sua erradicação, comprometendo a vida do doente.

A maior parte dos fármacos antineoplásicos são administrados por via intravenosa, sendo diluídos, degradados, ou mesmo eliminados à medida que se deslocam através da corrente sanguínea. Consequentemente, são necessárias grandes doses destes fármacos altamente citotóxicos para a atingir os níveis terapêuticos desejados. ²⁾

O aparecimento da nanomedicina, um subcampo da nanotecnologia, onde as estruturas e ferramentas diagnósticas e terapêuticas são projetadas em nanoescala, pode fornecer a solução para os problemas de toxicidade sistêmica atualmente limitantes na quimioterapia. A capacidade para desenvolver partículas nanométricas e adaptar a sua composição, tamanho, forma, carga superficial e funcionalidade da sua superfície, tem levado a um rápido crescimento na área dos veículos de distribuição de fármacos.²⁾

Descobertos em 1961 por *Alec Bangham* e sugeridos como vetores de fármacos no tratamento do cancro por *Gregoriadis et al.* em 1974, os lipossomas são vesículas esféricas formadas por uma bicamada fosfolipídica externa e um compartimento hidrofílico interno, que se formam espontaneamente quando lípidos anfifílicos são dispersos em água. Deste modo, a sua estrutura permite aprisionar de forma estável fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos. Além disso, os lipossomas são biocompatíveis (não causam reações tóxicas, antigénicas ou alérgicas), biodegradáveis, protegem o fármaco encapsulado da inativação prematura pelo meio fisiológico e protegem o doente de possíveis efeitos adversos.^{2), 3)}

Desde que a sua utilização como vetores de fármacos antineoplásicos foi sugerida, o interesse em lipossomas aumentou e os sistemas lipossómicos estão agora a ser extensivamente estudados.

2. CANCRO

Cancro é um termo genérico utilizado para um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. A sua principal característica é a alteração de funções celulares normais como consequência de uma alteração na expressão genética.

Quando o material genético (DNA) de uma célula é danificado ou alterado, origina mutações que afetam o crescimento e proliferação das células normais, levando a uma acumulação excessiva de células que dá origem a uma massa de tecido denominada tumor. Se o tumor for benigno não é considerado canceroso, visto que pode ser removido e não se dissemina para outras partes do corpo; se for maligno é considerado canceroso, uma vez que se pode espalhar para outras partes do corpo, sendo este processo denominado como metástase. As metástases podem afetar um órgão ou função vital e por isso são consideradas a principal causa de morte por cancro.

A incidência global do cancro continua a aumentar, em grande parte devido ao crescimento e envelhecimento da população mundial, acompanhado pela crescente adoção de comportamentos de risco, especialmente o tabagismo e maus hábitos alimentares. Como tal, revela-se de extrema importância a sensibilização da população.

3. VETORIZAÇÃO DE FÁRMACOS ATRAVÉS DE LIPOSSOMAS

3.1. Constituição Química e Estrutural dos Lipossomas

Os lipossomas são estruturas esféricas (formadas espontaneamente) e compostas por bicamadas lipídicas curvas que aprisionam no seu interior parte do solvente em que flutuam livremente. Podem consistir numa ou várias membranas concêntricas e o seu tamanho varia entre 20 nanómetros a várias dezenas de micrómetros, enquanto que a espessura da membrana é cerca de 4 nanómetros. São constituídos maioritariamente por moléculas anfotéricas, uma classe de moléculas de superfície que se caracterizam por possuírem um grupo hidrofílico (solúvel em água) e um grupo hidrofóbico (insolúvel em água) na mesma molécula.

As moléculas lipídicas ordenam-se estruturalmente de acordo com a solubilidade. A parte hidrofílica, pode ser ou não carregada e deve as suas propriedades aos grupos hidroxilo (que podem formar ligações de hidrogénio com as moléculas de água), tende a ficar em contato com a água, por outro lado a parte hidrofóbica constituída normalmente por uma ou duas cadeias de ácidos gordos com 14 a 18 carbonos saturados ou insaturados (entre 1 e 4 ligações duplas) ocupa uma posição interior.

Diversos parâmetros físicos, tais como a estabilidade, a permeabilidade e a orientação das cadeias hidrogenocarbonadas vão depender do comprimento da cadeia hidrogenocarbonada e do seu grau de saturação.

Uma das estruturas de agregação mais frequentemente encontrada é a de bicamada lipídica. Na superfície de cada lado da bicamada localizam-se as cabeças polares que protegem da água as caudas não polares que estão situadas no interior da membrana.

Os lípidos mais utilizados na preparação de lipossomas são o glicerol e a esfingosina. No caso do glicerol, dois dos três grupos hidroxilo estão esterificados com ácidos gordos, enquanto que o terceiro é esterificado com ácido fosfórico, que por sua vez se pode ligar covalentemente a diferentes grupos polares, como por exemplo a colina, dando origem aos glicerofosfolípidos, neste caso, fosfatidilcolinas ou lecitinas. ⁶⁾

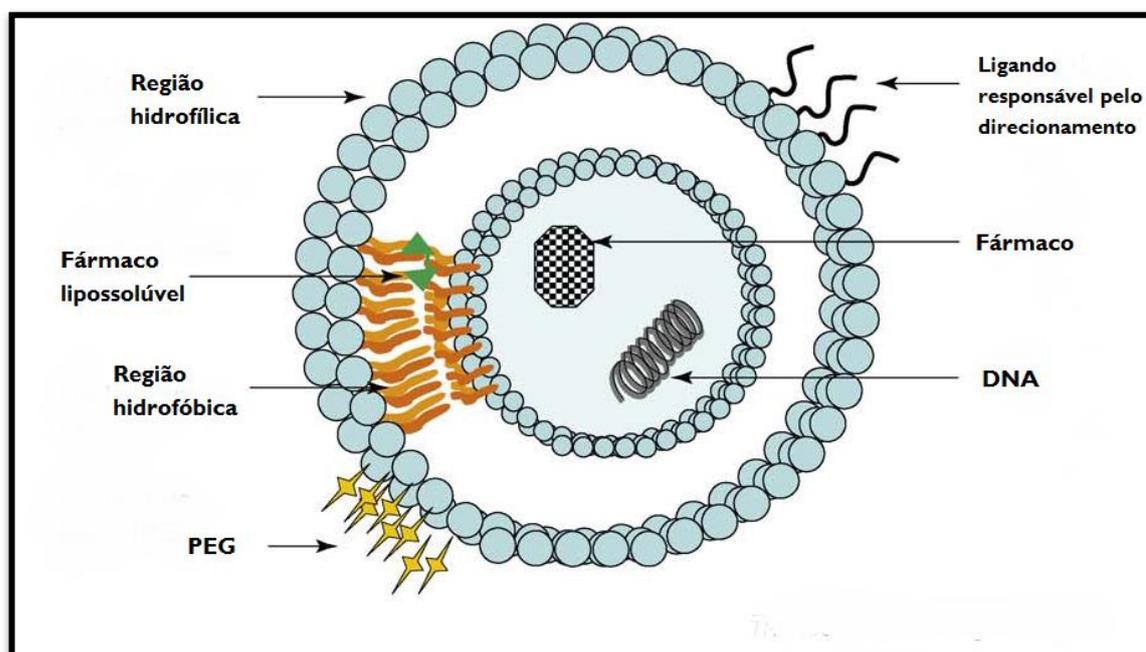


Figura 1 - Lipossoma bilaminar. A região hidrofóbica aprisiona os fármacos no núcleo central quando da preparação dos lipossomas. Na superfície exterior podem ser adicionados ligandos de direcionamento ativo ou PEG para aumentar o tempo de circulação. Adaptado de (Malam et al., 2009).¹⁰⁾

3.2. Vetorização de Fármacos

Os quatro processos fundamentais que influenciam a farmacocinética *in vivo* de um fármaco são a absorção, distribuição, metabolismo e excreção.

De acordo com uma administração oral, o fármaco tem que ser absorvido através do lúmen intestinal e não é suscetível ao metabolismo por enzimas intestinais, antes de passar pela veia porta, através da qual se dirige ao fígado e provavelmente irá sofrer o efeito de primeira passagem hepática, antes de atingir a circulação sistêmica.

Em contraste, numa administração intravenosa (IV) o fármaco é introduzido diretamente na circulação venosa, não ocorrendo absorção. Uma vez no sangue venoso, o composto pode então ser bombeado pelo coração até aos pulmões, onde pode ser eliminado no ar expirado ou por enzimas metabólicas, antes de atingir a circulação arterial. A circulação arterial irá distribuir o composto para os vários tecidos e órgãos, alguns dos quais (por exemplo, rim) podem eliminar o composto através do metabolismo e/ou excreção, para além do fígado. Assim, o acesso do composto e/ou os seus metabolitos ativos ao alvo terapêutico numa concentração suficiente para atingir um efeito terapêutico ou até tóxico, depende em grande parte de todos estes processos.

A falta de especificidade da distribuição para a área onde o fármaco irá exercer o seu efeito terapêutico fará com que este se acumule noutros órgãos ou tecidos, podendo resultar em efeitos adversos graves.⁷⁾

Posto isto, a vetorização surge como uma solução para a falta de especificidade, associando ao fármaco, química ou fisicamente, um agente apropriado, denominado vetor. Esse vetor pode ser considerado como uma parte da estrutura de um composto bioativo, que é responsável pelo seu comportamento farmacocinético e destino metabólico, sendo então escolhido em função de um determinado objetivo terapêutico. O que se pretende com a utilização do vetor é, por um lado, proteger o fármaco até que ele atinga o alvo terapêutico e por outro, favorecer a sua acumulação nesse mesmo local.^{8), 9)}

3.3. Vantagens dos Lipossomas como Vetores de Fármacos

Com a utilização dos lipossomas como vetores pretende-se essencialmente promover a sua libertação no tecido alvo, de modo a aumentar a eficácia do fármaco encapsulado e a proteção dos tecidos saudáveis. Para atingir os objetivos pretendidos, os lipossomas oferecem uma série de potencialidades que os torna vetores de excelência, nomeadamente:

- São biocompatíveis (não causam reações tóxicas, antigénicas ou alérgicas) pois possuem uma constituição semelhante à das membranas biológicas;²⁾
- São biodegradáveis;²⁾
- Protegem o fármaco encapsulado da inativação prematura pelo meio fisiológico e protegem o doente dos efeitos adversos do fármaco;²⁾
- Permitem uma melhor penetração celular, através de diferentes mecanismos, como a fusão da membrana lipossómica com a membrana plasmática celular;¹¹⁾
- Possibilidade de direcionar de forma seletiva o fármaco para o seu alvo, evitando os efeitos secundários relacionados com os efeitos nos tecidos saudáveis e aumentando a absorção do fármaco pelas células-alvo;¹¹⁾
- Possibilidade de alteração das suas propriedades físico químicas (tamanho, composição), adequando-as à ação pretendida. Por exemplo, a modificação da superfície dos lipossomas por revestimento com PEG poli(etilenoglicol) prolonga o tempo de circulação sanguínea e aumenta o tempo de semi-vida;⁸⁾
- A sua estrutura permite encapsular fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos;¹²⁾
- Têm a capacidade de incluir vários princípios ativos.¹¹⁾

O tipo de lipossoma é escolhido em função da molécula a veicular e em função do alvo terapêutico, podendo-se ajustar a sua composição lipídica e o revestimento da sua superfície.

3.4. Interações dos Lipossomas com as Células e Metabolismo *in vivo*

As interações dos lipossomas com as células (Figura 2.) são de grande interesse biológico e revelam-se extremamente importantes na vetorização de fármacos. Podem-se distinguir quatro categorias de interações: (i) troca de lípidos e proteínas com as membranas celulares, podendo resultar na destabilização do lipossoma e libertação do fármaco no citoplasma por micropinocitose; (ii) adsorção ou ligação dos lipossomas às células; (iii) endocitose, talvez o processo mais comum, em que depois de adsorvidos na superfície celular, os lipossomas são engolidos em endossomas, sendo que o fármaco pode ser libertado a partir do endossoma ou acabar nos lisossomas. Neste caso, se o conteúdo dos lipossomas não for afetado pelo pH e pela atividade enzimática no lisossoma, o fármaco acaba por ser libertado no citoplasma. E por fim, (iv) fusão da superfície da bicamada lipídica do lipossoma com a membrana celular. O modelo original da libertação celular do fármaco vislumbrava a fusão dos lipossomas com as membranas celulares, libertando diretamente o seu conteúdo no citoplasma, mas na realidade este processo é raro, visto que é fortemente controlado pelas proteínas das membranas celulares. Uma das soluções proposta consiste na incorporação de proteínas de superfície virais, indutoras do processo de fusão, nos lipossomas, dando origem aos chamados virossomas. Em todas as interações, existe uma grande dependência da composição lipídica, tipo de célula, presença de recetores específicos e outros parâmetros.

No que toca à eliminação dos lipossomas, os macrófagos têm um papel fundamental. São células que podem atuar como apresentadores de antígenos, secretar fatores que regulam a ação de outras células ou adquirir a capacidade de atacar agentes patogénicos, pelo que a sua função mais elementar é a absorção de partículas estranhas da circulação.

Existem diversos tipos de macrófagos, localizados em diversos órgãos ou presentes na corrente sanguínea como monócitos, sendo conhecidos como o sistema retículoendotelial (RES) ou como sistema mononuclear fagocitário (MPS). Na sua superfície, contêm ligandos seletivos, específicos para recetores glicoconjugados (o fragmento Fc das IgG e possivelmente até para recetores específicos de lípidos). Depois de reconhecerem o agente estranho, este é engolido por fagocitose.

Os fármacos vetorizados por lipossomas são normalmente administrados por via intravenosa, ou seja, entram diretamente na corrente sanguínea. Depois disso, ocorrem predominantemente duas reações: interação com as lipoproteínas e opsonização. A primeira envolve a troca de lípidos e, possivelmente, a desintegração dos lipossomas, enquanto que a segunda é a adsorção, intercalação ou ligação eletrostática de macromoléculas marcadas, como as imunoglobulinas, na superfície dos lipossomas que após a interação com o recetor do macrófago resulta na sua eliminação. As células fagocíticas mais comuns são as células de Kupffer no fígado e os macrófagos do baço. A interação com as proteínas do plasma, tal como a opsonização, depende do tamanho, da carga de superfície e da composição do lipossoma. A maioria do lipossomas acaba nas células do MPS à exceção dos mais pequenos que conseguem extravasar pelas fenestrações até ao interior da célula, e dos maiores que ficam presos nos primeiros capilares. ¹³⁾

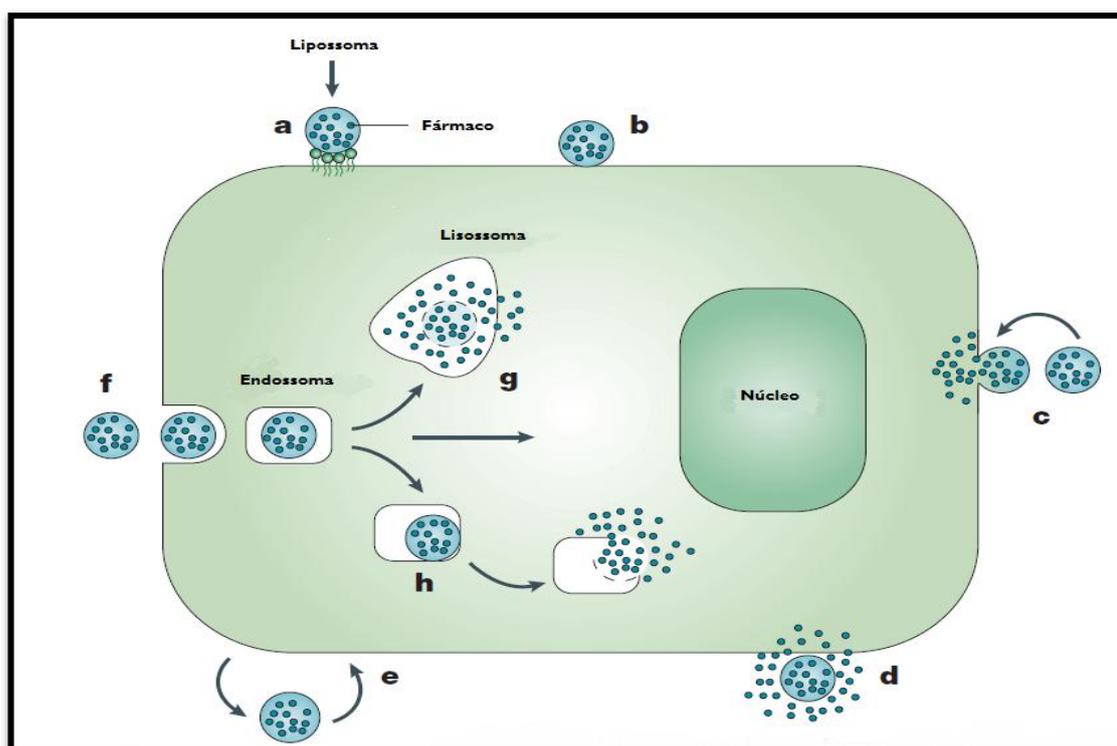


Figura 2 - Interações Lipossoma-Célula. Adsorção específica (a) e não específica (b) à superfície celular. Fusão do lipossoma com a membrana celular (c). Destabilização do lipossoma por componentes da membrana celular (o fármaco atinge o citoplasma por micropinocitose) (d). Troca de lípidos com a membrana (e). Endocitose (f), sendo que o lipossoma pode acabar no lisossoma (g) ou pode provocar a destabilização do endossoma e ser libertado no citoplasma através deste (h). Adaptado de (Torchilin, 2005). ²⁵⁾

3.5. Interação do Fármaco com o Lipossoma

Os fatores mais importantes que ditam a escolha do tipo de lipossoma a utilizar como vetor, são as características físico-químicas do fármaco e o seu modo de ação. Assim, é crucial perceber de que forma se estabelece a interação entre ambos, tirando o máximo partido das suas características (Figura 3).

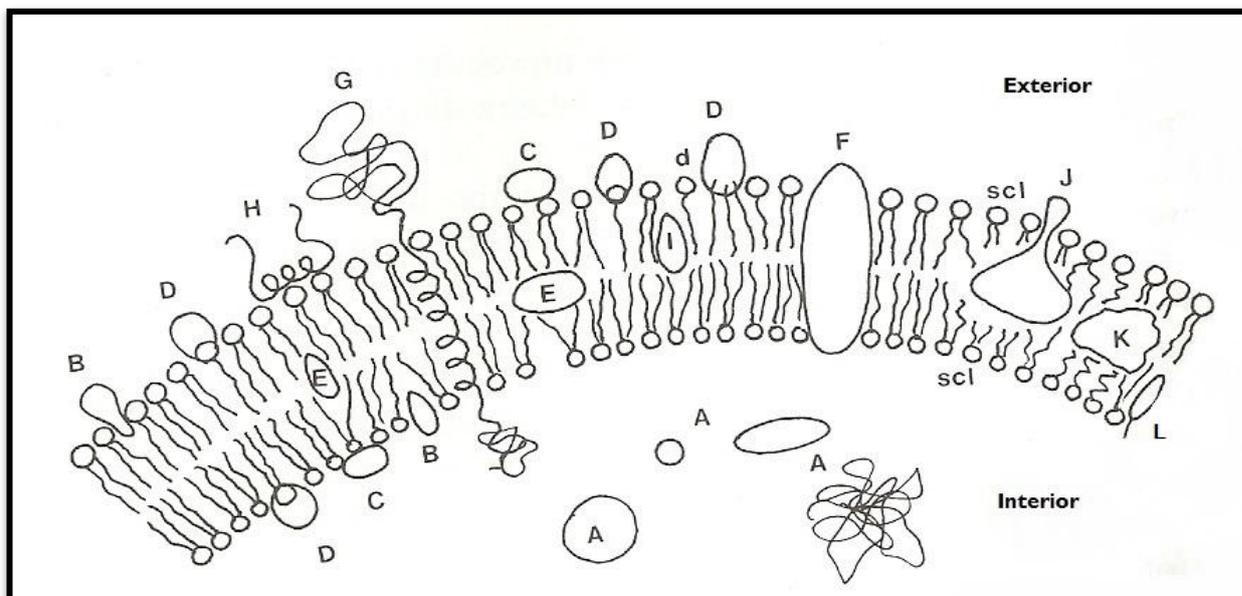


Figura 3 - Representação esquemática das interações entre o lipossoma e o fármaco. (A) internalização física do fármaco no interior hidrofílico do lipossoma; (B) fármaco intercalado na região hidrofóbica; (C) adsorção na superfície; (D) fixação pela cauda hidrofóbica; (E) ligação química à região polar; (F) e (G) associação hidrofóbica com a bicamada; (H) adsorção parcial; (J) e (K) a incorporação de certas moléculas mais difíceis de encapsular pode ser melhorada pela inclusão de lípidos com características específicas, lípidos pequenos de cadeia dupla (scl) e lípidos insaturados de cadeia única (d); (L) algumas moléculas podem ser encapsuladas formando previamente um complexo com um determinado composto, esterol, fosfolípido, que se vai ligar química ou fisicamente à bicamada do lipossoma. No primeiro caso a ligação normalmente é iónica; no segundo a ligação é hidrofóbica ou de van der Waals. Adaptado de (D. Lasic, 1993).¹⁴

Os fármacos hidrossolúveis podem ser fisicamente armazenados em compartimentos interiores, dissolvidos na membrana, intercalados na região polar, ancorados na bicamada através da cadeia de ácidos gordos e física ou quimicamente ligados à região polar. Estas interações dão-se em função das características de solubilidade e polaridade.

No caso de fármacos lipossolúveis, a única possibilidade para a sua incorporação é na região hidrofóbica dos lipossomas. Normalmente, são co-depositados com o lípido num sistema de solvente apropriado e com hidratação dos filmes mistos lípido-fármaco, sendo encapsulados na membrana.

Relativamente aos fármacos hidrossolúveis, no processo mais simples o fármaco é encapsulado automaticamente, apesar da baixa eficácia. O método clássico consiste na hidratação de um filme seco de lípido com a solução aquosa do fármaco, seguido de tratamento (sonicação ou extrusões). Posteriormente remove-se o fármaco não encapsulado através de diálise, filtração, ultra-filtração e troca iónica, esta última no caso de fármacos carregados. A grande limitação desta técnica é a baixa percentagem de fármaco encapsulado.

A libertação do fármaco dos lipossomas pode revelar-se um problema, pois em muitos casos, o fármaco chega ao local desejado, mas está inativo porque não se consegue libertar do lipossoma. Existem duas alternativas para contornar este problema: ou a estrutura do lipossoma é, de certa forma, permeável e permite a libertação do fármaco ao fim de algum tempo, sendo possível escolher os constituintes do lipossoma em função do tempo e percentagem de libertação; ou então a libertação é estimulada por fatores internos (alterações de pH) ou externos (hipertermia).¹⁴⁾

4. LIPOSSOMAS USADOS COMO VETORES DE FÁRMACOS NO TRATAMENTO DO CANCRO

4.1. A Evolução dos Lipossomas como Vetores de Fármacos Anticancerígenos

Mesmo com o sucesso da indústria farmacêutica na descoberta de novos fármacos antineoplásicos, o cancro causa mais de 6 milhões de mortes por ano em todo o mundo e o número continua a aumentar.³⁾

Como já foi referido anteriormente, o uso clínico da maioria dos agentes quimioterapêuticos convencionais é frequentemente limitado, devido ao fornecimento inadequado de concentrações terapêuticas de fármaco para o tumor ou devido a efeitos tóxicos graves e nocivos para os órgãos sãos. Por conseguinte, é importante o desenvolvimento de novas tecnologias que possibilitem a entrega de fármacos diretamente nos tumores e, assim, melhorar o índice terapêutico dos fármacos transportados.³⁾

Os lipossomas foram sugeridos como vetores de fármacos antineoplásicos por *Gregoriadis et al.* em 1974. Desde então, o interesse em lipossomas aumentou e os sistemas lipossomais estão agora a ser extensivamente estudados. Devem ser cumpridos três requisitos básicos para que os lipossomas sejam bem-sucedidos como vetores de fármacos: prolongamento da permanência do fármaco na circulação sanguínea; acumulação suficiente

no tumor (com uma libertação controlada) e absorção pelas células tumorais, com um perfil de libertação compatível com a farmacodinâmica do fármaco.³⁾

Inicialmente, a pesquisa de sistemas de vetorização de fármacos lipossômicos teve como principal entrave a rápida eliminação pelo sistema mononuclear fagocitário (MPS). Reconheceu-se que o tamanho das partículas, a carga de superfície e a composição dos lipossomas tinham uma forte influência sobre o perfil de eliminação. No entanto, os lipossomas só foram totalmente considerados como verdadeiros candidatos a vetores quando foi descoberto que, ao serem revestidos com o polímero sintético de poli(etilenoglicol) (PEG), tinham uma semi-vida no sangue significativamente maior.³⁾

Os lipossomas que contêm PEG circulam no sangue durante um longo período de tempo, devido a uma superfície altamente hidratada e protegida (constituída por polímeros hidrofílicos que inibem a adsorção a proteínas e a opsonização). Resolvidos os problemas com a rápida opsonização e conseqüente eliminação, foi possível obter lipossomas com um máximo de 72 horas de semi-vida no sangue. O próximo desafio foi obter lipossomas com capacidade de se acumular no tecido tumoral, quer por difusão passiva, quer por transporte ativo.³⁾

A maioria dos tumores sólidos possui características fisiopatológicas únicas que não são observadas em tecidos normais, como a extensa angiogênese (que resulta numa hipervascularização), a arquitetura vascular defeituosa, um sistema de drenagem/recuperação linfática deficiente e o aumento da produção de uma série de mediadores de permeabilidade (VEGF, NO, bradicinina, etc.). Este conjunto de fenômenos é conhecido como efeito EPR (permeabilidade e retenção melhorada), que fornece uma grande oportunidade para um direcionamento mais seletivo e para o aumento da acumulação do fármaco no tumor.²⁴⁾

Assim, os lipossomas que se mantêm em circulação durante um longo período de tempo, acumulam-se de forma significativa nos tumores, devido essencialmente à vascularização permeável e à falta de um sistema de drenagem linfática eficaz resultantes do efeito EPR. No entanto, a microvasculatura do tecido tumoral não é muito uniforme. As dimensões dos poros na vasculatura do tumor sólido podem variar entre 100-780 nm, o que é muito maior do que as junções do tecido normal, em que as aberturas são geralmente inferiores a 6 nm. Os lipossomas são, geralmente, demasiado grandes para a filtração glomerular, porém, os macrófagos do fígado e do baço removem-nos da circulação. Ao revestir a superfície de lipossomas com PEG, a remoção dos lipossomas da circulação sistêmica pelos macrófagos pode ser retardada acabando por permanecer no tecido tumoral devido à fraca drenagem linfática. Isto resulta numa acumulação de lipossomas seletiva nos

tumores através de difusão passiva. Contudo, a permeabilidade vascular nos tumores é heterogênea, relacionando-se com o tipo de tumor e o microambiente tumoral. Os tumores sólidos são, portanto, muito heterogêneos em termos de vascularização e nem todos os sistemas lipossômicos são eficazes no seu tratamento.

A biodisponibilidade do fármaco no tumor depende também da libertação do fármaco a partir dos lipossomas. Alterações farmacocinéticas influenciam a toxicidade e a eficácia dos lipossomas na entrega de fármacos. Por isso, é importante compreender a farmacocinética dos lipossomas e farmacodinâmica do fármaco, com o objetivo de desenvolver sistemas de vetorização de fármacos lipossômicos que libertem os fármacos especificamente no tecido tumoral, com uma taxa de libertação que coincida com o perfil de eficácia do fármaco transportado. Além disso, o modo como o fármaco é internalizado pela célula tumoral influencia a sua eficácia e o método utilizado para a incorporação do fármaco no lipossoma pode ser um fator importante, a este respeito. Essa interação não é facilmente obtida, embora os sistemas lipossômicos possam oferecer as ferramentas necessárias para conseguir uma libertação controlada de fármacos.

Apesar dos avanços significativos no sentido de ultrapassar muitas das barreiras dos sistemas de vetorização lipossômicos, um problema indescritível e paradoxal que ainda continua por resolver é como obter uma elevada biodisponibilidade do fármaco em locais específicos do tecido canceroso, enquanto se mantém a estabilidade dos lipossomas na circulação sanguínea.

Há dois caminhos gerais a serem seguidos no âmbito da investigação deste tipo de formulações: (i) a libertação específica do fármaco no tumor (direcionamento) que pode ser conseguida através do revestimento dos lipossomas com ligandos ou anticorpos que têm como alvo recetores sobre-expressos no tecido tumoral. Este método pode também, eventualmente, ser utilizado para afastar um fármaco das áreas do corpo que são particularmente sensíveis à ação tóxica do produto transportado. A outra hipótese (ii) será a libertação desencadeada. Ao incorporar nos lipossomas um mecanismo de libertação ativa e específica para um determinado local, é possível aumentar a libertação e a eficácia terapêutica do fármaco. ^{2), 3), 10)}

4.2. Estratégias Avançadas de Vetorização

4.2.1. Direcionamento Ativo

A investigação na área da vetorização de fármacos deu um grande passo com a descoberta dos lipossomas de longa circulação (ou seja, que permanecem na circulação durante um longo período de tempo) com capacidade de acumulação no tecido tumoral, onde as moléculas encapsuladas se libertam dos lipossomas por difusão passiva, a menos que haja a presença de um estímulo ativo para a sua libertação.

Embora as estratégias de direcionamento ativo possam parecer promissoras, existem obstáculos conceituais que precisam ser abordados. Um melhor efeito terapêutico não é, necessariamente, uma consequência do aumento da acumulação das formulações lipossómicas no tecido.

Existem vários problemas críticos: (i) quando os lipossomas se acumulam no compartimento intersticial devido ao extravasamento e se ligam à primeira linha de células-alvo através de fortes ligações, podem impedir que mais lipossomas se liguem. A internalização por endocitose é a estratégia normalmente associada ao direcionamento ativo, assim (ii) o fármaco tem que “escapar” dos endossomas/lipossomas antes de ser degradado, um processo que pode depender do método de encapsulação do fármaco.

Vários artigos descreveram métodos potenciais para o direcionamento ativo, entre os quais estão anticorpos específicos acoplados a lipossomas, bem como os lipossomas revestidos com ligandos específicos para proteínas expressas na membrana das células cancerosas ou de células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos recentemente formados no tumor. Exemplos de tais proteínas são os recetores do folato, sobre-expressos na superfície das células tumorais em crescimento, devido ao aumento das exigências para a síntese de DNA e o recetor de superfície da integrina, expressa nas células endoteliais da neovasculatura de tumores em crescimento.³⁾

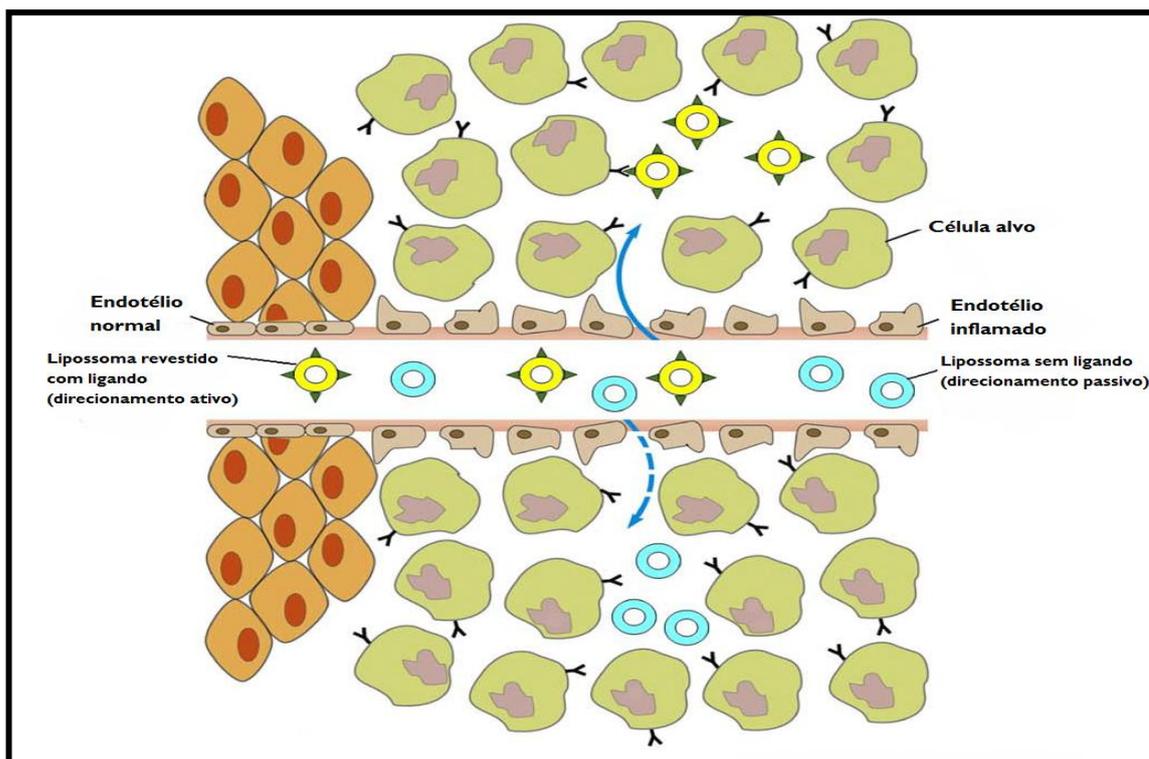


Figura 4 - Direcionamento ativo e passivo através de lipossomas. No tecido tumoral, em que o endotélio está inflamado, mediadores, tais como bradicinina, fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e prostaglandinas aumentam a permeabilidade endotelial. Os lipossomas passam através dos espaços intercelulares e entram no fluído intersticial. O direcionamento ativo é alcançado através da conjugação de ligandos na superfície dos lipossomas que se ligam a um recetor específico de célula alvo, o que leva à libertação do fármaco. O direcionamento passivo pode ser mediado pela libertação através da elevada concentração local do fármaco. Adaptado de (Malam et al., 2009).¹⁰⁾

4.2.1.1. Direcionamento Através de Anticorpos

Lipossomas revestidos com anticorpos (imunolipossomas) têm sido extensivamente estudados, quer com o anticorpo ligado diretamente à cabeça polar do fosfolípido da bicamada do lipossoma quer ao terminal do polímero de PEG (no caso dos lipossomas com PEG). Esta última abordagem tem sido melhor sucedida, devido a uma melhor acessibilidade do anticorpo ao seu alvo, mantendo as características de longa circulação fornecidas pelo PEG. No entanto, a ligação de anticorpos diretamente à superfície do lipossoma também tem mostrado ser um método viável.

O revestimento dos lipossomas com anticorpos dirigidos contra alvos associados a tumores consiste, por um lado, num bom equilíbrio entre o revestimento com um número suficiente de anticorpos para atingir a ligação no alvo e a retenção no tumor e por outro, na diminuição da eliminação pelo MPS, com um aumento do número de anticorpos por

lipossomas. Os imunolipossomas podem ser direcionados para as moléculas de superfície expressas, ou no sistema vascular ou nas membranas das células tumorais. Os locais mais acessíveis são a superfície do endotélio vascular de tumores em crescimento e as células em circulação relacionadas com o sistema imunitário.³⁾

4.2.1.2. Direcionamento Através do Folato

O ácido fólico é uma vitamina essencial para a biossíntese de nucleótidos. É consumido em quantidades elevadas pelas células em proliferação e é transportado através da membrana plasmática, utilizando o transportador de folato reduzido (RFCI) associado à membrana de folato ou o recetor do folato (FR). Presume-se que o RFCI é capaz de internalizar o folato necessário em células normais, no entanto, o FR é frequentemente sobre-expresso em células tumorais, como consequência do aumento das necessidades de folato, sendo que aumenta com o avanço das fases da doença.

Experiências *in vitro* utilizando lipossomas revestidos com folato contendo doxorubicina, têm mostrado que as células *KB* e *HeLa* (linhas celulares do carcinoma nasofaríngeo epidérmico e do carcinoma cervical, respetivamente)¹⁹⁾ que sobre-expressam o FR, apresentam uma absorção significativa do fármaco. Este tipo de formulações tem-se mostrado eficaz na vetorização de doxorubicina *in vivo* e são consideradas potenciais candidatas para a criação de lipossomas com acumulação tumoral aumentada, permitindo a ligação do folato às cadeias terminais do PEG, conferindo a flexibilidade necessária para interação com os recetores alvo. Por outro lado, são compatíveis com o uso de libertação desencadeada, por exemplo, a libertação do fármaco do lipossoma desencadeada por diminuição do pH.^{3), 22)}

4.2.2. Libertação Desencadeada

O uso do direcionamento específico ainda não foi suficiente para se obter um aumento significativo da eficácia no tratamento do cancro, quando comparado com a acumulação passiva (lipossomas com PEG). Isto pode ser o resultado da captação destrutiva dos lipossomas pelas células alvo. A degradação nos lipossomas é o principal destino dos fármacos vetorizados por lipossomas através de estratégias de direcionamento ativo, a não ser que tenha sido incorporado um mecanismo que permita que o fármaco se liberte dos lipossomas e atinja o citoplasma.¹⁵⁾

No entanto, a degradação dos fármacos depende também da sua estabilidade química. Por exemplo, as antraciclina são muito estáveis em meio ácido e podem assim ter uma

semi-vida longa nos endossomas/lisossomas. A estabilidade química e metabólica dos fármacos é, portanto, muito importante e deve ser considerada em relação às estratégias de direcionamento e libertação desencadeada. Várias estratégias têm sido propostas para promover a libertação de um fármaco num local específico mediante um estímulo. A libertação de fármacos vetorizados por lipossomas desencadeada por alterações de pH, hipertermia e radiação têm-se mostrado bastante promissoras. No entanto, lipossomas projetados com estes mecanismos ainda não atingiram o mercado farmacêutico.³⁾

4.2.2.1. Libertação Desencadeada por Variações de pH

A estratégia original de usar o microambiente ácido característico dos tumores para a libertação desencadeada não tem sido muito bem-sucedida, visto que nestes a área de maior acidez está distante da área vascularizada, e assim os lipossomas não conseguem alcançar este tecido. Além disso, o pH do interstício do tumor raramente está abaixo de 6,5, tornando-se tecnicamente difícil desenvolver lipossomas que sejam estáveis no sangue e que se desintegram no tecido tumoral. Uma estratégia mais viável será explorar o ambiente muito ácido dos lisossomas, onde o pH é inferior a 5,0.

O método mais biocompatível para a libertação de fármacos diretamente no citoplasma das células é a utilização de lipossomas sensíveis ao pH. Após a captação celular, os lipossomas são sujeitos a um ambiente muito ácido no interior dos lisossomas, onde o transportador e o fármaco são degradados por enzimas metabólicas. Para evitar a degradação lisossomal do fármaco transportado, este tem de “escapar” dos endossomas depois de internalizado. Para tal, surgiram os lipossomas fusogénicos, que depois de internalizados pela célula sofrem uma mudança morfológica promovida pela alteração do pH, que consiste numa transição de fase onde a bicamada lipídica, *La*, passa a hexagonal, *HII*.³⁾

A principal estratégia de formulação passa por estabilizar o DOPE, através da intercalação de moléculas anfífilicas (por exemplo, CHEMS) que contêm um grupo ácido protonável (negativamente carregados a pH fisiológico). Este favorece a repulsão eletrostática e permite a formação de estruturas de bicamada, o que origina lipossomas a pH e temperatura fisiológicos, uma vez que o DOPE não tem a capacidade de formar lipossomas sem ser estabilizado. Em meio ácido, as moléculas anfífilicas ficam protonadas, destabilizando o lipossoma que perde a sua estrutura de bicamada e adquire uma forma fusogénica (hexagonal *HII*).

Os mecanismos de libertação do fármaco propostos são dois: (i) a destabilização dos lipossomas sensíveis ao pH, o que provoca a destabilização da membrana do endossoma,

presumivelmente através de formação de poros, levando à entrega citoplasmática do seu conteúdo ou então, (ii) após a destabilização do lipossoma, as moléculas encapsuladas difundem para o citoplasma, através da membrana endossômica.^{3), 18)}

4.2.2.2. Liberação Desencadeada por Enzimas

O uso de enzimas para a liberação de fármacos num local específico é, provavelmente, a estratégia mais intrigante. Proteases celulares têm sido sugeridas como possíveis candidatas para desencadear a liberação do fármaco dos lipossomas.

Foram sugeridas duas estratégias para a construção de conjugados lipídicos que são ativados por proteases. Uma delas baseia-se na clivagem do conjugado lipídico, resultando na formação de lípidos fusogénicos que desestabilizam o lipossoma. A outra envolve conjugados lipídicos que atuam como componentes de camuflagem que protegem outros lípidos fusogénicos, dentro da membrana do lipossoma, até a clivagem enzimática remover o conjugado. Existem estudos que demonstraram a viabilidade do uso da elastase como a enzima alvo.

Outra alternativa consiste no uso de lipossomas sensíveis à fosfatase alcalina. Lipossomas constituídos por derivados de fosfato de colesterol e DOPE podem entrar em colapso após a remoção do grupo fosfato catalisada pela fosfatase. Como suporte a esta abordagem existe o facto de formas da fosfatase ligadas à membrana serem sobre-expressas em tecidos tumorais.³⁾

4.2.2.3. Liberação Desencadeada por Hipertermia Local

A hipertermia local consiste na aplicação de energia externa, através de microondas, ultra-som ou radiofrequência, numa região do corpo (por exemplo um tumor sólido), para elevar a temperatura local acima do normal, entre 40 e 42°C.

A estratégia consiste em projetar lipossomas com a principal fase de transição um pouco acima da temperatura fisiológica, de modo a que o aumento da temperatura promova uma alteração no estado físico do lipossoma, conduzindo a uma permeabilidade aumentada da membrana de encapsulação e a uma rápida liberação do fármaco. Uma vez que a sua temperatura de transição (41.5°C) está pouco acima da temperatura corporal, o DPPC é considerado como o lípido ideal para a liberação desencadeada por hipertermia.

Contudo, os lipossomas compostos apenas por DPPC não demonstraram muita eficácia, pelo que foi sugerida a adição de outros lípidos (principalmente DSPC), com o

intuito de aumentar a quantidade de fármaco libertada. A partir, daqui várias outras formulações com base nesta composição foram concebidas.

Estudos *in vivo* com fármacos antitumorais, como a doxorubicina, cisplatina e o metotrexato, demonstraram que a utilização de vetores lipossómicos combinados com hipertermia apresenta vantagens em relação às formulações convencionais, nomeadamente na quantidade de fármaco libertada no tecido alvo, traduzindo-se num aumento da eficácia terapêutica.¹⁶⁾

A hipertermia, atuando tanto no lipossoma como na fisiologia do tecido tumoral, proporciona uma série de características de desempenho que são compatíveis com a tarefa de direcionar e libertar grandes quantidades de fármaco no tumor, promovendo a regressão do mesmo. Essas características incluem: (i) aumento do fluxo sanguíneo do tumor e aumento da permeabilidade microvascular; (ii) o aumento do extravasamento, proporcionando um mecanismo de acumulação local de lipossomas; (iii) a transição de fase lipídica é reversível, ou seja, os lipossomas selam novamente, quando a temperatura diminui até à temperatura corporal e assim os fármacos que não são sujeitos ao aquecimento não são libertados do lipossoma e, conseqüentemente, não são libertados noutras partes do corpo; e (iv) são capazes de libertar quantidades significativas de fármaco cerca de vinte segundos após atingirem a temperatura de transição de fase.^{3), 16)}

A principal desvantagem da hipertermia é a incapacidade de tratar o cancro metastático. A maioria dos doentes com cancro morre devido às metástases e não ao próprio tumor primário. A utilização de hipertermia requer que a localização do tumor seja bem conhecida e acessível, o que faz com que seja limitada a tumores facilmente alcançáveis e que não podem ser removidos cirurgicamente.³⁾

4.2.2.4. Libertação Desencadeada Através da Radiação

Os lipossomas podem ser fotossensíveis se forem utilizados lípidos que possam isomerizar, fragmentar-se ou polimerizar sob foto excitação. No que toca às estratégias de desencadeamento da libertação através da radiação, pode-se destacar a fotopolimerização e a foto-oxidação.

No caso da fotopolimerização, existe uma formulação PEG-lipossoma contendo bis-SorbPC, um lípido fotossensível que forma uma rede lipídica após a exposição à luz UV, o que vai originar buracos na membrana lipossómica, facilitando a libertação do fármaco. No entanto, a utilização de luz ultravioleta não é muito apropriada para aplicações biológicas, devido aos danos que pode causar ao tecido saudável e é, portanto, desejável usar luz com

um comprimento de onda mais longo. Isto foi conseguido através da incorporação de um corante de cianina, tornando a formulação sensível à luz visível.^{3), 17)}

Outra estratégia é a fotoxidação do plasmalogenio, que se baseia no aumento da permeabilidade da membrana lipossómica após clivagem fotooxidativa da plasmenilcolina a agentes tensoativos de cadeia única.^{3), 17)} Uma limitação deste método é o facto de exigir a localização do tumor, o que pode ser problemático.³⁾

4.3. Formulações Lipossómicas Usadas no Tratamento do Cancro Existentes no Mercado

Medicamento (Princípio Ativo)	Principais Características de Formulação	Problemas Associados
Doxil[®] (Doxorrubicina)	<ul style="list-style-type: none"> Elevada capacidade de transporte de fármaco (10000-15000 moléculas por lipossoma); Revestimento com PEG para evitar o MPS; Cristalização do fármaco no lipossoma que minimiza a sua perda durante a circulação; 	<ul style="list-style-type: none"> Toxicidade e efeitos adversos a nível cardíaco.
DaunoXome[®] (Daunorubicina)	<ul style="list-style-type: none"> Não peguilado, facilmente capturados pelo MPS. 	<ul style="list-style-type: none"> Toxicidade e efeitos adversos a nível cardíaco.
Marqibo[®] (Vincristina)	<ul style="list-style-type: none"> Não peguilado, facilmente capturados pelo MPS. 	<ul style="list-style-type: none"> Toxicidade e efeitos adversos a nível cardíaco.

Tabela I - Fármacos aprovados pela FDA e principais características. Adaptado de (Dawidczyk et al., 2014).²¹⁾

Existem três formulações lipossómicas no mercado aprovadas pela FDA (Doxil[®], DaunoXome[®], Marqibo[®]) e duas aprovadas fora dos EUA, o Myocet[®] e o Caelyx[®]. O Doxil[®] e Myocet[®] são formulações lipossómicas de doxorubicina, o DaunoXome[®] de daunorubicina e o Marqibo[®] de vincristina. O Doxil[®] é comercializado como Caelyx[®] fora dos EUA e o Myocet[®] é uma formulação sem PEG de doxorubicina também comercializada fora dos EUA.

O Doxil[®] foi aprovado pela FDA para o sarcoma de Kaposi relacionado com a SIDA em 1995, para o cancro do ovário em 1999 e para o mieloma múltiplo em 2007. Em 2013, o uso da versão genérica Lipodox[®] foi aprovado para o tratamento do cancro do ovário e sarcoma de Kaposi. O DaunoXome[®] foi aprovado pela FDA, em 1996, para o tratamento do sarcoma de Kaposi, o Marqibo[®] para a leucemia em 2012 e o Myocet[®] é comercializado fora dos EUA para o tratamento do cancro da mama.

Relativamente ao Doxil[®], a sua formulação consiste na combinação de fosfatidilcolina de soja totalmente hidrogenada (HSPC), colesterol e um lípido com o PEG como grupo principal (DSPE-PEG2k), que reveste o lipossoma e inibe a opsonização (evitando a ação do MPS). Este revestimento também permite um longo período de circulação sistémica (3-4 dias) e é essencial para a acumulação no tumor. Alguns estudos referem que a sua excelente acumulação no tecido tumoral é devida ao efeito EPR, mas o seu mecanismo de libertação não é bem conhecido.

O DaunoXome[®], o Marqibo[®] e o Myocet[®] não contêm PEG, acabando por ter tempos de semi-vida mais curtos em relação ao Doxil[®], uma vez que são capturados pelo MPS muito mais rapidamente. ²¹⁾

Os requisitos essenciais e as novas estratégias para a formulação de vetores lipossómicos estão descritos na Tabela 2.

Função	Requisitos	Novas Estratégias
Circulação	<ul style="list-style-type: none"> Estável em fluxo a 37°C 	<ul style="list-style-type: none"> Evitar a opsonização
Distribuição	<ul style="list-style-type: none"> Minimizar o volume tecidual Minimizar a ligação ao endotélio Minimizar o transporte paracelular 	
Eliminação	<ul style="list-style-type: none"> Minimizar a opsonização Minimizar o reconhecimento pelas células do MPS Maximizar a rápida eliminação renal 	<ul style="list-style-type: none"> Revestimento com PEG Diâmetro superior a 8 nm para evitar a eliminação renal
Acumulação no Tumor	<ul style="list-style-type: none"> Maximizar o extravasamento através da vasculatura do tumor 	<ul style="list-style-type: none"> Diâmetro inferior a 200 nm para o transporte através da vasculatura permeável do tumor via efeito EPR Manutenção de altas concentrações plasmáticas Aumento do efeito ER
Internalização pelas células tumorais	<ul style="list-style-type: none"> Maximizar a ligação e internalização pelas células tumorais 	<ul style="list-style-type: none"> Direcionamento ativo Libertação desencadeada
Libertação do fármaco	<ul style="list-style-type: none"> Libertação do fármaco Passagem para o compartimento celular 	<ul style="list-style-type: none"> Maximizar a relação lipossoma-fármaco vetorizado Maximizar a fuga dos endossomas pelas moléculas internalizadas por endocitose

Tabela 2 - Principais critérios para o desenvolvimento de formulações lipossómicas e perspetivas futuras. (Dawidczyk et al., 2014). ²¹⁾

5. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Desde a década de 70 tem sido realizada investigação de forma a otimizar a utilização dos transportadores lipossómicos no tratamento de várias doenças.

O cancro é doença em que têm sido feitos esforços consideráveis para utilizar este tipo de formulações, com o objetivo de aumentar a eficácia e diminuir a toxicidade dos agentes terapêuticos usados no seu tratamento. Têm aparecido no mercado alguns veículos de fármacos, no entanto, o sucesso clínico, no que diz respeito à sua eficácia quando comparado com o fármaco livre, é limitado, apesar de melhorarem os perfis de toxicidade.

Ao contrário do que acontece com os sistemas de transporte lipossómicos, os fármacos convencionais mostram uma capacidade limitada para atingir os locais alvo. Ao resolver os problemas de circulação sanguínea dos lipossomas, foi possível obter a acumulação desejada nos locais alvo por difusão passiva. Depois de ultrapassada essa limitação, os esforços direcionaram-se para a tentativa de aumentar a acumulação nos tecidos através do direcionamento ativo, com algum sucesso.

É muito provável que as estratégias destinadas a melhorar a acumulação e a internalização por revestimento dos lipossomas com anticorpos ou outros ligandos, possam melhorar significativamente a biodisponibilidade do lipossoma no futuro. No entanto, mesmo que os lipossomas se acumulem ou se internalizem com um grau mais elevado, isso não resulta necessariamente num aumento da biodisponibilidade dos fármacos encapsulados, uma vez que a melhoria da eficácia terapêutica não é necessariamente obtida como consequência de aumento da eficácia do direcionamento.

Uma grande preocupação é o facto de que a doxorubicina é, muitas vezes, o fármaco de referência para o desenvolvimento de várias estratégias de vetorização e, uma vez que ela é capaz de se difundir através de uma membrana de lipossomas intactos, não é considerada o melhor fármaco para testar um conceito libertação ativa (por exemplo, a combinação do FR com a libertação desencadeada por meio ácido).

O desenvolvimento de estratégias de desencadeamento ativo é fundamental para que as tecnologias de distribuição de fármacos lipossómicos se tornem um método de utilização universal.

Acredita-se que o uso de desencadeadores endógenos, que dependem de uma diferença entre o microambiente do tumor e do tecido saudável, são preferíveis. Para além disso, será mais vantajoso no futuro, visto que não é necessária qualquer pré-localização do tumor primário ou das metástases.

No entanto, os desencadeadores exógenos, tais como a temperatura, podem ser mais fáceis de obter e de controlar atualmente.

Porém, não existe nenhuma formulação baseada nestas estratégias no mercado, provavelmente devido ao facto . Talvez isto se deva ao facto de ser muito difícil otimizar as formulações lipossómicas para a uma libertação controlada e específica, sem conhecer o perfil farmacodinâmico do medicamento, que pode variar em relação ao fármaco livre, bem como a dificuldade em compreender o mecanismo de libertação do fármaco após atingir o tumor.

No entanto, considero que a vectorização pode resolver os problemas de segurança e eficácia inerentes à quimioterapia e assim assumir-se como o futuro das novas terapêuticas, uma vez que a descoberta de novas moléculas se está a tornar cada vez mais difícil para a Indústria Farmacêutica.

6. BIBLIOGRAFIA

1. JEMAL, A., BRAY, F., CENTER, M. M., FERLAY, J., WARD, E. & FORMAN, D. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61, 69-90.
2. TA, T. & PORTER, T. M. 2013. Thermosensitive liposomes for localized delivery and triggered release of chemotherapy. *J Control Release*, 169, 112-25.
3. ANDRESEN, T. L., JENSEN, S. S. & JORGENSEN, K. 2005. Advanced strategies in liposomal cancer therapy: problems and prospects of active and tumor specific drug release. *Prog Lipid Res*, 44, 68-97.
4. HARRINGTON, K. J. 2011. Biology of cancer. *Medicine*, 39, 689-692.
5. FERLAY, J., STELIAROVA-FOUCHER, E., LORTET-TIEULENT, J., ROSSO, S., COEBERGH, J. W., COMBER, H., FORMAN, D. & BRAY, F. 2013. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*, 49, 1374-403.
6. LASIC, D. – Chemistry of lipids and liposomes. In: LASIC, D. Liposomes from physics to applications. Netherlands: Elsevier Science Publishers, 1993. ISBN 0-444-89548-5. p. 9-13.
7. FAN, J. & DE LANNOY, I. A. M. 2014. Pharmacokinetics. *Biochemical Pharmacology*, 87, 93-120.
8. DJANASHVILI, K., TEN HAGEN, T. L., BLANGE, R., SCHIPPER, D., PETERS, J. A. & KONING, G. A. 2011. Development of a liposomal delivery system for temperature-triggered release of a tumor targeting agent, Ln(III)-DOTA-phenylboronate. *Bioorg Med Chem*, 19, 1123-30.
9. POUPARERT, J. - Design of drugs: Basic concepts and applications. In: Swarbrick, J.; Boylan, J. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. New York: Marcel Dekker, Inc, 1988. ISBN:0-8247-2803-3. p. 3.
10. MALAM, Y., LOIZIDOU, M. & SEIFALIAN, A. M. 2009. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends Pharmacol Sci*, 30, 592-9.
11. SLINGERLAND, M., GUCHELAAR, H. J. & GELDERBLON, H. 2012. Liposomal drug formulations in cancer therapy: 15 years along the road. *Drug Discov Today*, 17, 160-6.
12. FEDERICO, C., MORITTU, V. M., BRITTI, D., TRAPASSO, E. & COSCO, D. 2012. Gemcitabine-loaded liposomes: rationale, potentialities and future perspectives. *Int J Nanomedicine*, 7, 5423-36.

13. LASIC, D. – Liposomes as a drug delivery system. In: LASIC, D. Lipossomes from physics to applications. Netherlands: Elsevier Science Publishers, 1993. ISBN 0-444-89548-5. p. 277-284.
14. LASIC, D. – Liposomes as a drug delivery system. In: LASIC, D. Lipossomes from physics to applications. Netherlands: Elsevier Science Publishers, 1993. ISBN 0-444-89548-5. p. 309-310.
15. GERASIMOV, O. V., BOOMER, J. A., QUALLS, M. M. & THOMPSON, D. H. 1999. Cytosolic drug delivery using pH- and light-sensitive liposomes. *Adv Drug Deliv Rev*, 38, 317-338.
16. NEEDHAM, D. & DEWHIRST, M. W. 2001. The development and testing of a new temperature-sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors. *Adv Drug Deliv Rev*, 53, 285-305.
17. SHUM, P., KIM, J. M. & THOMPSON, D. H. 2001. Phototriggering of liposomal drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*, 53, 273-84.
18. KARANTH, H. & MURTHY, R. S. 2007. pH-sensitive liposomes--principle and application in cancer therapy. *J Pharm Pharmacol*, 59, 469-83.
19. LEE, R. J. & LOW, P. S. 1995. Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped doxorubicin in vitro. *Biochim Biophys Acta*, 1233, 134-44.
20. IWAMOTO, T. 2013. Clinical application of drug delivery systems in cancer chemotherapy: review of the efficacy and side effects of approved drugs. *Biol Pharm Bull*, 36, 715-8.
21. DAWIDCZYK, C. M., KIM, C., PARK, J. H., RUSSELL, L. M., LEE, K. H., POMPER, M. G. & SEARSON, P. C. 2014. State-of-the-art in design rules for drug delivery platforms: Lessons learned from FDA-approved nanomedicines. *J Control Release*, 187c, 133-144.
22. SAUL, J. M., ANNAPRAGADA, A., NATARAJAN, J. V. & BELLAMKONDA, R. V. 2003. Controlled targeting of liposomal doxorubicin via the folate receptor in vitro. *J Control Release*, 92, 49-67.
23. HYODO, K., YAMAMOTO, E., SUZUKI, T., KIKUCHI, H., ASANO, M. & ISHIHARA, H. 2013. Development of liposomal anticancer drugs. *Biol Pharm Bull*, 36, 703-7.
24. MAEDA, H., WU, J., SAWA, T., MATSUMURA, Y. & HORI, K. 2000. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release*, 65, 271-84.
25. TORCHILIN, V. P. 2005. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov*, 4, 145-60.