

Impacto de uma Nova Estratégia Nanoterapêutica em Células Estaminais Tumoriais de Cancro do Pulmão

Dissertação desenvolvida sob orientação científica:

Professor Doutor João Nuno Moreira

Faculdade de Farmácia

Universidade de Coimbra

Setembro de 2015

Rute Silva Araújo



Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra com o intuito de adquirir o Grau de Mestre em Biotecnologia Farmacêutica. Este projeto foi desenvolvido no Centro de Neurociências e Biologia Celular, no grupo de Vectores e Terapia Génica, sob a Orientação do Professor Doutor João Nuno Moreira (Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra).

Aos meus pais e irmã,

Agradecimentos

As nossas realizações pessoais nunca são apenas nossas, mas também daqueles que com pequenos e grandes gestos contribuem para que estas sejam possíveis de concretizar e, como tal, não poderia deixar de agradecer a todos aqueles que cruzaram o meu percurso e o tornaram mais fácil.

Antes de mais, ao Professor Doutor João Nuno Moreira, orientador desta tese, quero deixar o meu mais profundo agradecimento. Obrigado por me ter recebido no Grupo de Vectores e Terapia Génica e me ter dado oportunidade de realizar este projeto. Foi uma experiência muito gratificante e, teve um papel fundamental tanto no meu desenvolvimento científico como pessoal. Obrigado por ter confiado em mim!

À Ângela Valério-Fernandes, claro, sempre incansável comigo, muito obrigado pela orientação, disponibilidade e apoio durante o desenrolar deste projeto. Se levo esta etapa da minha vida como sendo um mar de aprendizagens, muito o devo a ti que sempre estiveste ao meu lado. Obrigado por todos os ensinamentos, pelo constante incentivo e pela ajuda imprescindível na revisão desta dissertação.

Ao “Gang JN”, deixo os meus mais sinceros agradecimentos, ao Nuno Fonseca e à Ana Gregório muito obrigado pela disponibilidade e apoio sempre que precisei. Obrigado pelo vosso contributo! Ao Rui Lopes e à Ana Cruz obrigado pela paciência que sempre tiveram comigo, pelas risadas e por todo o vosso carinho e amizade! À Susana e à Vanessa, que apesar de não terem acompanhado todo o percurso, prestaram-me sempre todo o apoio e carinho. Foi um prazer trabalhar com todos vós, foram os meus exemplos e espero, futuramente, encontrar tanto espírito de entreatajuda como encontrei neste grupo. Muito obrigado!

A todos os que partilharam a sala de mestrados comigo, muito obrigado pelos momentos de amizade e boa disposição, em especial a Ana Teresa, a Susana Sampaio e a Sara Amaral, que sempre me prestaram todo o auxílio e me fizeram sorrir todos os dias com a sua amizade.

A todos os constituintes do grupo “BB”, por toda a amizade e pelos sempre animados momentos de convívio. Não posso deixar de agradecer em especial ao Nelson e ao Bruno que estiveram sempre presentes e me deram todo o apoio e encorajamento, para além de toda a amizade que demonstraram. Obrigado por todas as gargalhadas meus meninos!

Aos meus pais e manasca, a quem devo tudo...em todos os momentos me apoiaram e me deram o incentivo que precisava para conseguir alcançar esta etapa. Sem vocês ao meu

lado jamais seria possível chegar até aqui... obrigado por acreditarem e confiarem sempre em mim e, principalmente, por me terem ensinado a lutar por aquilo que ambiciono. Foram a minha fonte de força e espero, sinceramente, um dia poder retribuir-vos todo o vosso amor. Obrigado, do fundo do coração!

Por fim, mas não menos importante, quero agradecer ao João por toda a paciência que teve comigo durante este período. Obrigado por todo o carinho, compreensão e pelas constantes palavras de apoio que tornaram, muitas vezes, o impossível possível. Obrigado por estares sempre comigo!

O meu sincero obrigado a todos!

Índice

Agradecimentos	i
Lista de Abreviaturas	vi
Índice de Tabelas.....	ix
Índice de Figuras.....	x
Resumo	xii
Abstract	xiv
I. Introdução.....	2
I.1. Cancro como Doença Multifatorial.....	2
I.1.1. Conceitos Gerais.....	2
I.1.2. Cancro do Pulmão.....	2
I.1.2.1. Epidemiologia	2
I.1.2.2 Fatores de Risco	3
I.1.2.3. Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células.....	4
I.1.3. Carcinogénese	4
I.1.4. Microambiente Tumoral.....	5
I.1.5. Angiogénese no Desenvolvimento Tumoral.....	6
I.2. Novas terapêuticas direcionadas para CPNPC.....	8
I.2.1. Terapias Antiangiogénicas	9
I.2.2. Inibidores do Domínio Tirosina cinase do EGFR	11
I.2.3. Inibidores de Múltiplas Vias	13
I.3. Mecanismos de Resistência às Terapias Antiangiogénicas	14
I.3.1 Resistência Adquirida	15
I.3.1.1. Resistência adquirida a terapias anti-VEGF e anti-EGF em CPNPC	16
I.3.2. Resistência Intrínseca	17
I.3.2.2. Resistência Intrínseca a terapias antiangiogénicas em CPNPC	18

I.4. Células Estaminais Tumorais	19
I.4.1. Identificação da População Enriquecida em CSC	19
I.4.1.1. Marcadores Superficiais: CD44 e CD133.....	19
I.4.1.2. Marcador Funcional: ALDH	20
I.4.2. Papel das CSC na Resistência Tumoral.....	20
I.5. Nanopartículas Direcionadas como Sistema de Entrega de Fármacos.....	22
I.5.1. Estratégias Terapêuticas de Base Lípica	22
I.5.2. Lipossomas Sensíveis ao pH	24
I.5.3. Nucleolina como Alvo Terapêutico em Cancro.....	25
I.6. Objetivos.....	26
2. Materiais e Métodos	28
2.1. Materiais	28
2.2. Métodos	28
2.2.1. Cultura Celular.....	28
2.2.2. Preparação dos Lipossomas	28
2.2.2.1. Ativação dos Ligandos.....	28
2.2.2.2. Preparação dos Lipossomas por Injeção de Etanol.....	29
2.2.2.3. Processo de Pós-Inserção.....	29
2.2.3. Caracterização de Lipossomas	30
2.2.4. Estudo de Associação Celular por Citometria de Fluxo	30
2.2.5. Estudo de Associação Celular por Microscopia de Fluorescência	30
2.2.6. Estudos de Citotoxicidade.....	31
2.2.6.1. Formulações Lipossomais	31
2.2.6.2. Fármacos Inibidores de Tirosina Cinase	31
2.2.7. Ensaio de Formação de Esferas	32
2.2.8. Identificação da População Celular Enriquecida em Células Estaminais Tumorais	32
2.2.8.1. CD44 e ALDH	32

2.2.8.2. CD44 e CD133.....	33
2.2.9. Seleção das Populações CD44 ⁺ /ALDH ⁺ e CD44 ⁻ /ALDH ⁻ por <i>Cell Sorting</i>	33
2.2.10. Estudo da Citotoxicidade nas Populações CD44 ⁺ /ALDH ⁺ e CD44 ⁻ /ALDH ⁻	34
2.2.10.1. Formulação Lipossomal	34
2.2.10.2. Fármacos Inibidores de Tirosina Cinase	34
2.2.11. Análise Estatística	34
3. Resultados	37
3.1. Caracterização dos Lipossomas	37
3.1.1. Análise das Propriedades Físico-Químicas.....	37
3.2. Estudo de Associação celular	38
3.2.1. Por Citometria de Fluxo	38
3.2.2. Por Microscopia de Fluorescência	40
3.3. Estudo de Citotoxicidade Celular na População Parental	41
3.3.1. Formulações lipossomais.....	41
3.3.2. Inibidores Tirosina Cinase.....	44
3.4. Ensaio de Formação de Esferas	50
3.5. Caracterização da População Enriquecida em CSC.....	51
3.5.1. Marcadores CD44 e CD133	51
3.5.2. Marcadores CD44 e ALDH	53
3.6. Isolamento das Populações CD44 ⁻ /ALDH ⁻ e CD44 ⁺ /ALDH ⁺	55
3.7. Estudos de Citotoxicidade nas Populações CD44 ⁻ /ALDH ⁻ e CD44 ⁺ /ALDH ⁺	56
3.7.1. Erlotinib e Vandetanib	56
3.7.2. Lipossomas Vetorizados com o Peptídeo F3.....	59
4. Discussão.....	62
5. Conclusões e Perspetivas Futuras	68
6. Referências.....	71

Lista de Abreviaturas

A

2-IT	2-Iminotiolano
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Akt	Proteína Cinase B
ALDH	Aldeído Desidrogenase
ARNm	Ácido Ribonucleico Mensageiro
ARNr	Ácido Ribonucleico Ribossómico
ATP	Adenosina Trifosfato

B

BAA	BODIPY-Aminoacetato
BAAA	BODIPY-Aminoacetaldeído
BSA	Albumina Sérica Bovina

C

CHEMS	Hemisuccinato de Colesterol
CHOL	Colesterol
CPNPC	Cancro do Pulmão de Não-Pequenas Células
CPPC	Cancro do Pulmão de Pequenas Células
CSC	Células Estaminais Tumorais

D

DEAB	Dietilaminobenzaldeído
DOPE	Dioleoilfosfatidiletanolamina
DSPC	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DSPE-PEG (2000)	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino (polietileno glicol) -2000]
DSPE-PEG-MAL	1,2-distearoil-sn-Glicero-3-Fosfoetanolamina-N-[Maleimida (Polietilenoglicol) 2000]
DXR	Doxorrubicina

E

EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EGFR	Recetor do Fator de Crescimento Epidérmico

F

F3	Ligando Específico
FBS	Soro Fetal Bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico

H

HBS	Solução tamponada com HEPES
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietilo)-piperazina-N'-2-etanosulfónico

I

IC ₅₀	Concentração necessária para inibir 50 % da viabilidade celular
IC ₉₀	Concentração necessária para inibir 90 % da viabilidade celular

K

KRAS	<i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
------	---

M

mAb	Anticorpo Monoclonal
MAPK	Proteína Cinase Ativada por Mitogéneos
MES	Ácido 2-N-morfolino etanosulfónico
MPS	Sistema Mononuclear Fagocítico

N

NS	Ligando não específico
----	------------------------

P

p[F3]SL	Lipossomas direcionados especificamente (com o ligando F3)
p[NS]SL	Lipossomas direcionados inespecificamente (com o ligando NS)
PBS	Tampão Fosfato Salino

PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PDGFR	Recetor do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PEG	Polietilenoglicol
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinase
pSL	Lipossomas não direcionados
R	
RhoD	(L- α -fosfatidiletanolamina-N-(lissamina rodamina B sulfonil) (Sal de Amónio))
RhoD-PE	Derivado lipídico de (L- α -fosfatidiletanolamina-N-(lissamina rodamina B sulfonil) (Sal de Amónio))
S	
SEM	Erro Padrão da Média
STAT	Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição
T	
TK	Tirosina Cinase
TKI	Inibidores de Tirosina Cinase
V	
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VEGFR	Recetor do fator de Crescimento Endotelial Vascular
WHO	<i>World Health Organization</i>

Índice de Tabelas

Tabela I. Terapias direcionadas para CPNPC e os seus estadios de desenvolvimento, na atualidade. (Retirado de Nguyen et al., 2014).....	9
Tabela II. Formulações lipossômicas comercialmente disponíveis ou sob avaliação clínica. (Retirado de Torchilin, 2005)	24
Tabela III. Valores de IC_{50} e IC_{90} da doxorubicina encapsulada nos lipossomas ou na forma livre, na linha celular HI975.....	43
Tabela IV. Valores de IC_{50} e IC_{90} gerados pelos fármacos erlotinib, vandetanib, gefitinib e sunitinib, na linha celular HI975.....	49
Tabela V. Tabela representativa da eficiência de formação de esferas de 1 ^a e 2 ^a geração a partir da linha celular HI975.....	50
Tabela VI. Valores de IC_{90} e IC_{50} relativos à citotoxicidade induzida pelo erlotinib nas populações $CD44^+/ALDH^+$, $CD44^-/ALDH^-$ e parental, na linha celular HI975.	57
Tabela VII. Valores de IC_{90} e IC_{50} relativos à citotoxicidade induzida pelo vandetanib nas populações $CD44^+/ALDH^+$, $CD44^-/ALDH^-$ e parental, na linha celular HI975.	58
Tabela VIII. Valores de IC_{90} e IC_{50} relativos à citotoxicidade induzida pelos lipossomas direcionados com o peptídeo F3 nas populações $CD44^+/ALDH^+$, $CD44^-/ALDH^-$ e parental, na linha celular HI975.....	60

Índice de Figuras

Figura 1.2. Representação esquemática das capacidades adquiridas pelas células neoplásicas, as “Hallmarks do Cancro”.....	6
Figura 1.3. Angiogênese tumoral.....	7
Figura 1.4. Modelo de normalização dos vasos sanguíneos em células tumorais como resposta à terapia antiangiogénica	10
Figura 1.5. Representação esquemática das principais vias de sinalização associadas à ativação do EGFR.....	12
Figura 1.6. Modos de resistência dos tumores à terapia antiangiogénica: resistência adaptativa e resistência intrínseca.....	15
Figura 1.7. Nanopartículas como promissoras formas de transporte de fármacos anticancerígenos para o tumor.....	23
Figura 3.1. Caracterização físico-química dos lipossomas não vetorizados (pSL), vetorizados com um peptídeo não específico (p[NS]SL) ou com o peptídeo F3 (p[F3]SL).....	38
Figura 3.2. Estudo de associação celular com a linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células, H1975.....	39
Figura 3.3. Imagens representativas da fluorescência resultante da associação celular de lipossomas funcionalizados e não funcionalizados, marcados com RhoD-PE, na linha celular H1975.....	40
Figura 3.4. Estudo de citotoxicidade celular com as diferentes formulações lipossomais na linha celular H1975.	42
Figura 3.5. Estudo de citotoxicidade celular utilizando um fármaco inibidor do EGFR, o erlotinib, na linha celular H1975.	45
Figura 3.6. Estudo de citotoxicidade celular utilizando o fármaco vandetanib, na linha celular H1975.....	46
Figura 3.7. Estudo de citotoxicidade celular utilizando um fármaco inibidor do EGFR, o gefitinib, na linha celular H1975.....	47

Figura 3.8. Estudo de citotoxicidade celular utilizando um fármaco inibidor de múltiplas vias, o sunitinib, na linha celular HI975.....	48
Figura 3.9. Imagens representativas do ensaio de formação de esferas de 1 ^a e 2 ^a geração com a linha celular HI975.....	50
Figura 3.10. Associação celular de lipossomas vetorizados com o peptídeo F3 na população enriquecida em células estaminais tumorais, marcada com CD133 e CD44.....	51
Figura 3.11. Associação celular de lipossomas vetorizados com o peptídeo F3 pela população enriquecida em células estaminais tumorais (CSC).	54
Figura 3.12. Representação do esquema de seleção das subpopulações CD44 ⁺ /ALDH ⁺ e CD44 ⁻ /ALDH ⁻ , através de <i>cell sorting</i>	55
Figura 3.13. Citotoxicidade celular dos fármacos erlotinib e vandetanib nas subpopulações CD44 ⁺ /ALDH ⁺ , CD44 ⁻ /ALDH ⁻ e na população parental da linha celular HI975.	56
Figura 3.14. Citotoxicidade celular dos lipossomas direcionados com o peptídeo F3 nas subpopulações CD44 ⁺ /ALDH ⁺ , CD44 ⁻ /ALDH ⁻ e na população parental da linha celular HI975.	59

Resumo

O cancro do pulmão é a principal causa de morte a nível mundial, sendo o cancro do pulmão de não pequenas células o subtipo mais comum, representando cerca de 85 % do total de casos diagnosticados. Apesar dos progressos consideráveis em termos de diagnóstico e tratamento, não se verifica um aumento significativo de sobrevivência nestes doentes. As estratégias terapêuticas tradicionais (quimioterapia e radioterapia), assim como as terapias direcionadas, tais como as terapias anti-VEGF e anti-EGF, têm sido associadas ao desenvolvimento de resistência e, por isso, ao insucesso terapêutico das mesmas em doentes com cancro do pulmão de não pequenas células.

Vários estudos suportam o conceito de que as células estaminais tumorais são uma população de células indiferenciadas, responsáveis pela iniciação, progressão e metastização tumoral. Adicionalmente, evidências suportam também o papel fundamental desta população celular no desenvolvimento de resistência às terapias em diferentes tipos de cancro, incluindo o cancro do pulmão.

Assim, torna-se crucial o desenvolvimento de novas e mais eficazes estratégias terapêuticas, no sentido de ultrapassar os problemas encontrados atualmente na clínica. Neste contexto, as plataformas nanotecnológicas, nomeadamente os lipossomas, representam uma atrativa estratégia terapêutica para a entrega de fármacos com uma significativa redução dos efeitos colaterais associados à quimioterapia convencional, como a elevada cardiotoxicidade. Adicionalmente, a vetorização da superfície dos lipossomas com um ligando que seja direcionado para o microambiente tumoral, permite um tratamento específico, possibilitando a entrega de elevadas dosagens de fármaco diretamente no tumor. Desta forma, fomos avaliar o impacto de uma nova estratégia nanoterapêutica direcionada especificamente para a nucleolina, uma proteína sobre-expressa em diferentes populações do microambiente tumoral, contra células estaminais tumorais de cancro do pulmão de não pequenas células.

Neste estudo, foi demonstrado que lipossomas PEGuilados, encapsulando doxorubicina e direcionados com o peptídeo F3, foram internalizados por células estaminais tumorais (ALDH⁺/CD44⁺) e também por células cancerígenas não estaminais (ALDH⁻/CD44⁻) de forma específica. Este resultado justifica, assim, a elevada morte celular induzida pela nanopartícula, em ambas as populações celulares. Por contraste, os inibidores de tirosina cinase testados, vandetanib e erlotinib, demonstraram uma baixa eficácia citotóxica tanto na população de células estaminais tumorais, como não estaminais, quando comparado com os resultados obtidos com a nanopartícula.

Esta nova estratégia nanoterapêutica, sendo direcionada para a nucleolina, um recetor sobre-expresso à superfície de diferentes células tumorais, demonstrou potencial para aceder a vários componentes do microambiente tumoral de forma específica, incluindo as células estaminais tumorais (ALDH⁺/CD44⁺) e não estaminais (ALDH⁻/CD44⁻), permitindo assim atingir uma maior eficácia anti-tumoral. Desta forma, esta estratégia terapêutica poderá revelar um elevado potencial clínico, traduzido numa redução dos efeitos devastadores associados às terapias atualmente disponíveis e, potencialmente, bloqueando alguns mecanismos de resistência.

Palavras-chave: Lipossomas funcionalizados com o peptídeo F3, células estaminais tumorais, cancro do pulmão de não pequenas células, fármacos inibidores de tirosina cinase, terapia anti-VEGF e anti-EGF.

Abstract

Lung cancer is the most common cause of cancer death worldwide with non-small cell lung cancer accounting for about 85 % of all new cases diagnosed. Despite considerable progress in diagnosis and treatment, there is not a significant increase on lung cancer patient's survival. Traditional therapeutic strategies (chemotherapy and radiotherapy) and also targeted therapies, as anti-VEGF and anti-EGF therapies, have been associated with development of resistance in non-small cell lung cancer patients, leading to its failure in clinic.

Accumulating evidence supports the concept that cancer stem cells are a subpopulation of undifferentiated cells responsible for tumor initiation, progression and metastasis as well as resistance to therapy.

Due to this, it is important to develop new and more effective approaches that can overcome the emergent problems associated with therapeutic options currently in clinic. In this context, nanotechnology-based systems, namely liposomes, represent an attractive therapeutic strategy for drug delivery, with a significant reduction in side effects compared to conventional chemotherapy, as cardiotoxicity. Additionally, the use of targeting ligands on the surface of liposomes that targeting the tumor microenvironment, allow a specific treatment with higher amounts of drug in the tumor site. Therefore, we evaluated the impact of a new nanotherapeutic strategy that specifically target nucleolin, a protein overexpressed in different populations of the tumor microenvironment, against non-small cell lung cancer stem cells.

In this work, it was demonstrated that a PEGylated liposome encapsulating doxorubicin functionalized with a specific ligand, F3 peptide was specifically internalized by lung cancer stem cells (ALDH⁺/CD44⁺) and, also, non-cancer stem cells (ALDH⁻/CD44⁻). This result justifies the high cytotoxicity induced by nanoparticle in both populations. By contrast, the tyrosine kinase inhibitors tested, vandetanib and erlotinib, demonstrated a low efficacy in cytotoxicity assays in cancer stem cells and non-cancer stem cells, when compared to results obtained with the nanoparticle.

This lipid-based strategy, by targeting nucleolin, a receptor overexpressed at the surface of distinct tumor cells, render the potential to access various components of tumor microenvironment including cancer stem and non-stem cells, providing an opportunity to accomplish improved therapeutic efficacy profiles in clinic, reducing the collateral effects and resistance of currently available therapies.

Keywords: F3-targeted liposomes, cancer stem cells, non-small cell lung cancer, tyrosine kinase inhibitors, anti-VEGF and anti-EGF.

CAPÍTULO I

Introdução

I. Introdução

I.1. Cancro como Doença Multifatorial

I.1.1. Conceitos Gerais

Acredita-se ter sido Hipócrates, médico da Grécia antiga, o primeiro a reconhecer a existência de tumores malignos (Wolff et al., 2001). Na altura, denominou esta doença de *karkino*, designação grega para caranguejo, uma vez que a invasão tumoral lembrava-lhe as garras de um caranguejo, de onde deriva a palavra carcinoma (Papavramidou et al., 2010).

O cancro é, atualmente, a doença responsável pela maior taxa de mortalidade a nível mundial. Em 2012, estimou-se que surgiram 14,1 milhões de novos casos em todo mundo, dos quais 8,2 milhões foram fatais (Ferlay et al., 2015). Em Portugal, esta doença é a segunda maior causa de morte, sendo que somente no ano de 2013 foram registados 25860 óbitos (Direção Geral de Saúde, 2013). Os tipos de cancro com maior prevalência são o cancro do pulmão, da mama, da próstata e do cólon, representando 4 em cada 10 casos diagnosticados. (Cancer Research UK, 2015). Em 2030, estima-se que o número de mortes causadas pelo cancro aumente para 11,4 milhões em todo o mundo. (Anajwala et al., 2010).

Em condições fisiológicas normais, o balanço entre a proliferação e a morte celular programada é altamente regulado, garantindo a integridade dos órgãos e tecidos. No entanto, devido a danos que podem surgir no genoma humano, especialmente em genes envolvidos na regulação do ciclo celular, podem ocorrer alterações no equilíbrio sobrevivência/morte celular, dando origem a neoplasias (Coleman et al., 2006). O cancro é, assim, uma doença heterogénea, com diferentes etiologias, que se desenvolve através da interação entre fatores genéticos e ambientais (Martinez et al., 2003), caracterizando-se pela sua capacidade de auto-suficiência, proliferação e invasão de tecidos adjacentes, assim como a capacidade de disseminação para diferentes órgãos, ou seja, metastização (Loeb et al., 2000).

I.1.2. Cancro do Pulmão

I.1.2.1. Epidemiologia

O cancro do pulmão é o tipo de cancro mais frequente a nível mundial há várias décadas, sendo que em 1980 foram estimados 660 000 casos (Parkin et al., 1988). Em 2012, foram diagnosticados 1,8 milhões de novos casos (12,9% do total), dos quais resultaram 1,6 milhões de mortes (19% do total) (Ferlay et al., 2015) (Figura I.1).

Na Europa, em 2012 foram registados 409 900 novos casos, originando 353 000 mortes (Ferlay et al., 2013). Em Portugal, o cenário também não é o mais favorável, uma vez que o número de mortes devido ao cancro do pulmão tem vindo a aumentar a cada ano, tendo-se registado 3514 mortes por cancro do pulmão, no ano de 2012 (Direção Geral de Saúde, 2013).

É o tipo de cancro mais comum no sexo masculino a nível mundial, tendo sido diagnosticados 1,2 milhões de novos casos no ano de 2012, sendo também o cancro mais fatal nos homens, com 1,1 milhões de óbitos registados nesse mesmo ano (World Health Organization). A incidência desta neoplasia nas mulheres é metade da taxa de incidência nos homens, no entanto esta taxa tem vindo a aumentar na última década, sendo o terceiro tipo de cancro mais diagnosticado e o segundo com maior taxa de mortalidade (Ferlay et al., 2015).

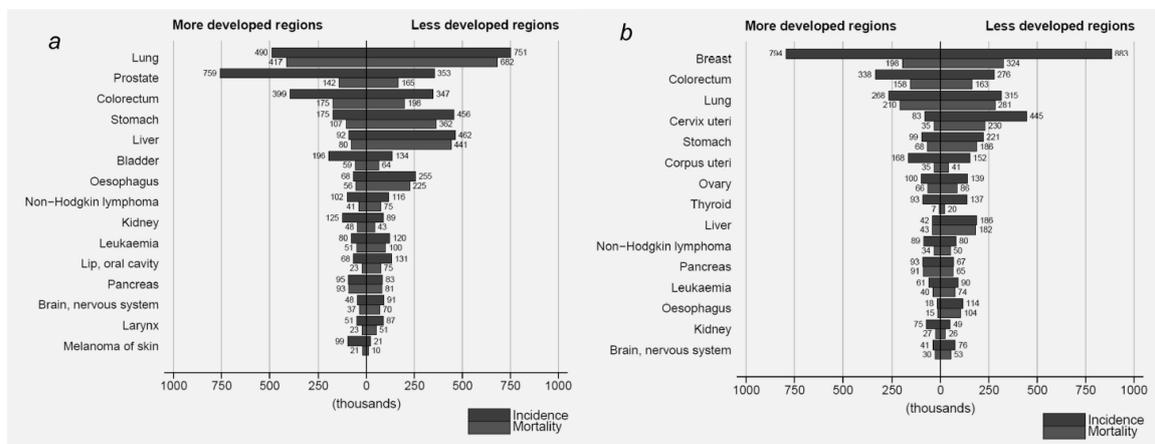


Figura 1.1. Representação do número de novos casos e óbitos por cancro em homens (a) e mulheres (b) nos países desenvolvidos e nos países em desenvolvimento, no mundo, em 2012. (Retirado de Ferlay et al., 2015)

1.1.2.2 Fatores de Risco

Existem vários fatores de risco que têm sido associados ao aparecimento deste tipo de cancro, nomeadamente o tabaco. Desde 1954 que está estabelecida uma relação direta entre o tabagismo e o cancro do pulmão (Doll et al., 1954), sendo a causa de 80% dos casos de cancro do pulmão em homens e, pelo menos, 50% dos casos nas mulheres (Gridelli et al., 2015). Verifica-se ainda que indivíduos fumadores possuem uma probabilidade de desenvolver esta neoplasia 10 vezes superior aos indivíduos que não fumam (Gridelli et al., 2015; Alavanja et al., 2004; Winkler et al., 2011). Apesar desta clara relação, existem outros fatores que poderão contribuir para o aparecimento desta neoplasia, nomeadamente doenças pulmonares anteriores e a exposição a agentes carcinogéneos, tais como arsénio, berílio, crómio e níquel.

Por outro lado, predisposição hereditária e diferenças genéticas na capacidade de reparação do ácido desoxirribonucleico (ADN) e no metabolismo de carcinogêneos são importantes fatores no desenvolvimento de cancro do pulmão (Jemal et al. 2011).

1.1.2.3. Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células

O cancro do pulmão é subdividido em dois tipos principais, o cancro do pulmão de pequenas células (CPPC) e o cancro do pulmão de não-pequenas células (CPNPC). Este último pode ser classificado em três subtipos: carcinoma de células escamosas (também denominado epidermóide), adenocarcinoma e carcinoma de grandes células (Gridelli et al., 2015). O cancro do pulmão de não-pequenas células representa 85 % de todos os casos de cancro, sendo os restantes 15% atribuídos ao cancro do pulmão de pequenas células (Travis et al., 2013).

1.1.3. Carcinogénese

A carcinogénese caracteriza-se por ser um processo complexo e multifatorial, associada a alterações genéticas e epigenéticas, que pode ser dividido em três fases, iniciação, promoção e progressão (Kumar et al., 2007).

A iniciação consiste na aquisição de danos ao nível dos genes. O cancro tem origem fundamentalmente genética, sendo que, ao longo da vida existem vários tipos de agressões que podem causar danos no ADN, por ação de agentes biológicos, químicos e físicos que, acabam por gerar múltiplas mutações (Kumar et al., 2007). Por outro lado, as mutações podem ser herdadas ou até mesmo adquiridas de forma espontânea durante a replicação do ADN.

A célula tem mecanismos próprios para reparar erros, como as mutações, no entanto, estes processos de reparação nem sempre são eficazes. Neste caso, se a célula “iniciada” não possuir capacidade para reparar o dano sofrido, poderá acumular alterações genéticas sucessivas conferindo-lhe vantagem seletiva sobre as restantes células – promoção (Kumar et al., 2007). A acumulação de alterações genéticas em genes associados à proliferação e diferenciação celular, assim como associados à morte celular programada, resulta na expansão clonal da célula “iniciada”, podendo levar ao desenvolvimento de uma neoplasia maligna, ou seja, de um tumor.

Na fase de progressão, verificam-se outras alterações genéticas e epigenéticas, levando à ativação de proto-oncogenes e à inativação de genes supressores tumorais (Kumar et al., 2007). Os proto-oncogenes são genes responsáveis pelo controlo da divisão celular, da diferenciação celular e da tradução proteica. Quando ocorrem mutações nestes genes e nos genes supressores tumorais (genes que codificam proteínas envolvidas na regulação do ciclo

celular e apoptose), o produto proteico assume uma função desregulada, passando estes genes a ser denominados oncogenes e possuindo um papel preponderante no desenvolvimento tumoral (Martinez et al., 2003).

Durante este período de progressão, as células deixam de responder a estímulos externos que regulam o seu crescimento e proliferação, tornando-se independentes das restantes células do organismo. Após esta fase, as células tumorais podem adquirir capacidade de invasão de tecidos adjacentes e metastização, sendo este um processo no qual estas células formam colónias em locais distantes do tumor primário (Mendelsohn et al., 2008).

1.1.4. Microambiente Tumoral

Durante as últimas décadas, os processos biológicos associados à transformação de células normais em células cancerígenas, têm sido alvo de uma vasta investigação. Verificou-se, assim, que o desenvolvimento tumoral manifesta-se, fundamentalmente, devido a seis alterações cruciais na fisiologia das células, que estão na base do seu comportamento desregulado e do crescimento celular maligno: a auto-suficiência relativamente a sinais de crescimento, a insensibilidade a sinais inibidores de crescimento, a evasão à morte celular programada (apoptose), o potencial replicativo ilimitado, a angiogénese sustentada e a invasão e metastização tecidual (Hanahan et al., 2000). Recentemente, devido aos enormes avanços obtidos no conhecimento desta doença que é o cancro, as características fundamentais ao desenvolvimento tumoral foram atualizadas para dez, passando a incluir também a reprogramação do metabolismo energético celular, o que permite uma proliferação contínua, a evasão ao controlo do sistema imunitário, a inflamação e a instabilidade genómica e mutações (Mantovani, 2009).

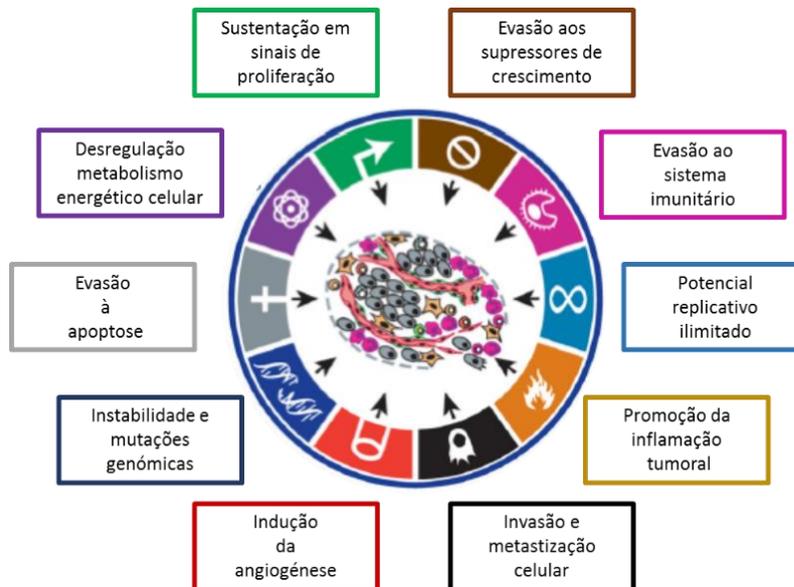


Figura 1.2. Representação esquemática das capacidades adquiridas pelas células neoplásicas, as “Hallmarks do Cancro”. (Adaptado de Hanahan et al., 2011). Nos últimos anos, tem-se assumido que os tumores possuem uma enorme complexidade, o que veio contrastar com a visão reducionista, que identificava os tumores como sendo um conjunto homogéneo de células cancerígenas. Atualmente, considera-se que um tumor é um sistema complexo, o qual é formado por um microambiente tumoral que é essencial ao desenvolvimento e sobrevivência do tumor (Seyfried et al., 2010).

1.1.5. Angiogénese no Desenvolvimento Tumoral

Por definição, considera-se a angiogénese como sendo o processo de formação e crescimento de novos vasos sanguíneos. Como referido anteriormente, o microambiente tumoral tem um papel crucial no desenvolvimento tumoral, sendo a angiogénese tumoral uma condição indispensável ao crescimento tumoral, fornecendo nutrientes e oxigénio às células malignas. Por outro lado, a formação de novos vasos é um processo essencial à saída das células tumorais do tumor primário para a circulação, e conseqüente propagação e metastização (Bergers et al., 2003; Kerbel, 2008).

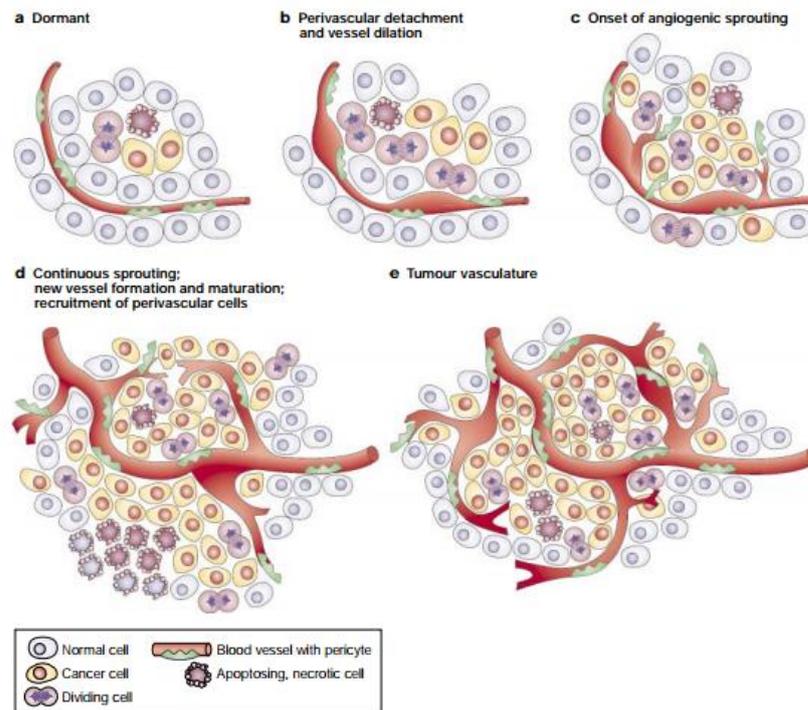


Figura 1.3. Angiogênese tumoral. No desenvolvimento tumoral, a angiogênese ocorre de forma progressiva, passando o tumor por vários estádios, dependendo da origem do mesmo e do seu microambiente. Na maioria dos tumores, o seu crescimento inicia-se como pequenos nódulos avasculares (estado dormente) **(a)** antes de atingirem um nível de estabilidade na proliferação celular. O processo de angiogênese inicia-se com o objetivo de potenciar o crescimento exponencial do tumor, através da dilatação dos vasos e destacamento perivascular **(b)**, culminando na propagação da angiogênese **(c)**, através do desenvolvimento e maturação de novos vasos, assim como, do recrutamento de células perivasculares **(d)**. A formação de novos vasos continua ao longo do desenvolvimento tumoral, principalmente nas zonas necróticas e em hipoxia, para que possam ser fornecidos os nutrientes necessários à progressão do tumor **(e)**. (Retirado de Bergers et al., 2003).

Evidências têm demonstrado que a modificação do padrão de crescimento tumoral é dependente do desenvolvimento de novos vasos, que ocorre em consequência de vários fatores estimulantes. Assim, os tumores respondem a estes fatores induzindo o crescimento dos vasos sanguíneos através da secreção de vários fatores de crescimento, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (Bergers et al., 2003). Tem sido demonstrado que o fator de crescimento fibroblástico básico (b-FGF) possui uma elevada ação oncogénica, contribuindo para a transformação de fibroblastos normais em neoplásicos, assim como também possui uma enorme capacidade de indução da angiogênese (Akbulut et al., 2002; Broll et al., 2001). Adicionalmente, de entre vários fatores, destaca-se a potente ação angiogénica

do VEGF, sendo uma proteína com uma importante ação mitogénica nas células endoteliais. Esta glicoproteína liga-se aos seus recetores (VEGFRs), na superfície da célula endotelial, como sinalizador, desencadeando uma cascata de sinalização que induz a formação e crescimento de novos vasos (Kerbel 2008). Assim, apesar de existirem diversos fatores que contribuem para a angiogénese, é ao VEGF que tem sido atribuída uma maior importância neste processo e, por isso, tem sido intensamente estudado com o intuito de serem desenvolvidas novas terapias e mais específicas.

O VEGF tem quatro principais atividades, a prevenção da apoptose das células endoteliais, a permeabilidade vascular dos capilares, a proliferação das células endoteliais e a sua migração (Hicklin et al., 2005). A família do VEGF inclui diversos subtipos, em que todos têm a capacidade de regulação de angiogénese, no entanto, esta função é atribuída principalmente ao VEGF-A por possuir importantes funções ao nível da progressão tumoral e da enorme capacidade de aumento da permeabilidade vascular (Crawford et al., 2009).

Assim, com base nos estudos que evidenciam o papel crucial da angiogénese no desenvolvimento tumoral, inclusivamente em CPNPC, têm sido desenvolvidas várias terapias não só direcionadas para o VEGF, mas também para o recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e outros fatores que contribuem para a vascularização tumoral (Pallis et al., 2012).

1.2. Novas terapêuticas direcionadas para CPNPC

A investigação na área de tratamento de CPNPC tem sido uma constante, no entanto, atualmente, as opções terapêuticas disponíveis são a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia e, mais recentemente, foram introduzidas novas estratégias como as terapias dirigidas para alvos sobre-expressos nos tumores, que podem ser usadas de forma combinada ou de forma isolada (Luther et al., 2011).

Apesar de existirem vantagens associadas à quimioterapia, o tempo de sobrevivência destes doentes normalmente não excede um ano, pelo que têm sido utilizadas várias combinações de fármacos citotóxicos. No entanto, estes compostos acabam por não ter um efeito muito superior e aumentam em muito os efeitos colaterais, como a elevada toxicidade associada a estas terapias (Schiller et al., 2002). Surgiu daqui a necessidade de desenvolver novas terapias direcionadas que bloqueiam vias de sinalização e processos metabólicos normalmente desregulados no cancro (Mok et al., 2009). A diminuição da toxicidade, o aumento da seletividade para o tumor e a administração oral distinguiram estes compostos que se tornaram bastante promissores. Assim, foram introduzidas várias terapias deste tipo

nos ensaios clínicos de CPNPC, enquanto agentes individuais ou combinados com outras terapias convencionais, como a quimioterapia ou a radioterapia (Mendelsohn, 2001) (Tabela I).

Tabela I. Terapias direcionadas para CPNPC e os seus estadios de desenvolvimento, na atualidade. (Retirado de Nguyen et al., 2014).

Drug	Company	Stage of development in NSCLC
EGFR activating mutations		
Gefitinib	AstraZeneca	Approved
Erlotinib	Roche	Approved
Afatinib	Boehringer Ingelheim	Approved
Dacomitinib	Pfizer	Phase III
CO-1686	Clovis	Phase I / II
AZD9291	AstraZeneca	Phase I / II
ALK gene rearrangements		
Crizotinib	Pfizer	Approved
LDK378	Novartis	Phase III
AP26113	ARIAD	Phase II
Alectinib	Chugai	Phase II
X-396	Xcovery	Phase I
PF-06463922	Pfizer	Phase I
ROS1 gene rearrangements		
Crizotinib	Pfizer	Phase II (approved for ALK-positive NSCLC)
LDK378	Novartis	Phase II
PF-06463922	Pfizer	Phase I
HER2 activating mutations		
Trastuzumab	Genentech	Phase II
Afatinib	Boehringer Ingelheim	No HER2-mutant NSCLC specific trial
Neratinib	Puma Biotechnology	Phase II
BRAF activating mutations		
Dabrafenib	GlaxoSmithKline	Phase II

1.2.1. Terapias Antiangiogénicas

Como já referido anteriormente, a angiogénese é o processo de formação de nova vasculatura, que resulta de um equilíbrio entre fatores pro- e anti-angiogénicos (Carmeliet, 2000; Folkman, 1971). Aquando do desenvolvimento tumoral, este equilíbrio deixa de existir e passa a verificar-se um desvio no sentido da produção de fatores pro-angiogénicos (*switch* angiogénico). Este processo resulta, assim, no desenvolvimento de novos vasos sanguíneos que são essenciais à nutrição e oxigenação das células tumorais e, conseqüentemente, ao crescimento e disseminação tumoral (Pallis et al., 2012).

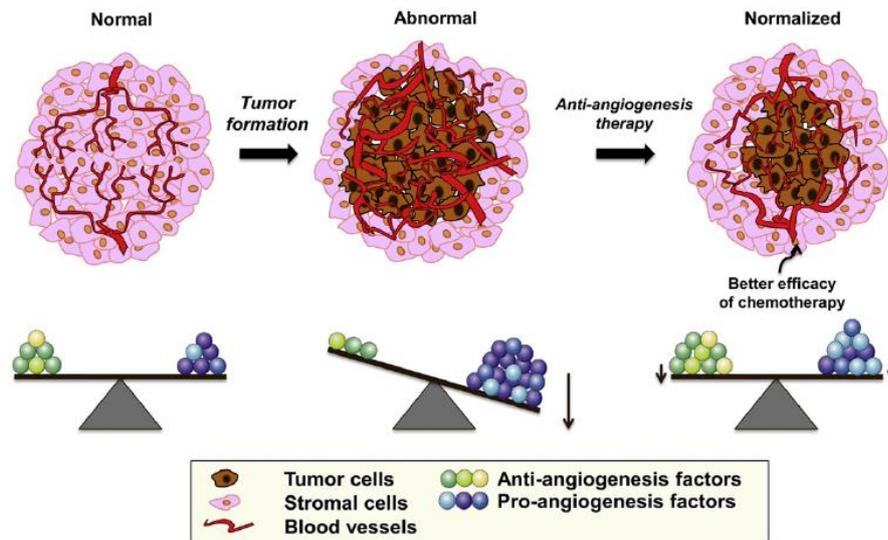


Figura I.4. Modelo de normalização dos vasos sanguíneos em células tumorais como resposta à terapia antiangiogênica. Em tecidos saudáveis, existe um balanço entre fatores pro- e antiangiogênicos. No entanto, numa situação de patologia este balanço encontra-se desregulado, devido ao aumento dos fatores pro-angiogênicos. Após a administração das terapias antiangiogênicas, é possível verificar uma reposição deste balanço observando-se uma normalização da vasculatura. (Retirado de Giuliano et al., 2013)

Nos últimos anos, tem-se assistido a uma valorização do conceito de microambiente tumoral enquanto alvo terapêutico. Desta forma, a dependência, por parte do tumor, da formação de novos vasos sanguíneos para o seu desenvolvimento, sobrevivência e progressão, levou à hipótese de que a inibição da angiogénese se traduziria num bloqueio do crescimento tumoral e até mesmo erradicação do mesmo. Iniciou-se, assim, uma nova geração de terapias, as terapias antiangiogênicas que se baseiam em fatores pro-angiogênicos enquanto alvos terapêuticos (Ichihara et al., 2011; Folkman, 1972).

Têm sido identificados diversos fatores pro-angiogênicos, entre estes o VEGF, considerado o principal fator neste processo (Ferrara et al., 2003; Folkman, 1971). Este fator de crescimento é considerado um importante agente mitogénico nas células endoteliais, mas não em outros tipos de células (Pallis et al., 2013). Apesar de o VEGF ser reconhecido por dois recetores expressos à superfície das células endoteliais, VEGFR-1 e VEGFR-2, apenas o último tem sido considerado crucial na sua ativação. (Ferrara et al., 1997). O VEGF liga-se ao VEGFR-2 e induz a dimerização do recetor resultando na sua ativação através da via de autofosforilação do domínio tirosina cinase. Inicia-se assim uma cascata de sinalização intracelular que culmina na indução da angiogénese (Pallis et al., 2012).

O VEGF é expresso por várias células cancerígenas, entre elas as células do CPNPC (Kerbel, 2008). Esta expressão é induzida devido a fatores genéticos como a ativação de oncogenes e/ou inativação de genes supressores tumorais, mas também em resposta à hipoxia existente no meio tumoral (Ferrara, 2004; Fukumura et al., 2007; Kerbel, 2008). Com base nos dados que evidenciam a proeminente importância do VEGF no desenvolvimento e progressão tumoral, este fator tem sido proposto como um potencial alvo de terapias dirigidas, nomeadamente as anti-angiogénicas. Desta forma, duas estratégias que estão sob investigação científica e clínica são a inibição do domínio da tirosina cinase dos VEGFRs e a utilização de anticorpos monoclonais (mAb) contra o VEGF (Pallis et al., 2009; Crinò et al., 2014).

A primeira terapia a ser desenvolvida com atividade específica na inibição da angiogénese foi um anticorpo monoclonal humanizado contra o VEGF-A, o bevacizumab (AVASTIN®, Genentech/Roche), impedindo a ligação ao seu recetor nas células endoteliais e inibindo assim a ativação da via de sinalização que culmina na proliferação endotelial. Este fármaco antiangiogénico foi o primeiro a ser aprovado na clínica para uso humano, sendo administrado em associação com a quimioterapia não só para o tratamento do CPNPC não-escamoso avançado, como para o cancro colo-rectal metastático, cancro de células renais metastático, cancro epitelial do ovário, trompa de falópio e peritoneal resistente a platinos, cancro de cervical avançado, bem como glioblastoma recorrente (Hurwitz et al., 2004; Sandler et al., 2006; Miller et al., 2007).

1.2.2. Inibidores do Domínio Tirosina cinase do EGFR

Inibidores da tirosina cinase (TKIs) são pequenas moléculas que bloqueiam o local de ligação da adenosina trifosfato (ATP) no domínio da tirosina cinase do EGFR, competindo com o ATP e, consequentemente, impedindo a ativação da cascata de sinalização associada a este (Arora et al., 2005).

A via de transdução do sinal do EGFR encontra-se relacionada com vários processos neoplásicos malignos, como progressão do ciclo celular, inibição da apoptose, invasão e metastização. Associada a estes processos encontra-se, também, a estimulação do VEGF que, como já foi discutido, é o principal indutor da angiogénese (Arora et al., 2005). As três principais vias de sinalização envolvidas nesta transdução de sinal são: a proteína cinase ativada por mitogénicos (MAPK), que se encontra intimamente ligada à transdução de sinais de proliferação; a fosfatidilinositol 3-cinase/proteína cinase B (PI3K/Akt) que é uma das vias anti-

apoptóticas de maior relevância neste contexto, e as vias mediadas por transdutores de sinal e ativadores da transcrição (STAT) (Papaetis et al., 2007) (Figura I.5).

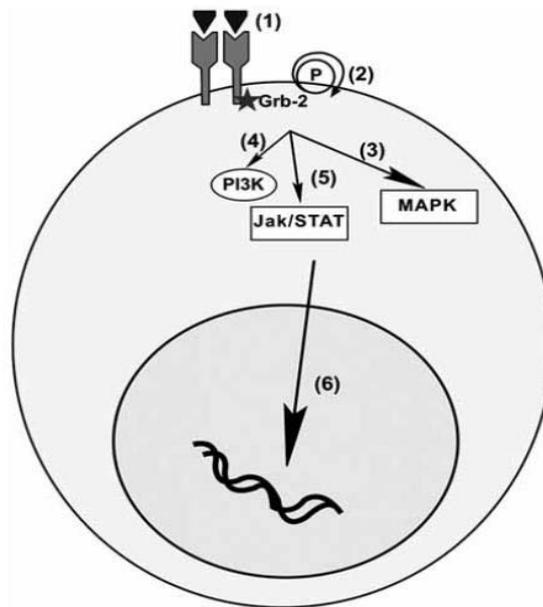


Figura I.5. Representação esquemática das principais vias de sinalização associadas à ativação do EGFR. A ligação do EGF ao recetor EGFR (1) resulta na auto-fosforilação dos resíduos de tirosina cinase no meio intracelular (2). São ativadas três vias de sinalização: a via MAPK (3), a via PI3K/Akt (4) e a via STAT (5). A transdução dos sinais no núcleo celular origina uma sobre-expressão dos genes envolvidos na oncogênese (6). (Retirado de Papaetis et al., 2007)

Desta forma, uma mutação pode originar uma amplificação e sobre-expressão do EGFR e resultar no desenvolvimento de uma neoplasia (Chen et al., 2014). Esta sobre-expressão tem sido verificada em diversos tumores, entre eles o CPNPC, numa percentagem de 65 % em adenocarcinoma, 68 % em carcinoma de grandes células e 84 % em carcinoma de células escamosas. (Dancey, 2004; Hirsch et al., 2003; Bunn et al., 2002).

Derivado deste conhecimento, têm sido investigadas e desenvolvidas novas terapias para CPNPC, como é o caso de diversos inibidores do domínio tirosina cinase do EGFR. Exemplos destes fármacos são o Erlotinib e o Gefitinib.

O Gefitinib (Iressa®) é um inibidor da tirosina cinase do EGFR, estando aprovado para doentes adultos com CPNPC localmente avançado ou metastático com mutações de ativação do EGFR-TK. Este fármaco foi o primeiro a ser aprovado para o tratamento do CPNPC avançado, no Japão, em 2002, sendo depois aprovado pela *United States Food and Drug*

Administration (US FDA) em 2003. Seguiu-se o Erlotinib (Tarceva®) em 2004, aprovado pela FDA para o tratamento de doentes com recidiva de CPNPC (Cohen, 2005).

Apesar destes fármacos demonstrarem benefícios clínicos depois de ciclos de quimioterapia em doentes com CPNPC, aquando da sequenciação dos tumores, com elevada e com fraca resposta a estes fármacos, verificou-se que os benefícios eram superiores em doentes com mutação no gene do EGFR no local de ligação do ATP no domínio da tirosina cinase (Paez et al., 2004; Lynch et al., 2004; Petrelli, 2012). Esta descoberta, permitiu uma estratificação dos doentes, o que levou à realização de novos ensaios clínicos com base nesta seleção, comprovando-se consistentemente uma eficácia terapêutica superior destes fármacos em doentes com mutação no EGFR (Inoue et al., 2006; Sunaga et al., 2007; Sugio et al., 2009).

Cerca de 90% das mutações no domínio tirosina cinase do EGFR associadas à sensibilidade terapêutica dos EGFR-TKIs são deleções no exão 19 e a mutação pontual L858R no exão 21 (Sharma et al, 2007). Assim, as mutações neste recetor emergiram como sendo o fator mais importante para seleção dos doentes aos quais administrar os fármacos EGFR-TKIs como primeira linha de tratamento.

Existem alguns efeitos secundários associados a este tipo de terapias, como por exemplo, no caso do Gefitinib e Erlotinib, a toxicidade pulmonar, sendo o caso mais preocupante, derivado da possibilidade de desenvolvimento da doença do interstício pulmonar (Cersosimo, 2006). Por outro lado, estes fármacos não representam só vantagens aquando da seleção de doentes com mutação no EGFR, visto que, se verificou que a maior parte deles, apesar de inicialmente responderem positivamente à terapia, acabam por desenvolver resistência aos fármacos e, em muitos casos, verificam-se recidivas (Jackman et al., 2010). Este tema será abordado mais à frente nesta dissertação.

1.2.3. Inibidores de Múltiplas Vias

O CPNPC é um tipo de cancro com características bastante heterogéneas e a terapia baseada na inibição de uma única via de sinalização pode não ser suficiente para impedir a progressão tumoral, visto que o tumor, muitas vezes, tem a capacidade de ativar outras vias de sinalização que lhe permite dar continuação ao seu desenvolvimento (Chen et al., 2014). Com base nesta evidência, a inibição de várias vias de sinalização pode resultar em benefícios clínicos. A combinação de fármacos direcionados mais estudada é a inibição do VEGF e da via do EGFR. Assim, encontram-se sob investigação clínica várias estratégias de combinação de fármacos direcionados para diferentes vias de sinalização, como é o caso da combinação do bevacizumab com o erlotinib (Herbst, 2005; Herbst et al., 2011).

Para além do estudo das potencialidades de combinações de fármacos, encontra-se sob foco de investigação e desenvolvimento, fármacos com múltiplos alvos terapêuticos e que, por isso, inibem várias vias de sinalização de forma simultânea (Pallis et al., 2012). O Vandetanib (Zactima®, AstraZeneca) é um desses fármacos, sendo um TKI que inibe múltiplas cinases, nomeadamente o VEGFR e o EGFR. Em ensaios clínicos de fase II em doentes com CPNPC, demonstrou resultados promissores (Natale et al., 2009; Heymach et al., 2007). No entanto, na fase III os resultados foram moderados ou negativos, motivo pelo qual não foi aprovado no tratamento de CPNPC (Commander et al., 2011). Apesar desta situação, este fármaco continua a ser considerado bastante promissor, motivo pelo qual continua em estudo em ensaios clínicos em doentes com CPNPC, de forma combinada com outros fármacos ou com diferentes condições (Falchook et al., 2014; Gridelli et al., 2014; Heymach et al., 2014).

Um outro fármaco direcionado para múltiplas vias é o Sunitinib (Sutent®, Pfizer). Este composto tem atividade de TKI e atua no VEGFR-1,-2 e -3 e no recetor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR)-a e -b, assim como em outras tirosinas cinases associadas ao desenvolvimento tumoral. O Sunitinib encontra-se, atualmente, aprovado para carcinoma das células renais e tumor estromal gastrointestinal resistente ou intolerante ao imatinib (Murray et al., 2003; Dong et al., 2006). No caso do CPNPC, encontra-se em investigação clínica, no sentido de apurar a sua eficácia neste tipo de cancro (Novello et al., 2009; Crinò et al., 2014; Scagliotti et al., 2012).

1.3. Mecanismos de Resistência às Terapias Antiangiogénicas

Nas últimas décadas foram alcançados enormes avanços no conhecimento e no desenvolvimento de fármacos antiangiogénicos na área do cancro. No entanto, os resultados clínicos têm-se revelado mais desafiantes do que inicialmente previsto, verificando-se que muitos doentes não apresentam resposta terapêutica eficaz a este tipo de compostos e outros, que inicialmente apresentam resposta, adquirem resistência depois de um período de benefício (Miller, 2005; Giuliano et al., 2013).

Assim, têm sido descritos dois tipos de resistência, a resistência adquirida e a resistência intrínseca (Bergers et al., 2008; Kerbel, 2008) (Figura 1.6).

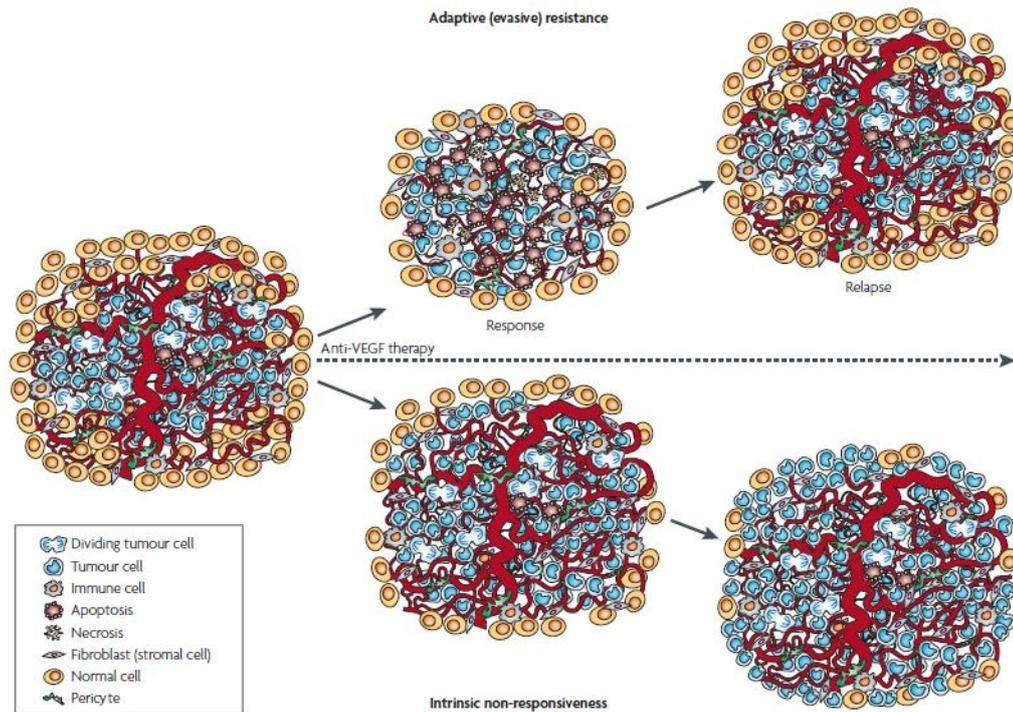


Figura I.6. Modos de resistência dos tumores à terapia antiangiogénica: resistência adaptativa e resistência intrínseca. A resistência adaptativa refere-se à capacidade de o tumor, depois de uma fase inicial de resposta, se adaptar. É, assim, criada uma evasão às vias bloqueadas pela terapia, acentuando mecanismos que permitam a neovascularização apesar do bloqueio terapêutico, levando novamente ao desenvolvimento e progressão tumoral. A resistência intrínseca considera-se uma condição pré-existente que se define pela ausência de qualquer benefício clínico por parte da terapia antiangiogénica, verificando-se um crescimento tumoral contínuo aquando da administração deste tipo de terapia. (Retirado de Bergers et al., 2008)

I.3.1 Resistência Adquirida

No caso da resistência adquirida ou adaptativa, os tumores adaptam-se ao efeito provocado pelos inibidores angiogénicos, adquirindo capacidade de escapar a este bloqueio. Assim, são ativadas vias alternativas que permitem a progressão tumoral (Bender et al., 2004; Carmeliet, 2005; Giuliano et al., 2013).

Consideram-se vários mecanismos que podem estar na origem deste tipo de resistência. Um deles é a ativação ou sob expressão de vias alternativas de sinalização pró-angiogénicas (Casanovas et al., 2005). Vários estudos têm evidenciado que a angiogénese tumoral se pode tornar independente do VEGF, através do aumento de outros fatores pró-angiogénicos como é o caso do FGF-2. (Batchelor et al., 2007).

Um outro mecanismo que tem sido associado a este tipo de resistência é o recrutamento de células progenitoras vasculares da medula óssea. A hipoxia que se faz sentir no tumor aquando da terapia antiangiogénica resulta não só no aumento de fatores pró-angiogénicos, como também no aumento de células derivadas da medula óssea, como células endoteliais progenitoras que se diferenciam em células endoteliais que integram a parede vascular (Asahara et al., 1997).

Por último, o aumento da capacidade invasiva tumoral também tem sido associado à resistência adquirida. Tem-se tornado evidente que quando a angiogénese é inibida, as células tumorais conseguem adaptar-se, migrando de forma mais agressiva para tecidos saudáveis (Bergers et al., 2008). Esta agressividade tumoral pode ser explicada pelo fato de os tumores possuírem um programa invasivo pré-existente, mas, devido à capacidade de angiogénese, não se tornava necessária a ativação (Kunkel et al., 2001; Rubenstein et al., 2000).

1.3.1.1. Resistência adquirida a terapias anti-VEGF e anti-EGF em CPNPC

Nos últimos anos, tem sido demonstrado que inibidores do EGFR apenas possuem eficácia clínica em alguns subtipos de CPNPC e, mesmo doentes que inicialmente respondem positivamente à terapia, mais tarde, eventualmente, acabam por desenvolver resistência terapêutica (Bergers et al., 2008). Têm sido feitas inúmeros estudos no sentido de entender quais os possíveis mecanismos de resistência associados ao EGFR. Constatou-se, assim, que a baixa sensibilidade aos inibidores da tirosina cinase do EGFR encontra-se associada a mutações somáticas no EGFR, vulgarmente associadas à deleção do exão 17, mas também a uma mutação pontual no exão 21, L858R (5-7), assim como substituições ao nível do exão 18 (G719C, G719S, G719A) e uma deleção do exão 19 (E746–A750) (Pao et al., 2005a; Pao et al., 2005b). Existe ainda outra alteração que parece encontrar-se associada à resistência adquirida a este recetor, uma mutação pontual na tirosina cinase do EGFR no exão 20 (T790M) (Gazdar, 2009). Esta mutação não reduz a afinidade do TKI pelo local de ligação do ATP, mas aumenta a afinidade do ATP. Assim, verifica-se que a mutação L858R em associação com a mutação T790M, representam 50% dos casos de resistência adquirida, em CPNPC (Heigener et al., 2011).

No caso do adenocarcinoma pulmonar é comum a existência de mutações ao nível do oncogene *kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (KRAS), sendo por isso um alvo terapêutico que tem vindo a ser estudado (Ostrem et al., 2013). Adicionalmente, têm vindo a ser identificadas novas mutações associadas a resistência adquirida em CPNPC, como é o caso

da via Akt e da via MAPK, estando por isso a ser intensamente estudadas no sentido de se entender como se poderão aplicar novas e mais eficazes terapias a estes casos (Collisson et al., 2014).

Para além de todos estes fatores se encontrarem associados ao desenvolvimento de resistência adquirida a fármacos TKI, o estroma tumoral também parece ter um papel crucial no desenvolvimento deste tipo de resistência em CPNPC (Cascone et al., 2011). Assim, a proteção dos vasos sanguíneos tumorais, através do aumento da sua cobertura com pericitos, tem sido associada a este tipo de resistência, sendo que os pericitos são células que têm importantes funções ao nível da estabilização e regulação homeostática dos vasos sanguíneos, assim como na mediação da maturação vascular na neovascularização. Vários estudos têm comprovado que quando se administra uma terapêutica no sentido de diminuir a vasculatura tumoral, como por exemplo o bevacizumab, apesar de se verificar uma redução da mesma, observa-se uma manutenção de vasos bastante finos vastamente envolvidos por pericitos (Cascone et al., 2011; Jain et al., 2003). Verificou-se ainda que os pericitos tumorais possuem a capacidade de expressão de VEGF e outros fatores que têm importantes funções ao nível da manutenção da vasculatura (Song et al., 2005). Com base nestes dados, têm sido investigadas novas terapias que possam ter como alvo não só as células endoteliais, mas também os pericitos (Bergers et al., 2008).

1.3.2. Resistência Intrínseca

A definição deste modo de resistência passa pela ausência de benefício clínico, incluindo o benefício transitório, de uma terapia cujo alvo é a angiogénese. Assim, não se verifica diminuição do volume tumoral nem ritmo de progressão do mesmo. Desta forma, não se observa qualquer benefício na qualidade de vida do doente nem o aumento de vida do mesmo (Bergers et al., 2008).

Este tipo de resistência pode estar relacionada com os mecanismos de resistência adquirida referidos anteriormente, no entanto, a ativação destes mecanismos não é originada em resposta à terapia, mas sim a pressões seletivas do microambiente tumoral. A existência de redundância na sinalização pró-angiogénica poderá estar associada a este modo de resistência (Bergers et al., 2008).

No sentido de entender quais os mecanismos que poderão estar na base da resistência intrínseca, têm sido alvo de investigação. Assim, a proteção vascular mediada por células inflamatórias que expressam fatores pro-angiogénicos parece estar associada a este tipo de resistência. Um estudo revelou que murganhos com desenvolvimento de tumores pulmonares,

que não foram sujeitos a quimioterapia e não apresentavam resposta à terapia antiangiogénica, possuíam uma elevada expressão de células inflamatórias. Contrariamente, tumores que responderam à terapia não apresentavam a elevada expressão deste tipo de células. Observou-se ainda que, com a administração de uma terapia que inibiu o recrutamento de células inflamatórias, os tumores que eram resistentes passaram a responder à terapia. Verifica-se, assim, a existência de uma correlação entre a elevada presença de células inflamatórias e a resistência a terapias antiangiogénicas (Shojaei et al., 2007).

Para além disso, tumores hipovascularizados não apresentam qualquer resposta à terapia anti-VEGF, como é o caso do adenocarcinoma ductal pancreático (Sofuni et al., 2005). Estes tumores parecem ter-se adaptado a condições de hipoxia, tornando-se intrinsecamente resistentes a este tipo de terapia. Este fato, associado à utilização de vias metabólicas que favorecem a sobrevivência celular em condições anaeróbias, resulta na forma como o tumor consegue desenvolver-se mesmo em condições de hipoxia (Cowgill et al., 2003).

1.3.2.2. Resistência Intrínseca a terapias antiangiogénicas em CPNPC

Com o objetivo de se compreenderem melhor os mecanismos associados à resistência intrínseca a terapias anti-VEGF, em CPNPC, também têm sido efetuados vários estudos. Apesar de muitos destes estudos revelarem que este tipo de resistência se encontra associada às células cancerígenas, têm surgido dados que demonstram que o estroma tumoral tem um papel fundamental no desenvolvimento de resistência intrínseca (Crawford et al., 2009; Ebos et al., 2009a; Ellis et al., 2008). Assim, Cascone et al. (2011), verificaram num modelo de resistência intrínseca (linha celular A549 de CPNPC) que quando as células eram resistentes ao tratamento com bevacizumab, um fármaco anti-VEGF, se verificava uma sobre-expressão do EGFR no estroma tumoral, mais concretamente no endotélio tumoral. (Cascone et al., 2011). Para além disso, observaram nos tumores resistentes ao bevacizumab que, apesar de não se verificarem alterações ao nível do crescimento tumoral, existia uma revascularização desorganizada e uma diminuição da cobertura dos vasos com pericitos, assim como observaram uma tortuosidade dos vasos endoteliais. Estes dados poderão indicar que os tumores resistentes aos fármacos anti-angiogénicos, conseguem modelar-se de forma a deixarem de depender do VEGFR e passarem a depender do EGFR para promoção da proliferação endotelial (Cascone et al., 2011). Demonstrou-se, assim, que a resistência intrínseca a terapias anti-angiogénicas poderá estar associada ao estroma tumoral, através da alteração e modulação das vias através das quais o tumor depende.

I.4. Células Estaminais Tumorais

Estudos em vários tipos de cancro, inclusivamente em CPNPC, têm identificado uma população de células com características de células estaminais que sustentam o crescimento tumoral, sendo por isso denominadas “células estaminais tumorais” (CSC) (Visvader, 2008; Kerbel, 2008; Visvader, 2011). Esta população de células exhibe propriedades de auto-renovação, potencial ilimitado de proliferação, capacidade de diferenciação, assim como capacidade de divisão assimétrica, originando uma célula diferenciada e uma célula estaminal (Morrison et al., 2013). Estas características conferem a esta população um enorme potencial tumorigénico, estando assim associadas à metastização, a recidivas tumorais, a um prognóstico incerto e à evasão a vários tipos de terapias (Ginestier et al., 2007; Marcato et al., 2011; Benayoun et al., 2012). Já foram identificadas em vários tipos de cancro, nomeadamente, leucemia mieloide aguda, melanoma, glioma, mama, colon, pâncreas, próstata e pulmão (Visvader, 2008).

Estas células possuem várias propriedades moleculares e celulares que as diferenciam das restantes células tumorais, como a capacidade de crescimento em esferas em meio livre de soro (Dontu et al., 2003; Eramo et al., 2008; Fonseca et al., 2015), imunofenótipos de superfície característicos de células estaminais (Subramaniam et al., 2010) e enriquecimento em aldeído desidrogenases (ALDH) (Jiang et al., 2009; Huang et al., 2013; Liu et al., 2013).

Com base na evidente relação entre CSC, tumorigénese e resistência a terapias, torna-se necessária a investigação de novos marcadores destas células e o desenvolvimento de novas terapias que tenham esta população como alvo.

I.4.1. Identificação da População Enriquecida em CSC

I.4.1.1. Marcadores Superficiais: CD44 e CD133

Têm sido identificados vários marcadores de células estaminais de tecidos saudáveis para posterior identificação e isolamento de CSC. O CD133 tem sido o marcador superficial mais frequentemente utilizado em tumores do fígado, cérebro, cólon e pulmão para identificação desta população de células (Singh et al., 2004; Ma et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007; Eramo et al., 2008). Estudos recentes em linhas celulares de CPNPC sugeriram o CD133 como sendo marcador de CSC neste tipo de cancro (Chen et al., 2008; Eramo et al., 2008; Bertolini et al., 2009; Tirino et al., 2009).

Apesar da função do CD133 (prominina-1) não estar bem descrita, tem sido reportado que está envolvido na regulação do ciclo celular e na proliferação tumoral, mas não necessariamente no despoletar do tumor (Wu et al., 2009).

O CD44 é um outro marcador de CSC que tem sido descrito para vários tumores, inclusivamente CPNPC (Leung et al., 2010). Este marcador é uma glicoproteína transmembranar que atua como recetor na membrana celular. Liga-se ao ácido hialurónico, estando envolvido na adesão celular, metástases e tem sido relacionado com a resistência terapêutica (Wu et al., 2009; Miletti-González et al., 2005).

1.4.1.2. Marcador Funcional: ALDH

Um marcador funcional, neste caso, é um marcador que está associado a uma função característica das CSC e que pode ser utilizado para marcar ou isolar esta população. A ALDH tem sido reportada como sendo um marcador funcional desta população de células em vários tipos de cancro, entre eles o CPNPC (Liang et al., 2012), sendo que a sobre-expressão da ALDH tem-se correlacionado com um prognóstico menos favorável nos seus estados iniciais (Ho et al., 2007).

Além do CPNPC, também tem sido utilizada como marcador em cancro pancreático, da mama, da próstata, entre outros (Vinogradov et al., 2012). Esta enzima catalisa a oxidação de um conjunto de aldeídos em ácidos carboxílicos, nomeadamente do retinol em ácido retinóico, processo este que ocorre em fases precoces da diferenciação de células estaminais (Morrison et al., 2013). A classe I da família da ALDH (ALDH1) é a isoforma que predomina nos mamíferos (Jiang et al., 2009).

Com base nestes estudos, para além de imprescindíveis na identificação das CSC, estes marcadores podem-se considerar promissores alvos terapêuticos, permitindo um melhor direcionamento das terapias para esta população. Por outro lado, podem também ser utilizados enquanto agentes de prognóstico (Morrison et al., 2013).

1.4.2. Papel das CSC na Resistência Tumoral

As CSC parecem encontrar-se vastamente associadas aos dois modos de resistência acima referidos (Shetzer et al., 2014). Como referido, a resistência intrínseca é definida como sendo uma pré-existente predisposição para resistir às terapias, enquanto a resistência adquirida se associa à aquisição de resistência durante a exposição ao tratamento. Este último caso, deve-se a pressões seletivas induzidas pelo fármaco, levando à expansão baseada na

vantagem das células resistentes. Existem vários mecanismos que permitem a estas células sobreviver e resistir, nomeadamente alterações ao nível da reparação do ADN e das vias de sinalização da apoptose e de sobrevivência, assim como a expressão de enzimas de detoxificação (Vinogradov et al., 2012; Shetzer et al., 2014).

Também a condição de hipoxia que se verifica no microambiente tumoral tem sido sugerida como uma forma de selecionar os clones de células tumorais que conseguem sobreviver neste ambiente, havendo um constante renovação dessas células (Keith et al., 2007). As CSC, sendo tolerantes a condições de hipoxia, parecem ter um papel preponderante no desenvolvimento de resistência a fármacos antiangiogénicos, uma vez que estão adaptadas a um ambiente privado de oxigénio (Wang et al., 2010). Adicionalmente, existem estudos que comprovam que as CSC são mais invasivas e promovem a metastização tumoral (Ebos et al., 2009b; Pàez-Ribes et al., 2009).

Têm sido efetuados vários estudos no sentido de compreender melhor o papel da população de CSC no desenvolvimento de resistência aos fármacos anti-VEGF e anti-EGF, em CPNPC. Desta forma, existem dados que demonstram que células que possuem uma elevada expressão de ALDH, ou seja potenciais células estaminais tumorais, tal como descrito anteriormente, apresentam um potencial tumorigénico muito superior quando comparado com as células que possuem baixa expressão de ALDH (Huang et al., 2013). No mesmo estudo, foi também demonstrado que a população enriquecida em células estaminais tumorais promovia a resistência a um fármaco inibidor da tirosina cinase do EGFR (gefitinib) (Huang et al., 2013).

Um outro estudo com células de CPNPC, revelou que tumores derivados de células que possuíam elevada expressão de CD44 e ALDH, mais uma vez potenciais células estaminais tumorais, induziam o crescimento tumoral de forma muito superior quando comparado com a população que possuía baixos níveis destes marcadores (Liu et al., 2013). Adicionalmente, verificou-se que tumores que derivavam de células que possuíam elevados níveis de ALDH e CD44, apresentavam resistência ao gefitinib. No entanto, depois de ser efetuada depleção do CD44 e inibição da ALDH, a sensibilidade ao gefitinib aumentava, sugerindo que estes marcadores são essenciais à manutenção das células estaminais tumorais em CPNPC (Liu et al., 2013).

Com base em todos os mecanismos de resistência que se têm verificado às diversas terapias, torna-se urgente o desenvolvimento de novas e mais efetivas estratégias terapêuticas que possam ultrapassar estes mecanismos de resistência e que resultem em benefícios clínicos sustentáveis e duradouros para os doentes de CPNPC (Wang et al., 2014).

I.5. Nanopartículas Direcionadas como Sistema de Entrega de Fármacos

I.5.1. Estratégias Terapêuticas de Base Lípica

A quimioterapia é baseada em compostos tóxicos que inibem a rápida proliferação das células tumorais, no entanto desencadeia uma elevada toxicidade em tecidos saudáveis, estando por isso associada a bastantes efeitos colaterais, acompanhados de um baixo benefício terapêutico (Pérez-herrero et al., 2015).

Surgiu assim a necessidade de se desenvolverem novas terapias, capazes de colmatar estes efeitos colaterais. Têm sido, por isso, desenvolvidos vários sistemas de entrega de fármacos baseados em nanopartículas, entre eles os lipossomas (Torchilin, 2005; Fonseca, et al., 2014; Pérez-herrero et al., 2015; Moura et al., 2012). Este tipo de partículas têm sido vastamente estudadas para encapsulação de fármacos, uma vez que são vesículas compostas por fosfolípidos que se organizam em estruturas semelhantes à bicamada da membrana celular, sendo biodegradáveis e biocompatíveis (Fonseca et al., 2014; Torchilin 2005). Desta forma, podem encapsular fármacos hidrofílicos no seu interior e lipofílicos da sua camada fosfolípida (Torchilin, 2005; Pérez-herrero et al., 2015).

No sentido de aumentar a internalização celular dos lipossomas e, conseqüentemente, a sua eficácia terapêutica, estas partículas têm sido funcionalizadas com ligandos que permitem bloquear vias de transdução ou proteínas envolvidas no crescimento e progressão tumoral (Figura I.7). Assim, torna-se possível a diminuição do acesso da terapia a tecidos saudáveis e, conseqüentemente, a diminuição dos efeitos secundários inerentes. (Pérez-herrero et al., 2015).

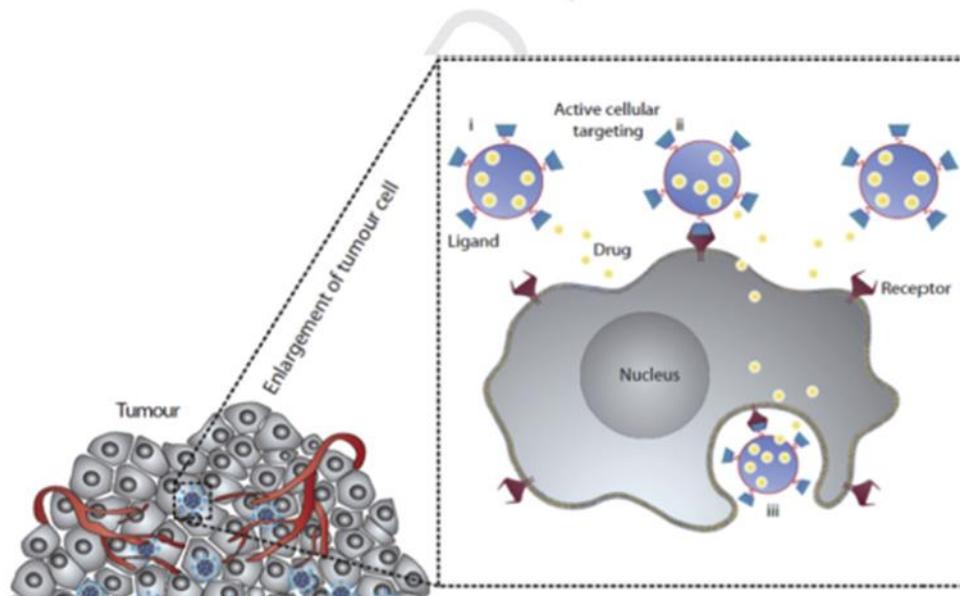


Figura 1.7. Nanopartículas como promissoras formas de transporte de fármacos anticancerígenos para o tumor. O direcionamento tumoral é efetuado através da funcionalização da superfície das nanopartículas, que possuem o fármaco anticancerígeno encapsulado, permitindo o reconhecimento da célula cancerígena e tornando possível o aumento da eficácia. (Adaptado de Peer et al., 2007).

Inicialmente, a desvantagem associada a este tipo de terapia residia no fato de não possuir um longo período de circulação no sangue, devido à adsorção por parte das proteínas do plasma, opsoninas, levando ao reconhecimento dos lipossomas, que eram rapidamente eliminados pelo sistema mononuclear fagocítico (MPS) (Lasic et al., 1991; Papahadjopoulos et al., 1991; Sapro et al., 2003). Este inconveniente diminuía o potencial terapêutico destas nanopartículas pelo que, no sentido de colmatar esta desvantagem, surgiram os lipossomas revestidos por polietilenoglicol (PEG), conhecidos por lipossomas *Stealth*[®], levando à aprovação do Doxil[®] pela FDA em 1995 (Moreira et al., 2001; Cuenca et al., 2006; Barenholz, 2012). A nuvem hidrofílica formada pelo PEG que envolve os lipossomas, diminui a opsonização, uma vez que torna as nanopartículas invisíveis ao MPS. Isto resulta num maior período de circulação e, conseqüentemente, numa acumulação superior de fármaco no tumor com eficácia aumentada (Fonseca et al., 2014; Torchilin 2005).

Os lipossomas consideram-se, assim, uma promissora forma de terapia do cancro, capazes de ultrapassar as limitações associadas à quimioterapia, como a toxicidade e a dificuldade de entrega de compostos terapêuticos hidrofóbicos (Allen et al., 2013).

Tabela II. Formulações lipossômicas comercialmente disponíveis ou sob avaliação clínica. (Retirado de Torchilin, 2005)

Active drug	Product name [‡]	Indications
Daunorubicin	DaunoXome	Kaposi's sarcoma
Doxorubicin	Mycet	Combinational therapy of recurrent breast cancer
Doxorubicin in PEG-liposomes	Doxil/Caelyx	Refractory Kaposi's sarcoma; ovarian cancer; recurrent breast cancer
Amphotericin B	AmBisome	Fungal infections
Cytarabine	DepoCyt	Lymphomatous meningitis
Vincristine	Onco TCS	Non-Hodgkin's lymphoma
Lurtotecan	NX211	Ovarian cancer
Nystatin	Nyotran	Topical antifungal agent
All- <i>trans</i> retinoic acid	Altragen	Acute promyelocytic leukaemia; non-Hodgkin's lymphoma; renal-cell carcinoma; Kaposi's sarcoma
Platinum compounds	Platar	Solid tumours
Annamycin		Doxorubicin-resistant tumours
<i>E1A</i> gene		Various tumours
DNA plasmid encoding HLA-B7 and $\alpha 2$ microglobulin	Allovectin-7	Metastatic melanoma
Liposomes for various drugs and diagnostic agents (lipoMASC)		Broad applications

[‡]In different countries the same drug could be approved for different indications or be at different phases of clinical trials). [†]Name of liposome formulation.

1.5.2. Lipossomas Sensíveis ao pH

Nos últimos anos, tem-se verificado uma intensa investigação no sentido de melhorar as características dos lipossomas para um aumento de entrega intracelular e consequente eficácia terapêutica. Através da composição lipídica é possível alterar as propriedades dos lipossomas e torná-los sensíveis a estímulos como, por exemplo, o pH (Simões et al., 2004). Lipossomas sensíveis ao pH são lipossomas estáveis a pH fisiológico (pH 7,4) mas em condições ácidas, como é o caso do microambiente tumoral e das vesículas endocíticas formadas durante a endocitose das partículas, verifica-se uma destabilização da membrana do lipossoma e o seu conteúdo é libertado (Simões et al., 2004; Torchilin 2005).

Normalmente, estes lipossomas são compostos pelo lípido dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), que é um lípido fusogénico que não adota a estrutura em bicamada mas sim uma fase hexagonal invertida, e um lípido como o hemisuccinato de colesterol (CHEMS), que contém um grupo ácido ionizável (Hafez et al., 2000b; Paliwal et al., 2014). O conjugado CHEMS/DOPE é estável a pH neutro, uma vez que em valores acima de pH 6,0, o CHEMS possui carga negativa, o que induz estabilidade ao DOPE. No entanto, quando o pH é ácido, dá-se a protonação do CHEMS resultando numa diminuição de estabilidade do DOPE na estrutura lipídica que adota a sua estrutura favorável, destabilizando a membrana e permitindo a libertação do seu conteúdo (Simões et al., 2004). Com base nesta conjugação, é possível que esta libertação do conteúdo do lipossoma se dê nas células alvo, através da acidez existente

na via endocítica no ambiente intracelular, aumentando a eficácia terapêutica (Hafez et al., 2000a; Paliwal et al., 2014).

1.5.3. Nucleolina como Alvo Terapêutico em Cancro

Como já referido anteriormente, o crescimento tumoral é bastante dependente da angiogénese. Desta forma, torna-se necessário o conhecimento de novos marcadores da neovasculatura, uma vez que o conhecimento desses alvos pode resultar tanto no desenvolvimento de novos agentes de diagnóstico como de terapia (Christian et al., 2003; Hood et al., 2002).

Assim, foi identificada uma proteína, denominada nucleolina, que para além de estar presente no nucléolo, núcleo e citoplasma, também se encontra na superfície das células endoteliais tumorais e nas células tumorais. Esta proteína tem uma massa de 100 a 110 kD e está presente em células em crescimento exponencial, possuindo funções ao nível da transcrição, proliferação e crescimento celular (Christian et al., 2003). No nucléolo, a nucleolina está envolvida na biogénese do ribossoma e na transcrição do ácido ribonucleico ribossómico (ARNr), assim como na maturação do pré-ácido ribonucleico mensageiro (ARNm) (Berger et al., 2015). No núcleo, está envolvida na replicação do ADN, assim como na sua reparação e no citoplasma está relacionada com a regulação pós-transcricional do ARNm (Sader et al., 2015).

O fato de a nucleolina se encontrar sobre-expressa na superfície celular de muitas células cancerígenas e na vasculatura tumoral, faz com que seja apontada como um alvo promissor para direcionamento de estratégias terapêuticas em cancro (Berger et al., 2015; Fujiki et al., 2014).

Desta forma, já foi identificado um peptídeo que reconhece a nucleolina, o F3 (Porkka et al., 2002). Este ligando, que tem 34 aminoácidos, foi utilizado no desenvolvimento de uma nanopartícula de base lipídica por Moura et al., (2012). Trata-se de um lipossoma PEGuilado sensível ao pH, que contém doxorubicina encapsulada e, através da conjugação com o peptídeo F3 na sua superfície, é direcionado para a nucleolina, tendo como alvos as células cancerígenas e as células endoteliais tumorais. Com esta nanopartícula, foram obtidos potentes efeitos terapêuticos em modelos animais de cancro da mama (Moura et al., 2012). A doxorubicina é um citostático do grupo das antraciclinas bastante usado em quimioterapia, no entanto possui efeitos colaterais devastadores, nomeadamente cardiotoxicidade, toxicidade gastrointestinal, vómitos e alopecia (Ichikawa et al., 2014). Estes efeitos devem-se, principalmente, ao fato de esta terapia atingir todas as células do organismo, inclusivamente

tecidos saudáveis. Assim, esta nova formulação lipossomal, estando direcionada para a nucleolina, que se encontra sobre-expressa em duas populações no microambiente tumoral, possibilita uma diminuição destes efeitos adversos e um aumento da eficácia terapêutica (Moura et al., 2012).

1.6. Objetivos

Com base em todo o conhecimento que foi gerado relativamente a novas terapias contra o cancro e aos problemas que se encontram na clínica, principalmente a resistência a terapias convencionais e a novas terapias angiogénicas, é de grande relevância e urgência que se compreendam estes mecanismos, no sentido de ser possível o desenvolvimento de inovadoras e efetivas estratégias terapêuticas que ultrapassassem estes problemas. Assim, este projeto foi desenvolvido com o principal objetivo de estudar o papel da população de células estaminais tumorais no desenvolvimento de resistência às terapias dirigidas, nomeadamente às terapias inibidoras de tirosina cinase (anti-VEGF e anti-EGF), em cancro do pulmão de não pequenas células. Neste sentido, delinearam-se os seguintes objetivos específicos:

- Identificar/caracterizar a população de CSC no modelo celular de cancro do pulmão HI975;
- Verificar se uma nanopartícula recentemente desenvolvida no nosso laboratório, um lipossoma PEGuilado sensível ao pH (encapsulando doxorrubicina) e direcionado para a nucleolina através da conjugação com o peptídeo F3 à superfície, tem a capacidade de se ligar e ser internalizado pela população de CSC identificadas no modelo celular;
- Isolar a população de CSC e não-CSC e estudar a capacidade citotóxica desta nova estratégia terapêutica nestas populações, de forma isolada e em conjunto com fármacos inibidores de tirosina cinase (vandetanib e erlotinib).

CAPÍTULO II

Materiais e Métodos

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Os lípidos constituintes da nanopartícula, nomeadamente 1,2 dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2 -disteraroil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[folato (polietilenoglicol)- 2000] (DSPE PEG2k), e 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[maleimida(polietileno glicol)-2000] (DSPE-PEG2k-MAL) foram fornecidos pela empresa *Avanti Polar Lipids* (Alabaster, Alabama, Estados Unidos da América (EUA)). Os lípidos hemissuccinato de colesterol (CHEMS) e o colesterol (CHOL) foram adquiridos a partir da empresa *Sigma-Aldrich* (EUA).

A doxorubicina (hidroclorato) (DXR) foi obtida a partir da *IdisPharma* (Reino Unido). Os peptídeos não específico (NS) (ARALPSQRSR) e específico (F3) (KDEPQRRSARLSAKPAPPKPEPKPKKAPAKK) foram sintetizados pela *Genecust* (Luxemburgo).

Os fármacos erlotinib, vandetanib, gefitinib e sunitinib foram adquiridos à *Selleckchem* (Houston, Texas, EUA)

A linha celular H1975, células de cancro do pulmão de não pequenas células (CPNPC), foi fornecida pela *American Type Culture Collection* (Virginia, EUA).

2.2. Métodos

2.2.1. Cultura Celular

As culturas celulares foram mantidas em meio RPMI-1640 (*Sigma-Aldrich*, EUA), suplementado com 10% (v/v) de Soro Fetal de Bovino (FBS) (Invitrogen), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (*Lonza*, Suíça). As células foram mantidas a 37° C, numa atmosfera húmida a 90%, contendo 5% de CO₂.

2.2.2. Preparação dos Lipossomas

2.2.2.1. Ativação dos Ligandos

Foram preparadas três formulações lipossomais sensíveis ao pH (DOPE:CHEMS:DSPC:CHOL:DSPE-PEG num rácio molar de 4:2:2:2:0,8), sendo que, em duas delas, foi introduzido um peptídeo na superfície do lipossoma através do método de pós-inserção (Moreira et al., 2002). O processo de ativação dos ligandos, não específico (NS) e específico (F3) inicia-se com a tiolação dos mesmos, através da reação com o 2-iminotiolano

(2-IT) (*Sigma-Aldrich*, EUA) em solução salina tamponada com HEPES (ácido N-(2-hidroxiethyl)piperazina-N'-2-etanossulfônico) (HBS) a pH 8, durante 1 h, à temperatura ambiente. Decorrida esta hora, os ligandos foram acoplados a micelas de DSPE-PEG-MAL, preparadas previamente a 50° C, em tampão salino MES (ácido 2-morfolino etano sulfônico), a pH 6,5. Estes conjugados, DSPE-PEG2k-F3 e DSPE-PEG2k-NS, foram deixados a reagir (reação de acoplamento) durante cerca de 12 horas, à temperatura ambiente.

2.2.2.2. Preparação dos Lipossomas por Injeção de Etanol

Concluído este período, os lipossomas foram preparados segundo o método de injeção de etanol (Gomes-Da-Silva et al., 2013; Maurer et al., 2001; Semple et al., 2001). As soluções lipídicas foram adicionadas ao tampão de sulfato de amônio a 300 mM (pH 8,5) pré-aquecido a 60° C. De forma breve, quarenta microlitros de solução orgânica lipídica foram adicionados ao tampão de sulfato de amônio, gota a gota, sob 30 segundos de vórtex, seguido do aquecimento das formulações a 60° C durante cerca de 1 minuto. Todo este procedimento foi repetido até que todo o lípido fosse adicionado ao tampão.

De seguida, todas as formulações foram sujeitas a extrusão através de membranas de policarbonato, com diâmetro de poro de 50 nm utilizando um extrusor LipoFast Basic (*Avestin*, Canadá). De seguida, o tampão foi trocado recorrendo a cromatografia de exclusão molecular em gel, usando uma coluna Sephadex G-50 (*Sigma-Aldrich*, EUA) equilibrada com uma solução tampão 25 mM Trizma base, em 10% sacarose (m/V), a pH 9,0. De forma a garantir que a doxorrubicina fosse encapsulada, foi utilizado o método do gradiente do sulfato de amônio durante 1 hora e 30 minutos, a 60° C, na ausência de luz (Bolotin et al., 1994). A doxorrubicina livre (fármaco não encapsulado) foi removida através de cromatografia de exclusão molecular em gel, usando uma coluna Sephadex G-50, equilibrada com 25mM de HEPES e 140mM de cloreto de sódio (NaCl), a pH 7,4 (HBS).

2.2.2.3. Processo de Pós-Inserção

Para ser possível a obtenção de lipossomas vetorizados, após a passagem dos mesmos pela coluna de cromatografia, os lipossomas pré-formados foram sujeitos ao processo de pós-inserção dos respetivos ligandos (NS e F3). Os conjugados (micela-ligando) foram então adicionados aos lipossomas numa proporção lípido total/conjugado de 2 mol% e deixados a incubar a durante 1 hora, a 50⁰C, para promover a inserção do conjugado na bicamada lipídica (Gomes-Da-Silva et al., 2012; Santos et al., 2010; Semple et al., 2001).

Para preparar lipossomas marcados com rodamina, o lípido rodamina-PE (RhoD-PE) (*Avanti Polar Lipids*) foi adicionado à mistura lipídica (1 mol% de lípido total). Os lipossomas foram igualmente preparados segundo o método de injeção de etanol, no entanto os lípidos foram hidratados com um tampão de 25 mM HEPES e 140 mM NaCl (pH 7,4). Os lipossomas resultantes foram sujeitos a extrusão e, de seguida, a pós-inserção, tal como descrito anteriormente.

2.2.3. Caracterização de Lipossomas

O índice de polidispersão e o tamanho das nanopartículas foi determinado por *dynamic light scattering*, utilizando o analisador de tamanhos N5 (*Beckman Coulter*, Califórnia, EUA). A concentração final de lípido foi determinada após quantificação de colesterol usando o kit *Infinity Cholesterol* (*ThermoScientific*, Massachusetts, EUA).

A absorvância do fármaco encapsulado foi determinada a 492 nm, por interpolação em curva padrão sob solubilização dos lipossomas em 90% de etanol absoluto, de forma a determinar a concentração de DXR nas nanopartículas.

2.2.4. Estudo de Associação Celular por Citometria de Fluxo

No sentido de determinar a especificidade do ligando F3 na associação celular (ligação e internalização) dos lipossomas em células de cancro de pulmão, duzentas mil células da linha celular HI975 foram incubadas com os lipossomas marcados com rodamina-PE (RhoD-PE) (0,78 mM) não vetorizados (pSL), vetorizados com o ligando não específico (p[NS]SL) e vetorizados com o ligando específico, F3 (p[F3]SL). Foram realizados estudos com incubações de 1 e 4 horas, a 37° C e 1 hora, a 4° C. Após lavagem com tampão PBS, as células foram destacadas e imediatamente analisadas por citometria de fluxo (BD FACScalibur, BD Biosciences, USA). A fluorescência correspondente à RhoD-PE foi avaliada por FL2, num total de 20 000 eventos registados. Os resultados obtidos foram analisados através do *software Cell Quest Pro* (BD Biosciences) e normalizados contra células não sujeitas à incubação com lipossomas.

2.2.5. Estudo de Associação Celular por Microscopia de Fluorescência

A extensão de associação celular foi posteriormente confirmada por microscopia de fluorescência. Duzentas mil células da linha celular HI975 foram incubadas com lipossomas marcados com RhoD-PE (0,78 mM) pSL, p[NS]SL e p[F3]. Foram realizados estudos de 1 hora de incubação com os lipossomas, a 37° C e 4° C. Após lavagem com tampão fosfato salino

(PBS), foi possível obter as imagens de fluorescência, detetada através do microscópio ZOE™ *Fluorescent Cell Imager*, com uma ampliação de 125 vezes.

2.2.6. Estudos de Citotoxicidade

2.2.6.1. Formulações Lipossomais

Para que o efeito citotóxico da doxorubicina (DXR), encapsulada em cada uma das formulações lipossomais, em células de cancro do pulmão pudesse ser avaliado, recorreu-se a estudos de citotoxicidade. Assim, 24 horas antes do ensaio, 7000 células da linha H1975 foram plaqueadas. Após este período, as células foram incubadas com diferentes concentrações de DXR livre ou encapsulada nas diferentes formulações lipossomais, pSL, pSL[NS] e pSL[F3] ($[DXR]_{\text{máx}}=100 \mu\text{M}$), durante 1, 4 e 8 horas, a 37° C.

Para todas as condições, após cada período de incubação, o meio de cultura contendo cada tratamento foi substituído por meio de cultura RPMI e as células foram mantidas em cultura até um total de 120 horas de ensaio, para que completassem 3 ciclos de crescimento celular.

No final do ensaio, a viabilidade celular pôde ser avaliada através do método da resazurina (*AlamarBlue®*, Invitrogen). Segundo este método, apenas as células metabolicamente ativas reduzem a resazurina, sendo possível avaliar a viabilidade celular, através da leitura da absorvância a 570-600 nm (O'Brien et al., 2000; Rampersad, 2012).

2.2.6.2. Fármacos Inibidores de Tirosina Cinase

Com o objetivo de avaliar a viabilidade celular resultante do tratamento com os fármacos Erlotinib, Gefitinib, Vandetanib e Sunitinib, 24 horas antes do ensaio, 7000 células da linha H1975 foram plaqueadas. De seguida, as células foram sujeitas a tratamento com cada um dos fármacos em várias concentrações ($[]_{\text{máxima}}=50 \mu\text{M}$), durante 1, 4, 8 e 48 horas no caso do sunitinib e, 1, 4, 8 e 72 horas no caso de todos os outros fármacos. Passados estes períodos, o meio de cultura foi trocado e as células permaneceram em cultura até perfazer 120 horas de ensaio.

Por último, foi também testado o efeito citotóxico do tratamento com as diferentes fármacos livres Erlotinib, Gefitinib, Vandetanib e Sunitinib, seguidos do tratamento com DXR encapsulada nos lipossomas vetorizados com F3 (pSL[F3]). Assim, depois de 48 ou 72 horas de tratamento, dependendo do fármaco, as células foram sujeitas a tratamento com os lipossomas pSL[F3], durante 1 e 4 horas, nas concentrações usadas anteriormente para esta formulação. Mais uma vez, após cada um destes períodos, o meio de cultura contendo cada tratamento foi

substituído por meio novo e as células foram mantidas em cultura até um total de 120 horas de ensaio. Como descrito anteriormente, a viabilidade celular foi, de seguida, avaliada através do método da resazurina.

2.2.7. Ensaio de Formação de Esferas

O ensaio de formação de esferas foi utilizado como forma de avaliar o potencial estaminal da linha celular HI975, como descrito na literatura (Eramo et al. 2008; Singh et al., 2012). Assim, foram plaqueadas duas densidades celulares diferentes, 5000 e 10000 células, por poço e cultivadas em meio de cultura específico suplementado *Mammocult*^R, durante 6 a 7 dias. As células foram plaqueadas em poços de 2 mL de baixa aderência (Greiner Bio-one, EUA), em triplicados. Após 7 dias de cultura das esferas de 1^a geração foi avaliada a 2^a geração da linha. Assim, a mesma foi originada a partir da desagregação das esferas de 1^a geração que foram depois plaqueadas nas densidades de 5000 e 10000 células por poço, usando as mesmas condições descritas para a 1^a geração.

A eficiência de formação de esferas foi verificada com base na aquisição de 9 fotografias aleatórias por poço, usando o microscópio *Axiovert 40C* acoplado com uma máquina fotográfica *Canon Powershot G10* e com o auxílio do *software Axiovision* (versão 4.8.2) (Zeiss, Alemanha). A análise das imagens e a contagem das esferas foi efetuada usando o *software Fiji* (US National Institutes of Health). A eficiência de formação de esferas (%), foi calculada através da fórmula $[(\text{Número de esferas}/\text{Número total de eventos})] \times 100$, sendo o número total de eventos a adição do número de esferas com o número de células individuais. De notar que apenas foram contabilizadas enquanto esferas, aquelas que possuíam um diâmetro superior a 50 μm .

2.2.8. Identificação da População Celular Enriquecida em Células Estaminais Tumorais

2.2.8.1. CD44 e ALDH

Meio milhão de células da linha celular HI975 foram incubadas com as três formulações de lipossomas (não vetorizados, vetorizados com o ligando não específico e vetorizados com o ligando específico, F3), marcados com rodamina, numa concentração de 0,4 mM de lípido total, durante 1 hora, a 37° C. Após lavagem com PBS, as células foram destacadas e marcadas com marcadores de células estaminais tumorais em CPNPC descritos na literatura, CD44 e ALDH (Huang et al., 2013; Jiang et al., 2009; Leung et al., 2010; Liu et al., 2013). Inicialmente

as células foram marcadas com o anticorpo anti-CD44-PE/Cy5 (*Abcam*, Reino Unido), e com o controlo, o isotipo IgG2b (*Biologend*, EUA), durante 30 minutos a 4°C, em tampão PBS com 1% de albumina sérica humana (BSA) (PBS-BSA). De seguida, as células foram lavadas com PBS-BSA e incubadas com o reagente ALDEFLUOR® (*StemCell Technologies*, Canadá), durante 30 minutos, a 37° C e de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, as células foram suspensas num tampão que possui o substrato da ALDH sem carga, o BODIPY-aminoacetaldeído (BAAA). O BAAA é captado pelas células e é oxidado pela ALDH ficando com carga negativa (BODIPY-aminoacetato (BAA)) e, conseqüentemente, sendo retido no interior celular. Assim, em células que possuam elevados níveis de ALDH será emitida fluorescência. Como controlo negativo, é utilizado um inibidor da ALDH, o dietilaminobenzaldeído (DEAB), impedindo a reação de oxidação e permitindo a identificação das células que apresentam fluorescência não específica. Seguidamente, as células foram imediatamente analisadas por citometria de fluxo (*BD FACSCalibur system*, *BD Biosciences*, EUA) e foram recolhidos no total 15000 eventos. Foram ainda utilizados vários controlos no sentido de assegurar uma correta compensação do sinal de fluorescência em cada canal.

2.2.8.2. CD44 e CD133

Com base em vários estudos publicados, o CD133 é um marcador de células estaminais tumorais, nomeadamente de cancro de pulmão (Eramo et al., 2008; Wang et al., 2013). Assim sendo, foi testada a expressão de CD133 e, novamente CD44, nas células H1975. O procedimento utilizado foi idêntico ao descrito anteriormente, em que as células foram marcadas com os anticorpos CD44-PE/Cy5 e CD133/1(AC133)- VioBright FITC (*Miltenyi Biotec Inc.*, USA), durante 30 minutos a 4° C, em tampão PBS-BSA. Como controlos, as células foram marcadas com o isotipo do CD44, IgG2b e com o isotipo do CD133, IgG1. De igual forma ao processo descrito anteriormente, as células foram analisadas por citometria de fluxo.

2.2.9. Seleção das Populações CD44⁺/ALDH⁺ e CD44⁻/ALDH⁻ por Cell Sorting

Foram plaqueadas 25 milhões de células H9175 e marcadas com CD44-PE/Cy5 e reagente ALDEFLUOR® em tampão PBS com 1% BSA, como descrito anteriormente. De seguida, através da técnica de *cell sorting* foi possível selecionar as populações de CSCs e não-CSCs. Assim, esta seleção foi feita com base nos marcadores de CSCs CD44 e ALDH que foram previamente utilizados na identificação destas duas subpopulações nesta linha celular, por citometria de fluxo. A seleção das CSCs foi então efetuada com base na elevada expressão

de CD44 e ALDH (CD44⁺/ALDH⁺) e a população de não-CSCs foi selecionada com base na baixa expressão destes mesmos marcadores (CD44⁻/ALDH⁻) (Liu et al. 2013). Esta seleção foi possível através do equipamento *BD FACSAria III cell sorter* (BD Biosciences, EUA), tendo sido recolhidas entre 10 e 15 % de cada subpopulação. Todas as condições controlo, previamente definidas, foram utilizados neste processo para que fosse assegurada a fiabilidade dos resultados (Liu et al., 2013).

2.2.10. Estudo da Citotoxicidade nas Populações CD44⁺/ALDH⁺ e CD44⁻/ALDH⁻

2.2.10.1. Formulação Lipossomal

As duas populações de células que foram selecionadas pela técnica *cell sorting*, CD44⁺/ALDH⁺ e CD44⁻/ALDH⁻, foram plaqueadas e, 24 horas depois, sujeitas a ensaios de citotoxicidade com a nanopartícula vetorizada com o peptídeo F3 (pSL[F3]). Assim, foram testadas várias concentrações ($[DXR]_{\max}=10 \mu\text{M}$) durante 4 horas de incubação. Como controlo foi utilizada a linha parental, não sujeita a *cell sorting*.

2.2.10.2. Fármacos Inibidores de Tirosina Cinase

Foram também testadas várias concentrações de dois fármacos nestas duas populações, o erlotinib e o vandetanib, sendo que a escolha destas concentrações teve por base o estudo de citotoxicidade efetuado na linha parental HI 975. No caso do erlotinib foram testadas as seguintes concentrações: 30 μM ; 15 μM ; 7,5 μM ; 3,75 μM ; 1,88 μM e 0,9 μM , durante um período de 72 horas de incubação. O vandetanib também foi testado durante 72 horas de incubação e foram estudadas as seguintes concentrações: 10 μM ; 5 μM ; 2,5 μM ; 1,25 μM ; 0,625 μM e 0,3 μM . Foi ainda avaliada a posterior adição dos lipossomas vetorizados com o ligado específico F3 a cada fármaco, nas duas populações (CD44⁺/ALDH⁺ e CD44⁻/ALDH⁻). Neste estudo, após 72 h de incubação com cada um dos fármacos nas células, o meio foi aspirado e substituído pelos lipossomas, durante 4 h, à concentração correspondente ao valor do IC₉₀ desta nanopartícula na linha parental e respetivo a este período de incubação, ou seja 0,5 μM . Mais uma vez, como controlo foi utilizada a linha parental.

2.2.11. Análise Estatística

Quando apropriado à experiência, os dados foram analisados segundo o cálculo da média \pm erro padrão da média (SEM). A análise estatística das diferenças entre os grupos experimentais e controlos foram avaliadas por análise de variância, através de *one-way* ou *two-*

way ANOVA. Apenas foram consideradas diferenças estatisticamente significativas quando apresentavam um valor de $p < 0,05$. Os níveis de significância constam dos respectivos resultados ((* $p < 0,05$; (** $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$).

CAPÍTULO III

Resultados

3. Resultados

3.1. Caracterização dos Lipossomas

3.1.1. Análise das Propriedades Físico-Químicas

Com o intuito de melhorar a eficácia terapêutica dos lipossomas, as propriedades destas nanopartículas e a sua influência na eficácia terapêutica têm sido alvo de forte investigação, sendo uma das propriedades mais importantes dos lipossomas o seu tamanho (Sun et al., 2005).

Verifica-se, na figura 3.1. A e B, que os lipossomas marcados com rodamina (A), assim como os lipossomas encapsulando doxorubicina (B), possuem um tamanho médio que varia entre 70 e 90 nm. As ligeiras diferenças de tamanho encontradas entre as formulações, não se verificaram estatisticamente significativas.

Relativamente ao índice de polidispersão (Figura 3.1. C e D), este é um parâmetro que se traduz na heterogeneidade das amostras quanto ao tamanho dos lipossomas (Gaumet et al., 2008), não se verificaram diferenças significativas entre as 3 formulações lipossomais.

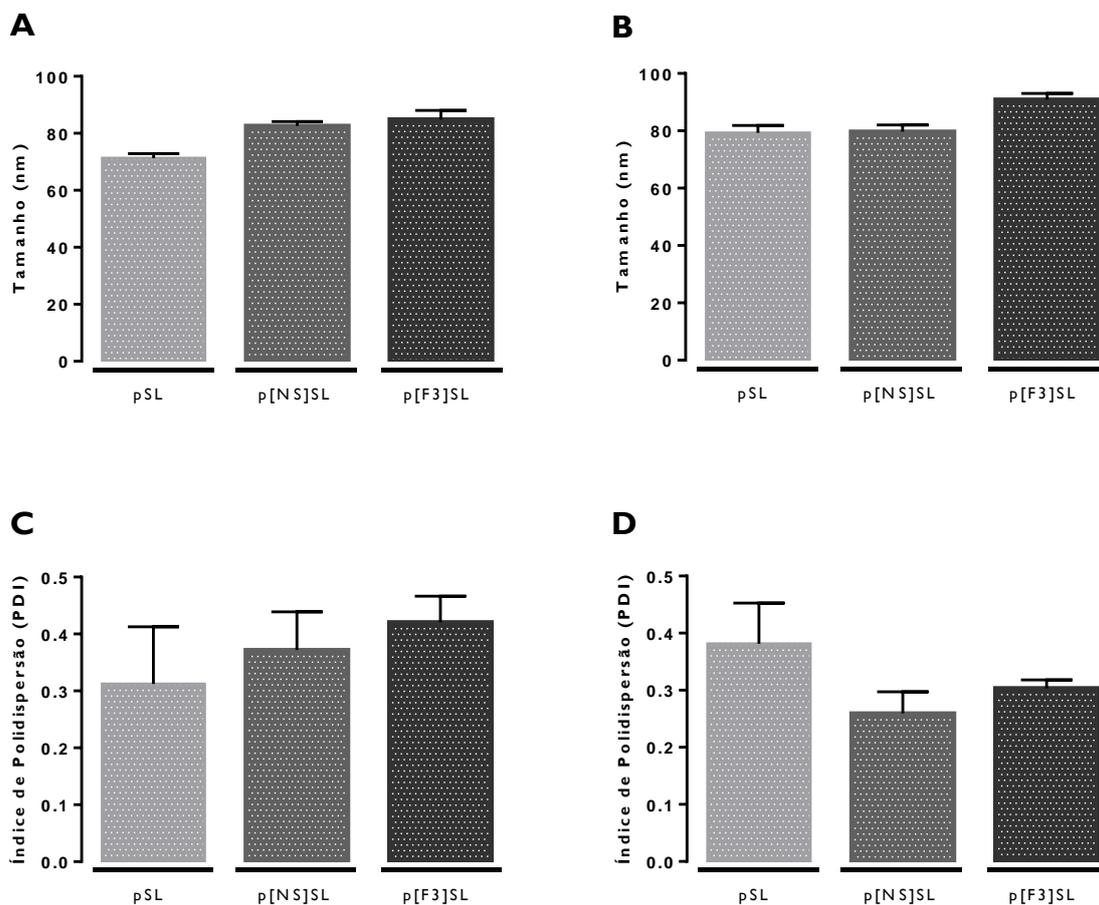


Figura 3.1. Caracterização físico-química dos lipossomas não vetorizados (pSL), vetorizados com um peptídeo não específico (p[NS]SL) ou com o peptídeo F3 (p[F3]SL). Representação do tamanho médio (nm) de lipossomas marcados com rodamina (A) e de lipossomas encapsulando doxorrubicina (B). Índice de polidispersão (PDI) de lipossomas marcados com rodamina (C) e encapsulando doxorrubicina (D). Os dados estatísticos são referentes à média \pm SEM de 3 experiências independentes. *One-way ANOVA* foi o teste estatístico utilizado, assumindo um nível de significância de $p > 0,05$.

3.2. Estudo de Associação celular

3.2.1. Por Citometria de Fluxo

No sentido de analisar a especificidade da entrega intracelular das nanopartículas vetorizadas com o peptídeo F3, foram efetuados estudos de associação celular por citometria de fluxo. Este ensaio permite não só avaliar a ligação dos lipossomas à superfície da membrana celular, mas também a sua internalização, através da fluorescência associada à rodamina-PE (RhoD-PE), que foi inserida na bicamada lipídica das formulações em estudo e respetivas formulações controlo.

Foram efetuadas experiências de 1 hora, a 4° C e 37° C e de 4 horas, a 37° C. No estudo a 37° C, de 1 e 4 horas (Figura 3.2), verificou-se um sinal de fluorescência de RhoD-PE muito superior com a incubação das células com a formulação direcionada de forma específica (p[F3]SL) relativamente à direcionada de forma inespecífica (p[NS]SL) e à não direcionada (pSL). Verificou-se ainda um aumento não significativo do sinal no estudo a 4 horas relativamente ao estudo a 1 hora. Quanto ao estudo a 4° C, temperatura à qual a endocitose é inibida, durante 1 hora, verificou-se uma diminuição acentuada da associação celular em todas as formulações, indicando que os lipossomas são internalizados através de um mecanismo dependente de energia.

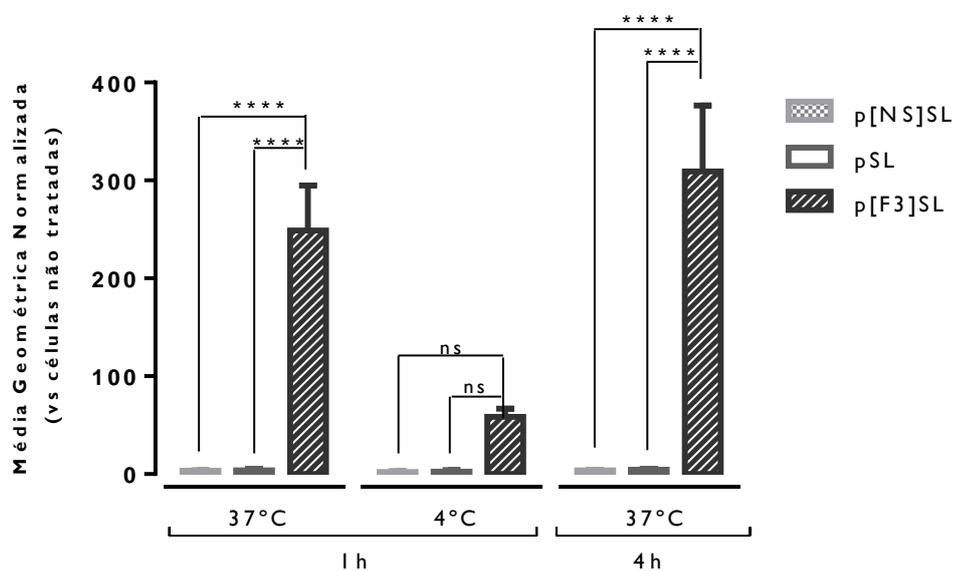


Figura 3.2. Estudo de associação celular com a linha celular de cancro do pulmão de não pequenas células, HI975. Duzentas mil células HI975 foram incubadas com lipossomas marcados com rodamina-PE a uma concentração de 0,4 mM. Foram testados lipossomas não vetorizados (pSL), vetorizados com um peptídeo não específico (p[NS]SL) ou com o peptídeo F3 (p[F3]SL), durante 1 hora, a 37° C e 4° C e durante 4 horas, a 37° C. O gráfico representa a média geométrica da fluorescência de rodamina-PE. Como controlo, foram usadas células não incubadas com lipossomas. Os dados são referentes à média \pm SEM de 3 experiências independentes em que (****) $p < 0,0001$ e (ns) $p > 0,05$ representam o nível de significância estatística, obtida a partir do teste estatístico *Two-way ANOVA*.

3.2.2. Por Microscopia de Fluorescência

No sentido de complementar os resultados acima obtidos, avaliou-se a associação celular por microscopia de fluorescência, através da incubação das células com lipossomas marcados com RhoD-PE, tal como anteriormente descrito para citometria de fluxo.

Efetuaram-se experiências a 37° C e a 4° C, durante um período de 1 hora, com as três formulações de lipossomas: pSL, p[NS]SL e p[F3]SL, numa concentração de 0,4 mM. Observou-se que as células incubadas tanto com a formulação não direcionada, como com a formulação direcionada de forma inespecífica, não apresentavam sinal de fluorescência em qualquer uma das condições (Figura 3.3). Por outro lado, verificou-se que as células incubadas com a formulação direcionada de forma específica com o peptídeo F3, p[F3]SL, apresentavam um sinal de fluorescência bastante acentuado para a condição de 1 hora de incubação, a 37 °C.

No estudo a 4° C, observou-se uma diminuição do sinal de fluorescência das células incubadas com a formulação p[F3]SL, sendo de notar que, para estas condições, a fluorescência detetada se encontra maioritariamente na membrana celular (Figura 3.3).

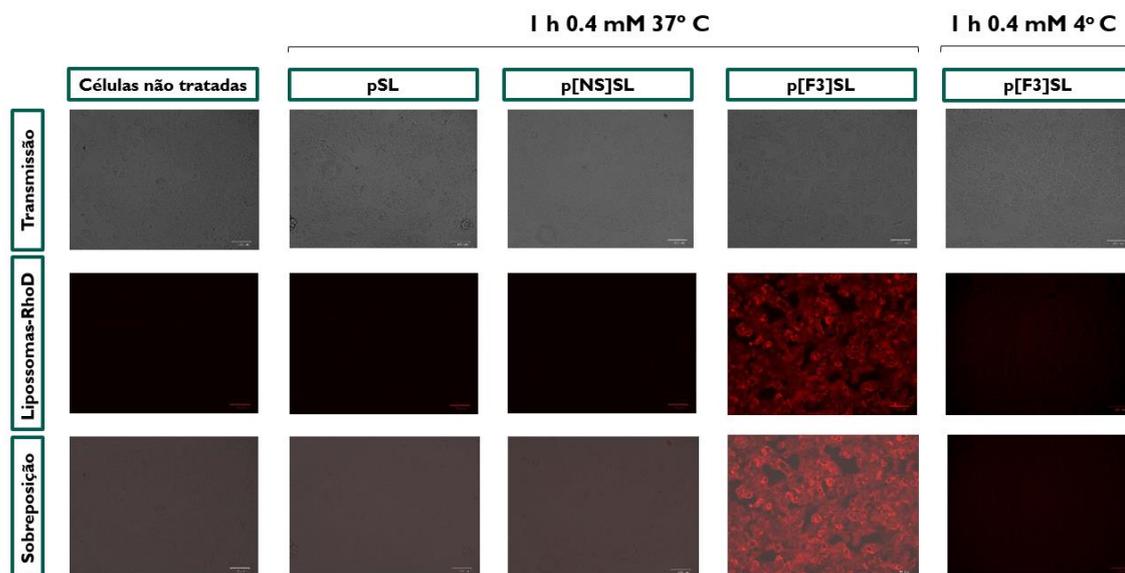


Figura 3.3. Imagens representativas da fluorescência resultante da associação celular de lipossomas funcionalizados e não funcionalizados, marcados com RhoD-PE, na linha celular HI975.

Duzentas mil células HI975 foram incubadas com lipossomas, marcados com rodamina-PE, a uma concentração de 0,4 mM. Foram testados lipossomas não direcionados (pSL), direcionados com um peptídeo não específico (p[NS]SL), assim como lipossomas direcionados com o peptídeo F3 (p[F3]SL),

durante 1 h, a 37 e 4° C. Como controlo, foram usadas células não incubadas com lipossomas (não tratadas).

3.3. Estudo de Citotoxicidade Celular na População Parental

3.3.1. Formulações lipossomais

Para que o potencial das nanopartículas encapsulando doxorrubicina pudesse ser avaliado em termos de impacto na viabilidade celular da linha de cancro do pulmão H1975, foram efetuados ensaios de citotoxicidade celular. As células foram incubadas com várias concentrações de doxorrubicina (diluídas em série) livre (Figura 3.4. D, E e F) ou encapsulada em lipossomas pSL, p[NS]SL ou p[F3]SL a 37° C, durante 1, 4 e 8 horas (Figura 3.4. A,B e C).

Desta forma, com 1 hora de incubação com as nanopartículas, observa-se desde logo uma acentuada diferença entre a taxa de morte celular provocada pelos lipossomas direcionados de forma específica, p[F3]SL, e a taxa de morte celular provocada pelos lipossomas não direcionados, pSL, e direcionados de forma inespecífica, p[NS]SL (Figura 3.4.A). Mesmo a baixas concentrações de doxorrubicina (0,39 μM ; 0,78 μM ; 1,59 μM) é possível observar uma diferença significativa na taxa de morte induzida pelas diferentes formulações de lipossomas. Constata-se, por isso, uma distinção evidente entre os valores de IC_{90} das formulações, sendo este valor quatro vezes inferior no caso dos lipossomas p[F3]SL, relativamente às outras duas formulações (Tabela 3).

Depois de 4 h de incubação com os diferentes lipossomas, o perfil mantém-se, observando-se uma diferença máxima de seis vezes superior na citotoxicidade entre os lipossomas p[F3]SL e as formulações controlo. Adicionalmente, verifica-se um aumento da morte celular aquando da utilização de concentrações mais baixas de fármaco, sendo que para a concentração mais baixa (0,39 μM) a morte induzida é superior a 80 % (Figura 3.4 B).

As incubações com os diferentes lipossomas foram estendidas até às 8 horas e, após este período, verificou-se uma diminuição ainda superior no valor de IC_{90} da formulação direcionada com o peptídeo F3, constatando-se uma diminuição deste valor em praticamente quatro vezes (Tabela 3) relativamente ao valor de IC_{90} obtido, para esta formulação, após quatro horas de incubação. Atingiu-se, assim, o limiar dos 100 % de morte, ainda que com concentrações bastante baixas (3,13 μM). Assim, verificou-se, mais uma vez, diferenças significativas entre as formulações, com um aumento de eficácia por parte da formulação p[F3]SL, relativamente às outras duas formulações (Figura 3.4 C).

Relativamente aos resultados obtidos com a doxorrubicina livre (Figura 3.4 D,E e F), observou-se uma diminuição do valor de IC_{50} e IC_{90} com o aumento do tempo de incubação.

No entanto, estes valores nunca se revelaram inferiores aos valores de IC_{50} e IC_{90} da formulação vetorizada com o peptídeo F3 (Tabela 3). Observou-se ainda que nem com a concentração máxima testada ($8 \mu\text{M}$) foi possível atingir uma taxa de 100 % de morte celular em qualquer um dos tempos de incubação, sendo que a concentrações relativamente baixas ($0,03 \mu\text{M}$; $0,06 \mu\text{M}$; $0,125 \mu\text{M}$; $0,25 \mu\text{M}$) a taxa de morte celular não foi significativa (Figura 3.4 D,E e F).

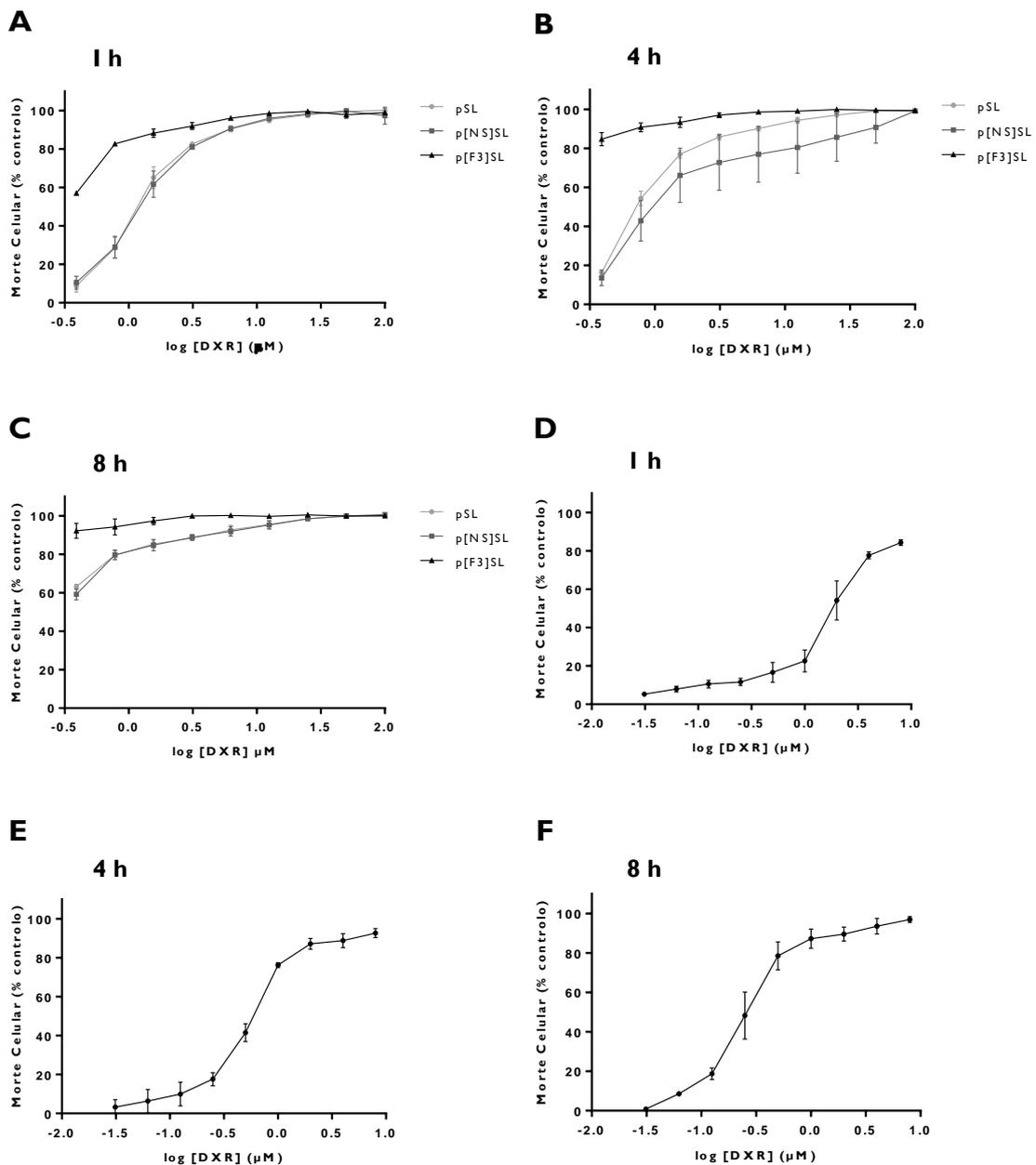


Figura 3.4. Estudo de citotoxicidade celular com as diferentes formulações lipossomais na linha celular HI975.

Foram plaqueadas sete mil células e, posteriormente, incubadas com cada uma das diferentes formulações de lipossomas com a doxorubicina encapsulada. Foram testados lipossomas vetorizados

de forma específica (p[F3]SL), vetorizados de forma inespecífica (p[NS]SL), e não vetorizados (pSL), tendo sido avaliadas várias concentrações de fármaco através de diluições em série realizadas a partir da concentração máxima de 100 μM , durante 1, 4 e 8 horas, a 37° C (A, B e C, respetivamente). Foi também testada a doxorubicina (DXR) livre a partir de uma concentração máxima de 8 μM , durante 1, 4 e 8 horas, a 37° C (D, E e F, respetivamente). Após os tempos de incubação, o meio foi substituído e a experiência prolongada por um período de 96 h. A morte celular verificada teve como controlo células não sujeitas à incubação com os lipossomas (% do controlo). Os dados representam a média \pm SEM dos triplicados, de 3 experiências independentes.

Tabela III. Valores de IC_{50} e IC_{90} da doxorubicina encapsulada nos lipossomas ou na forma livre, na linha celular HI975.

Tempo de incubação (h)	Células	IC_{50} (μM) Média \pm SEM			
	HI975	DXR livre	pSL	p[NS]SL	p[F3]SL
1		0,57 \pm 0,08	1,36 \pm 0,16	1,08 \pm 0,24	0,14 \pm 0,01
	4	0,18 \pm 0,03	0,88 \pm 0,12	0,93 \pm 0,2	0,03 \pm 0,01
	8	0,11 \pm 0,03	0,29 \pm 0,01	0,36 \pm 0,02	0,008 \pm 0,008
	IC_{90} (μM) Média \pm SEM				
	1	8,58 \pm 2,87	7,49 \pm 0,85	8,43 \pm 2,41	2,03 \pm 0,28
	4	1,39 \pm 0,34	6,19 \pm 1,11	6,07 \pm 0,31	0,55 \pm 0,14
8		0,63 \pm 0,27	2,75 \pm 0,6	1,48 \pm 1,07	0,13 \pm 0,12

3.3.2. Inibidores Tirosina Cinase

Com o objetivo de avaliar o impacto de fármacos antiangiogénicos e inibidores de tirosina cinase na proliferação da linha celular H1975, efetuaram-se estudos de citotoxicidade com quatro fármacos diferentes: erlotinib, gefitinib, sunitinib e vandetanib. Desta forma, sete mil células na fase de crescimento exponencial foram incubadas com diferentes concentrações dos fármacos e diferentes tempos de incubação.

Verificou-se, no caso do erlotinib, que este fármaco apenas possui efeito potencialmente citotóxico para um período de incubação de 72 horas e a concentrações elevadas (25 μM e 50 μM) sendo o IC_{50} às 72 horas de $15,87 \pm 6,26 \mu\text{M}$ (Tabela 4). Devido ao baixo impacto na viabilidade celular provocados, não foi possível encontrar o valor de IC_{90} em qualquer um dos tempos testados, uma vez que a taxa de morte celular máxima foi de 86 %, após 72 horas à concentração de fármaco máxima testada, 50 μM (Figura 3.5 A). Para os tempos de incubação de 1, 4 e 8 horas, não se observaram diferenças significativas, sendo que até à concentração de 25 μM , apenas 20 % da população se encontrava inviável (Figura 3.5. A).

A adição da formulação lipossomal direcionada de forma específica, p[F3]SL, durante 1 hora, após 72 horas de incubação com o erlotinib (Figura 3.5 B), provocou um aumento máximo em 4,2 vezes da taxa de morte celular, sendo o valor de IC_{50} da combinação de $1,71 \pm 0,58 \mu\text{M}$ e o IC_{90} de $14,22 \pm 6,56 \mu\text{M}$ (Tabela 4). Verificou-se, assim, que a taxa de morte celular com a combinação de ambas as estratégias terapêuticas foi muito superior, observando-se uma diminuição do valor de IC_{50} em nove vezes relativamente à utilização do erlotinib de forma isolada (Tabela 4).

Quanto à combinação de 72 horas de incubação com o erlotinib, mais 4 horas de incubação com os lipossomas p[F3]SL (Figura 3.5. C), foi possível atingir 50 % de morte celular com uma concentração ainda mais baixa, verificando-se uma diminuição do valor de IC_{50} para o valor de $0,99 \pm 0,17 \mu\text{M}$, como seria expectável (Tabela 4).

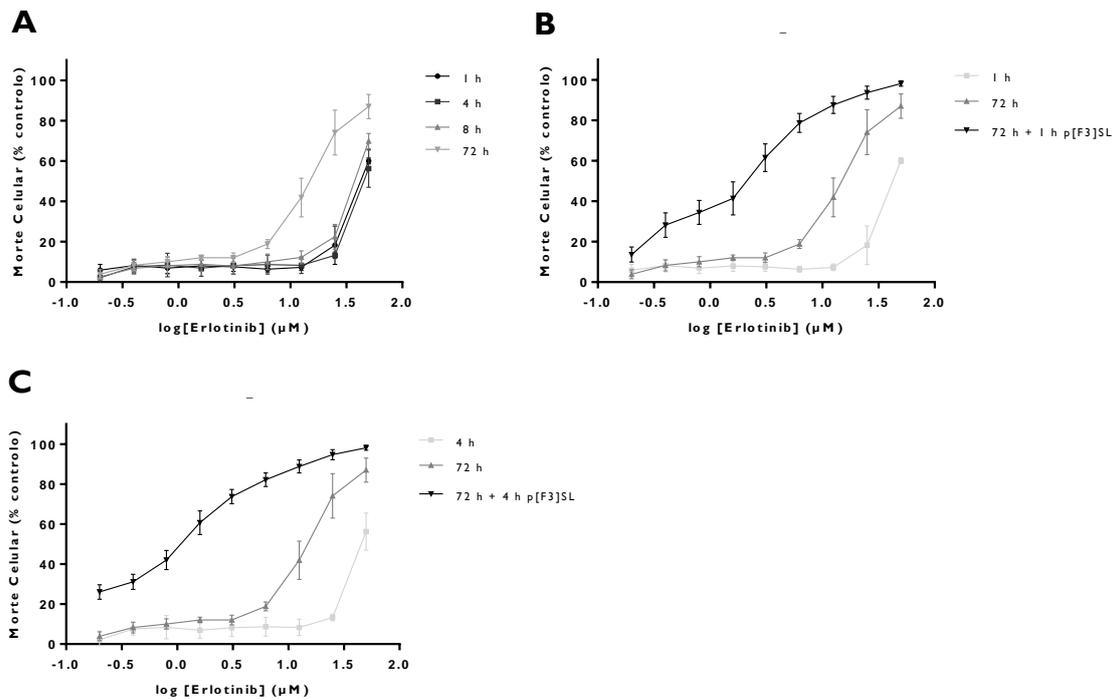


Figura 3.5. Estudo de citotoxicidade celular utilizando um fármaco inibidor do EGFR, o erlotinib, na linha celular HI975.

Foram plaqueadas sete mil células e, posteriormente, incubadas com o fármaco. Foram testadas várias concentrações de fármaco através de diluições em série realizadas a partir da concentração máxima de 50 μM . (A) Representa a morte celular (%) com 1, 4, 8 e 72 horas de incubação. (B) e (C) Representam a morte celular (%) após 1 e 72 horas, assim como a morte registada após 72 horas de incubação com o fármaco erlotinib seguidas de 1 e 4 horas, respetivamente, de incubação com a formulação lipossomal vetorizada com o ligando específico (p[F3]SL). Concluídos estes períodos, o meio foi substituído e a experiência prolongada até 120 horas. Para avaliar a viabilidade celular, foi utilizado o método da resazurina (*Alamarblue*®). A citotoxicidade verificada teve como controlo células não sujeitas à incubação com o fármaco (% do controlo). Os dados representam a média \pm SEM dos triplicados de 3 experiências independentes.

Fomos também avaliar o impacto de um outro inibidor de tirosina cinase, desta vez o vandetanib. Observou-se que os tempos de incubação de 1, 4 e 8 horas, não foram suficientes para afetar as células, de forma significativa, uma vez que a morte celular, para estes períodos de incubação, foi sempre inferior a 20% (Figura 3.6. A). Desta forma, não foi possível encontrar o valor de IC_{50} para estes tempos. Por contraste, depois de 72 horas de incubação com o fármaco vandetanib foi possível encontrar o valor de IC_{50} e de IC_{90} correspondentes aos valores $2,85 \pm 0,48 \mu\text{M}$ e $10,03 \pm 2,87 \mu\text{M}$, respetivamente (Tabela 4). Apesar disso, apenas a partir de valores de concentração de fármaco elevados é que foi possível induzir valores de

morte celular significativos, uma vez que, a concentrações mais baixas (entre 0,2 e 6,25 μM) a taxa de citotoxicidade é praticamente nula. (Figura 3.6 A)

Para a análise do impacto de 72 horas de incubação com o vandetanib, seguidas de 1 hora de incubação com os lipossomas vetorizados de forma específica (p[F3]SL, observou-se um aumento significativo dos valores de morte celular para concentrações mais baixas (entre 0,8 e 6,25 μM)(Figura 3.6 B), obtendo-se valores de IC_{50} e IC_{90} que são, aproximadamente, metade ($1,37 \pm 0,39 \mu\text{M}$ e $6,63 \pm 1,97 \mu\text{M}$, respetivamente) dos valores obtidos no caso do uso do fármaco isolado ($2,85 \pm 0,48 \mu\text{M}$ e $10,03 \pm 2,87 \mu\text{M}$). Observou-se ainda, uma diminuição dos valores de IC_{50} e IC_{90} em cerca de duas vezes depois da combinação de 72 horas de fármaco seguidos de 4 horas de lipossomas p[F3]SL (Figura 3.6. C) (Tabela 4).

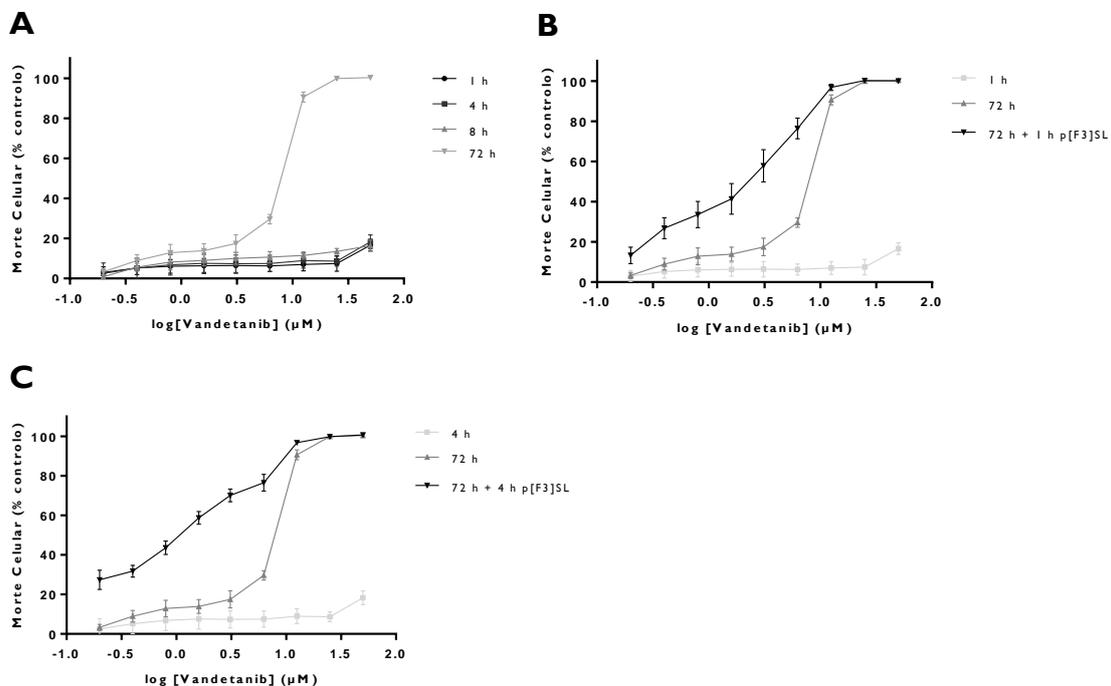


Figura 3.6. Estudo de citotoxicidade celular utilizando o fármaco vandetanib, na linha celular HI975.

(A) Representa a morte celular (%) com 1, 4, 8 e 72 horas de incubação. (B) e (C) Representam a morte celular após 1 e 72 horas, assim como a morte registada após 72 horas de incubação com o fármaco vandetanib, seguidas de 1 e 4 horas, respetivamente, de incubação com a formulação lipossomal vetorizada com o ligando específico (p[F3]SL). Os dados representam a média \pm SEM dos triplicados de 3 experiências independentes.

Outro fármaco estudado foi o gefitinib (Figura 3.7). Constatou-se que, também neste caso, os períodos de incubação de 1 e 4 horas não foram suficientes, sendo a taxa de morte

sempre inferior a 13% (Figura 3.7). No entanto, foi o único fármaco com efeito citotóxico significativo com 8 horas de incubação, apesar de este efeito apenas ser evidente com a concentração máxima testada (50 μM) (Figura 3.7. A). Os resultados para 72 horas de incubação com o gefitinib também revelaram que apenas com concentrações mais elevadas (25 e 50 μM) se verifica uma taxa de morte celular relevante (entre 80 e 99%), possuindo um valor de IC_{90} de $45,36 \pm 24,20 \mu\text{M}$ (Figura 3.7 A).

Relativamente aos resultados da combinação do gefitinib com a nanopartícula p[F3]SL, durante o período de incubação de 1 hora, observou-se um aumento significativo relativamente aos resultados obtidos com a utilização do fármaco isolado (Figura 3.7 B), sendo que o valor de IC_{50} diminui cinco vezes e o IC_{90} diminui de forma bastante considerável, passando de $45,36 \pm 24,20 \mu\text{M}$ a $7,95 \pm 0,86 \mu\text{M}$ (Tabela 4). De igual forma, verificou-se um aumento ainda mais acentuado da taxa de morte celular IC_{90} aquando do aumento do período de incubação com a nanopartícula de 1 para 4 horas e, conseqüentemente, observou-se uma diminuição dos valores de IC_{50} e IC_{90} (Figura 3.7 C).

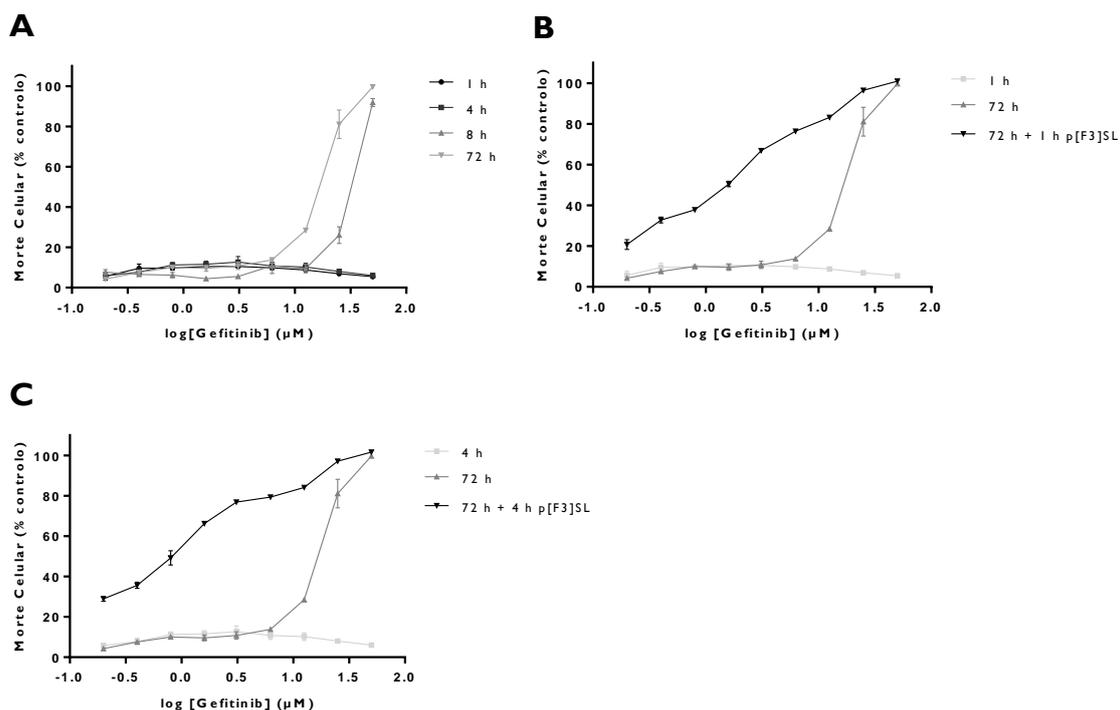


Figura 3.7. Estudo de citotoxicidade celular utilizando um fármaco inibidor do EGFR, o gefitinib, na linha celular HI975.

(A) Representa a morte celular (%) para 1, 4, 8 e 72 horas de incubação com o gefitinib. (B) e (C) Representam a morte celular após 1 e 72 horas, assim como a morte registada após 72 h de incubação com o gefitinib, seguidas de 1 e 4 horas, respetivamente, de incubação com a formulação lipossomal

vetorizada com o ligando específico (p[F3]SL). Os dados representam a média \pm SEM dos triplicados de 3 experiências independentes.

Por último, determinou-se a taxa de mortalidade provocada pelo fármaco sunitinib nas células HI975 (Figura 3.8). Este fármaco demonstrou que apenas possui eficácia em concentrações mais altas (entre 12,5 e 50 μ M) e apenas nos períodos de incubação de 24 e de 48 horas. No entanto, para as concentrações mais altas, 25 e 50 μ M, a morte celular atinge os 100 % para 48 horas de incubação (Figura 3.8. A). Desta forma, foi possível encontrar um valor de IC_{90} de $14,04 \pm 8,59 \mu$ M. No entanto, este valor é reduzido em 5,7 vezes com a adição dos lipossomas p[F3]SL durante apenas 1 hora (Figura 3.8. B) e em 14,2 vezes quando se estende este período por 4 horas (Figura 3.8. C) (Tabela 4).

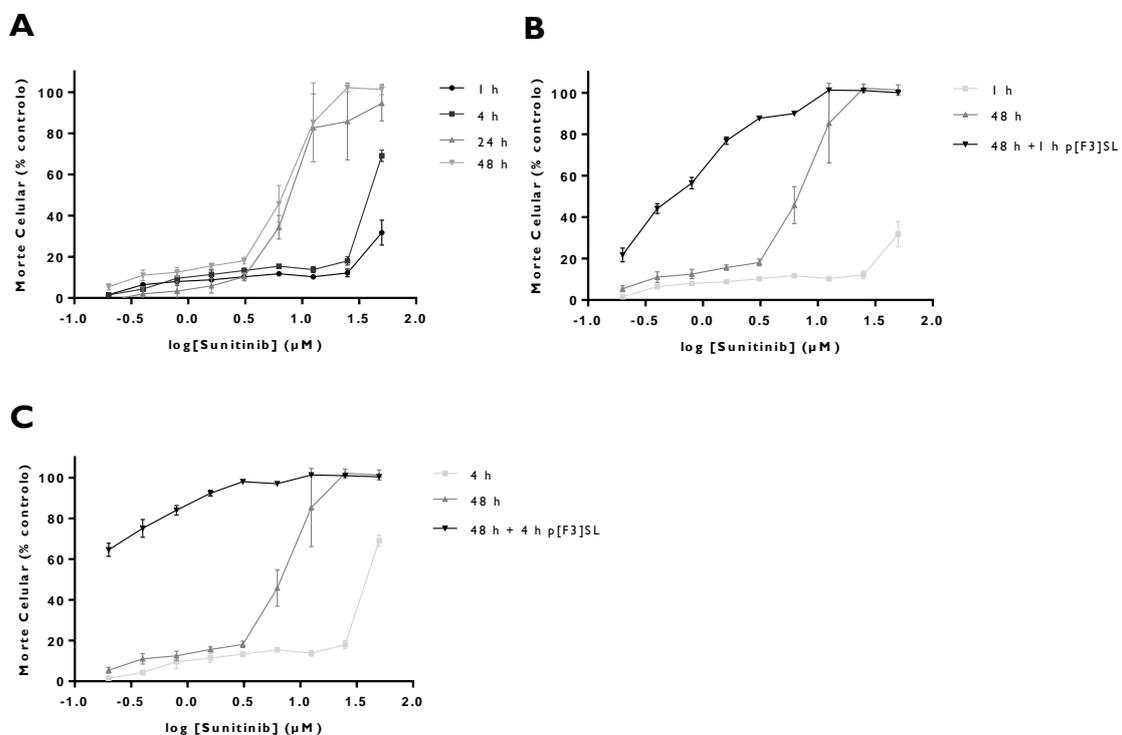


Figura 3.8. Estudo de citotoxicidade celular utilizando um fármaco inibidor de múltiplas vias, o sunitinib, na linha celular HI975.

(A) Representa a taxa de morte celular (%) para 1, 4, 24 e 48 horas de incubação com o sunitinib. (B) e (C) Representam a morte celular após 1 e 48 horas, assim como a morte registada após 48 h de incubação com o sunitinib, seguidas de 1 e 4 h, respetivamente, de incubação com a formulação lipossomal vetorizada com o ligando específico (p[F3]SL). Os dados representam a média \pm SEM dos triplicados de 3 experiências independentes.

Tabela IV. Valores de IC₅₀ e IC₉₀ gerados pelos fármacos erlotinib, vandetanib, gefitinib e sunitinib, na linha celular HI975.

	Células		IC ₅₀ (μM) Média ± SEM					
	HI 975		Erlotinib	Vandetanib	Gefitinib	Sunitinib		
Tempo de incubação (h)	1		>50	>50	>50	1	>50	
	4		>50	>50	>50	4	>50	
	8		>50	>50	>50	24	8,82±4,68	
	72		15,87±6,26	2,85±0,48	6,36±1,60	48	2,79±0,91	
	72 + 1 p[F3]S L		1,71±0,58	1,37±0,39	1,16±0,07	48 + 1 p[F3]S L	0,63±0,044	
	72 + 4 p[F3]S L		1,01±0,22	0,99±0,17	0,83±0,03	48 + 4 p[F3]S L	0,18±0,049	
			IC ₉₀ (μM) Média ± SEM					
	1		>50	>50	>50	1	>50	
	4		>50	>50	>50	4	>50	
	8		>50	>50	>50	24	>50	
72		>50	10,03±2,87	45,36±24,20	48	14,04±8,59		
72 + 1 p[F3]S L		14,22±6,56	6,63±1,97	7,95±0,86	48 + 1 p[F3]S L	2,43±0,13		
72 + 4 p[F3]S L		15,43±4,42	3,83±0,47	6,23±0,51	48 + 4 p[F3]S L	0,99±0,13		

3.4. Ensaio de Formação de Esferas

Com foco no principal objetivo deste trabalho, tornou-se necessário verificar se a linha celular HI975 possuía capacidade estaminal, no sentido de validar os resultados que se seguem. Assim, é essencial à caracterização das células estaminais tumorais, a formação de esferas *in vitro* (Eramo et al., 2008; Singh et al., 2012). As células foram plaqueadas em placas de baixa aderência em meio *Mammocult*® e passado 6-10 dias foi possível observar esferas obtidas a partir de qualquer uma das densidades iniciais (Figura 3.9. A e B). Demonstrou-se desta forma, que esta linha celular possui capacidade de formação de esferas.

Adicionalmente, observou-se que as células derivadas das esferas de 1ª geração possuíam capacidade de formação de uma 2ª geração de esferas (Figura 3.9. C e D). No entanto, verificou-se uma diminuição desta capacidade na passagem de uma geração para a outra, com uma diminuição da eficiência de formação de esferas que se torna mais visível nos poços onde foi plaqueada uma densidade inicial de 10000 células (Tabela 5).

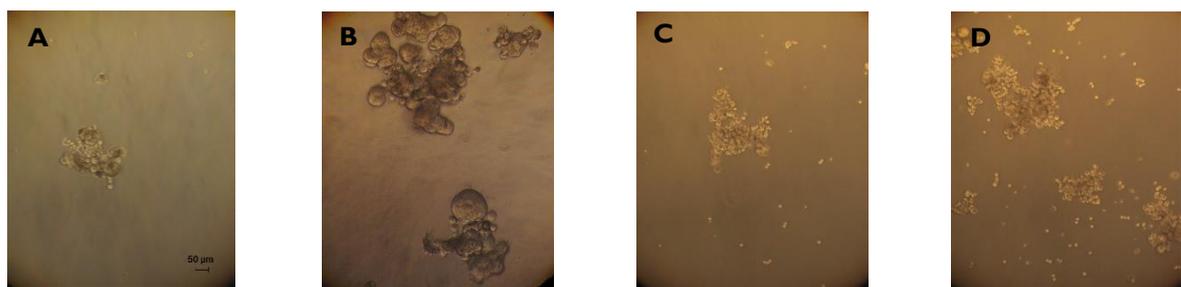


Figura 3.9. Imagens representativas do ensaio de formação de esferas de 1ª e 2ª geração com a linha celular HI975.

No sentido de avaliar a capacidade estaminal da linha HI975, cinco mil células (A) e 10000 células (B), foram plaqueadas e cultivadas em meio suplementado *Mammocult*®, dando origem a esferas de 1ª geração. Para a formação da 2ª geração de esferas a partir da dissociação das esferas de 1ª geração, foram plaqueadas, mais uma vez, 5000 (C) e 10000 (D) células por poço, usando as mesmas condições descritas para a 1ª geração. Neste ensaio, as células foram mantidas em cultura durante 6 a 10 dias.

Tabela V. Tabela representativa da eficiência de formação de esferas de 1ª e 2ª geração a partir da linha celular HI975.

Linha Parental		Eficiência de formação de esferas (%)	
		1ª Geração	2ª Geração
HI975	5x10 ³ cells/2 ml	24,1	21,6
	10x10 ³ cells/2 ml	41,8	26,8

3.5. Caracterização da População Enriquecida em CSC

3.5.1. Marcadores CD44 e CD133

A identificação da população enriquecida em células estaminais tumorais foi efetuada com base em dois marcadores destas células em cancro do pulmão de não pequenas células já descritos na literatura, o CD133 e o CD44 (Leung et al., 2010; Singh et al., 2012; Wang et al., 2013)

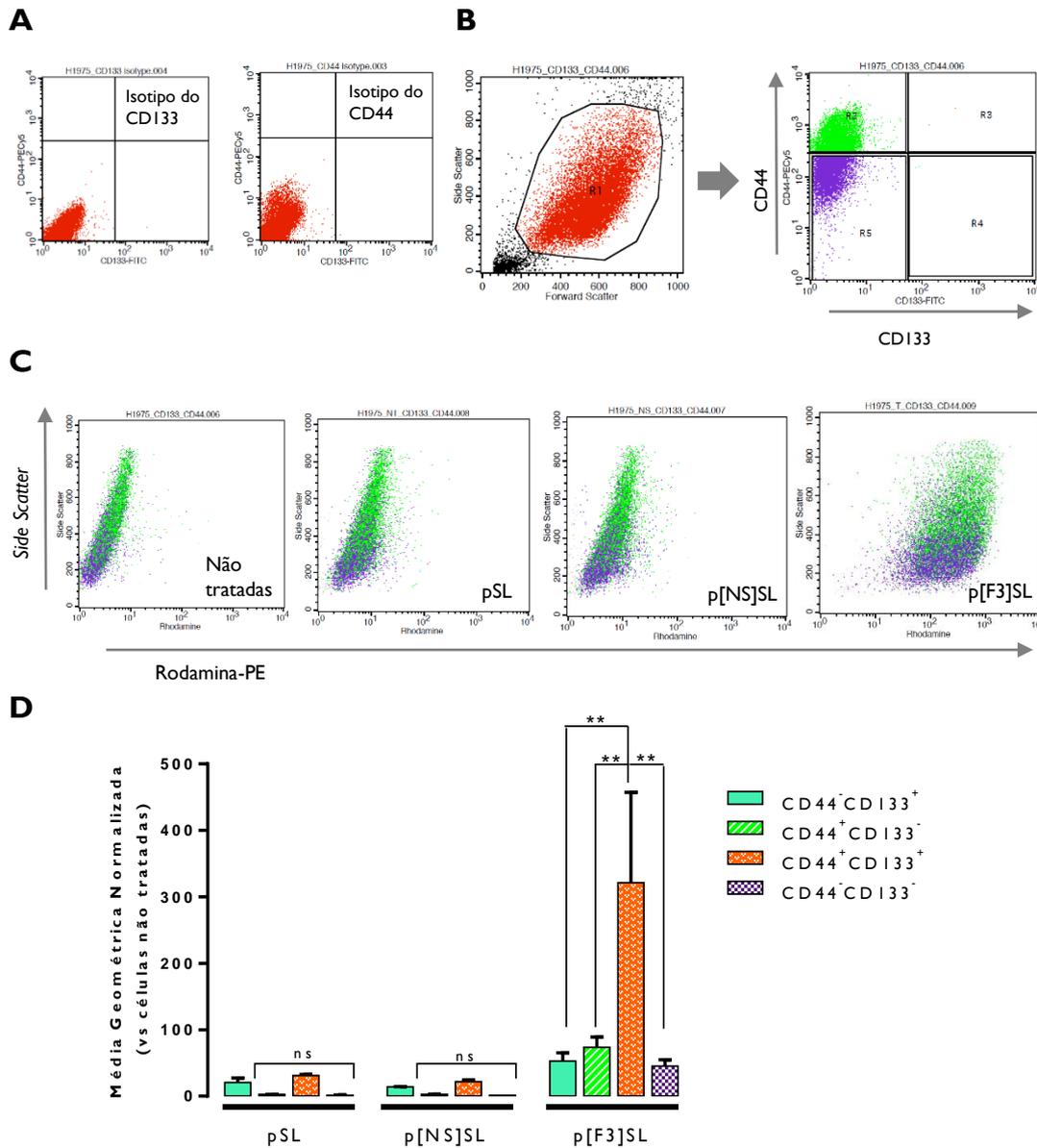


Figura 3.10. Associação celular de lipossomas vetorizados com o peptídeo F3 na população enriquecida em células estaminais tumorais, marcada com CD133 e CD44.

Meio milhão de células H1975 foram incubadas com lipossomas marcados com rodamina-PE, à concentração de 0,6 mM. Foram testados lipossomas não vetorizados (pSL), vetorizados com um

peptídeo não específico (p[NS]SL) ou com o peptídeo F3 (p[F3]SL), durante 1 hora, a 37 °C. De seguida, foram marcadas com os anticorpos anti-CD44-PECy5 e anti-CD133-FITC e posterior análise por citometria de fluxo. (A) *Dot-plots* correspondentes aos controlos: isotipo do CD133 e isotipo do CD44. (B) Regiões representativas da população enriquecida (R3) e não enriquecida (R5) em células estaminais tumorais, baseada na seleção dos marcadores de células estaminais. (C) *Dot-plots* do *side scatter* e rodamina das diferentes formulações lipossomais, representando a distribuição de cada população de células. (D) Representa a média geométrica da fluorescência de rodamina de cada subpopulação na linha celular HI975 (**cor-de-laranja**- população enriquecida em células estaminais tumorais (CSC); **roxo**- população com baixa expressão dos marcadores selecionados para células estaminais tumorais (não-CSC)). Como controlo, foram usadas células não incubadas com lipossomas. Os dados são referentes à média \pm SEM de 2 experiências independentes, em que (^{ns}) $p > 0.05$ e (***) $p < 0,01$ representam a significância estatística obtida a partir do teste *Two-way ANOVA* com o *Bonferroni's post test*.

Verificou-se a existência de uma expressão mais acentuada do marcador CD44, relativamente ao CD133, na linha celular estudada. Visualizou-se, claramente, uma população de células com elevada expressão de CD44 (cerca de 38 % da população total) e uma população células com baixa expressão (Figura 3.10. B). Contrariamente, observou-se uma pequena população de células que expressem CD133, representando cerca de 0,07 % da população total, sendo que 0,03 % da população de células possui elevada expressão para os dois marcadores em simultâneo (Figura 3.10. B). Estes resultados foram obtidos com base na inexistência de marcação por parte dos isotipos dos anticorpos utilizados (Figura 3.10. A)

No sentido de estudar a especificidade da associação celular com os lipossomas vetorizados com o peptídeo F3, foram definidas quatro regiões (subpopulações) correspondentes aos vários níveis de expressão de cada marcador: CD44⁺/CD133⁻, CD44⁺/CD133⁺, CD44⁻/CD133⁺ e CD44⁻/CD133⁻, correspondendo os sinais “+” e “-” à elevada expressão do marcador e baixa/negativa expressão do marcador, respetivamente (Figura 3.10. B). Foi, desta forma, avaliada a associação celular dos lipossomas vetorizados de forma específica (p[F3]SL), vetorizados de forma inespecífica (p[NS]SL) e não vetorizados (pSL), em cada subpopulação (Figura 3.10. C e D).

Os resultados demonstraram um aumento evidente da associação celular, dos lipossomas p[F3]SL, na subpopulação CD44⁺/CD133⁺ relativamente à subpopulação CD44⁻/CD133⁻, correspondendo a um aumento relativo de sete vezes (Figura 3.10. D). O fato de a associação celular, pelos lipossomas p[NS]SL e pSL, ser bastante mais baixa quando comparada com o efeito dos lipossomas vetorizados com o peptídeo F3, indica que a associação celular

na subpopulação CD44⁺/CD133⁺ é dependente do peptídeo F3, ou seja, específica (Figura 3.10. D).

Adicionalmente, verificou-se também alguma associação dos lipossomas vetorizados com o peptídeo F3 pelas subpopulações CD44⁺/CD133⁻ e CD44⁻/CD133⁺, o que poderá representar estados intermédios na organização hierárquica da linha celular cancerígena (Figura 3.10. D).

3.5.2. Marcadores CD44 e ALDH

Na literatura, encontra-se igualmente estudada e validada a utilização do reagente ALDEFLUOR[®] enquanto marcador de CSC em CPNPC (Huang et al., 2013; Jiang et al., 2009; Liu et al., 2013). Assim, para identificação da população enriquecida em CSC, foi também utilizada a combinação da marcação do CD44 com o uso do reagente ALDEFLUOR[®] (Liu et al., 2013) (Figura 3.11. A, B e C).

Nos resultados obtidos, é possível verificar uma maior expressão de células marcadas com CD44, relativamente à população marcada com ALDH (Figura 3.11. A), registando-se uma percentagem de 35,5 % de células com elevada expressão de CD44 e 1,7 % de células com elevada expressão de ALDH. Assim, resultou uma percentagem de 1,5 % de células com elevada expressão destes dois marcadores em simultâneo.

Da mesma forma que, no caso anterior, foram definidas quatro subpopulações: CD44⁺/ALDH⁻, CD44⁺/ALDH⁺, CD44⁻/ALDH⁺ e CD44⁻/ALDH⁻, com base no nível de expressão de cada marcador (Figura 3.11. A).

Igualmente aos resultados anteriormente obtidos para a marcação de CD44 e CD133, observou-se uma associação celular superior dos lipossomas p[F3]SL pela população CD44⁺/ALDH⁺ relativamente à população CD44⁻/ALDH⁻ (Figura 3.11. B e C). Este fato demonstra, mais uma vez, que a associação celular dos lipossomas pela população de células com elevada expressão de ambos os marcadores é dependente do ligando F3. Para além disso, observa-se uma maior associação celular nas populações CD44⁺/ALDH⁻ e CD44⁻/ALDH⁺ relativamente à população CD44⁻/ALDH⁻, o que está de acordo com os resultados obtidos anteriormente (Figura 3.11. B e C).

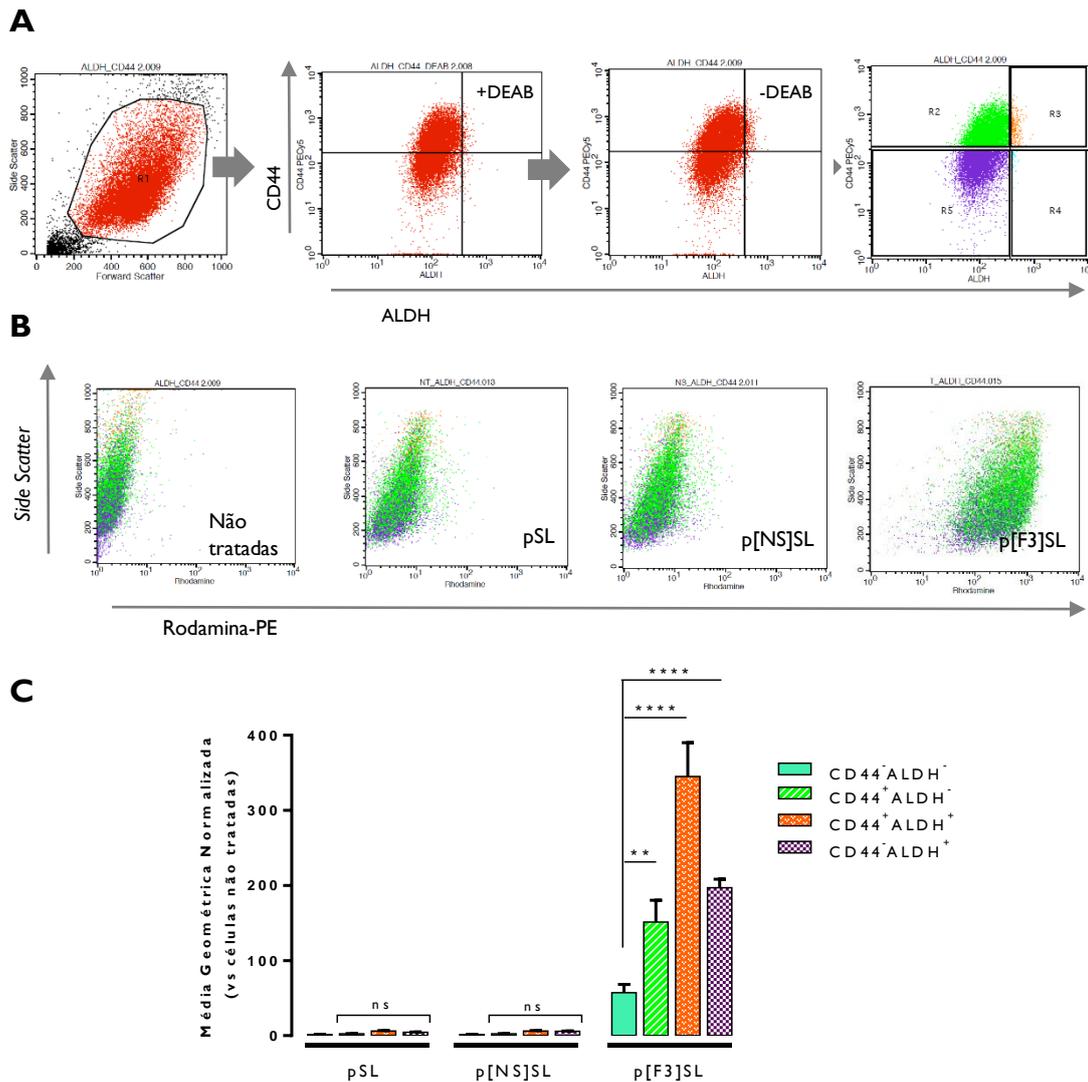


Figura 3.11. Associação celular de lipossomas vetorizados com o peptídeo F3 pela população enriquecida em células estaminais tumorais (CSC).

Meio milhão de células HI975 foram incubadas com lipossomas marcados com rodamina-PE, à concentração de 0,6 mM. Foram testados lipossomas não vetorizados (pSL), funcionalizados com um peptídeo não específico (p[NS]SL) ou com o peptídeo F3 (p[F3]SL), durante 1 hora, a 37 °C. De seguida, foram marcadas com o anticorpo anti-CD44-PECy5 e com o reagente ALDEFUOR® e procedeu-se imediatamente à análise por citometria de fluxo. (A) Regiões representativas da população enriquecida (R3) e não enriquecida (R5) em células estaminais tumorais, baseada na seleção dos marcadores. (B) *Dot-plots* do *side scatter* e rodamina das diferentes formulações lipossomais, representando a distribuição de cada população de células. (C) Representa a média geométrica da fluorescência de rodamina de cada subpopulação na linha celular HI975 (**cor-de-laranja**- população enriquecida em células estaminais tumorais (CSC); **roxo**- população com baixa expressão dos marcadores selecionados para células estaminais tumorais (não-CSC)). Como controlo, foram usadas células não incubadas com lipossomas. Os dados apresentados são referentes à média ± SEM de

3 experiências independentes, em que (^{ns}) $p > 0.05$, (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,0001$ representa a significância estatística obtida a partir do teste *Two-way ANOVA* com o *Bonferroni's post test*.

3.6. Isolamento das Populações CD44⁻/ALDH⁻ e CD44⁺/ALDH⁺

Depois de efetuada a identificação da população enriquecida em células estaminais tumorais, os marcadores CD44 e ALDH foram selecionados para se proceder ao isolamento desta população de células na linha de cancro do pulmão H1975. Assim, através da técnica de *cell sorting* foi possível isolar a subpopulação que possui uma elevada expressão (CD44⁺/ALDH⁺) e a subpopulação que possui uma baixa expressão (CD44⁻/ALDH⁻) para estes dois marcadores. Desta forma, foram recolhidas 10-15 % de cada subpopulação através da estratégia demonstrada na Figura 3.12.

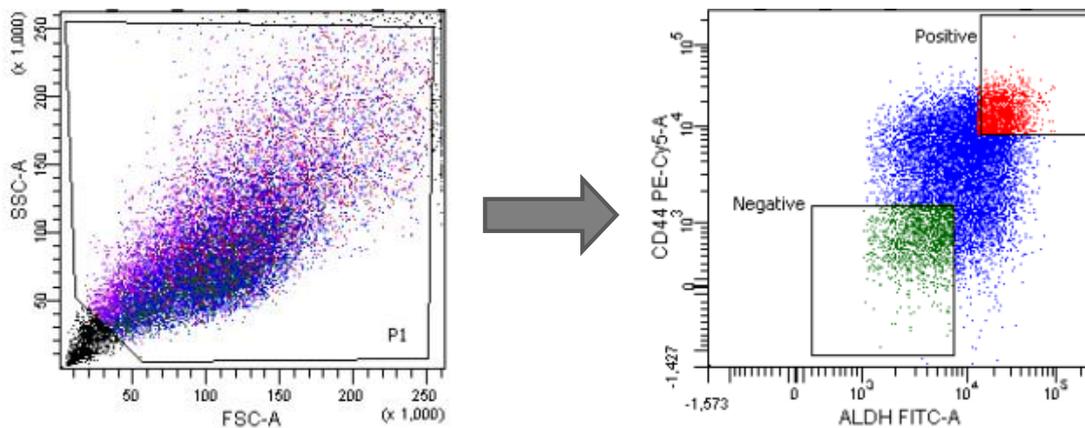


Figura 3.12. Representação do esquema de seleção das subpopulações CD44⁺/ALDH⁺ e CD44⁻/ALDH⁻, através de *cell sorting*.

3.7. Estudos de Citotoxicidade nas Populações CD44⁺/ALDH⁻ e CD44⁺/ALDH⁺

3.7.1. Erlotinib e Vandetanib

Com o objetivo de avaliar o impacto dos fármacos erlotinib e vandetanib nas subpopulações CD44⁻/ALDH⁻ e CD44⁺/ALDH⁺ foram efetuados estudos de viabilidade celular nestas populações (Figura 3.13).

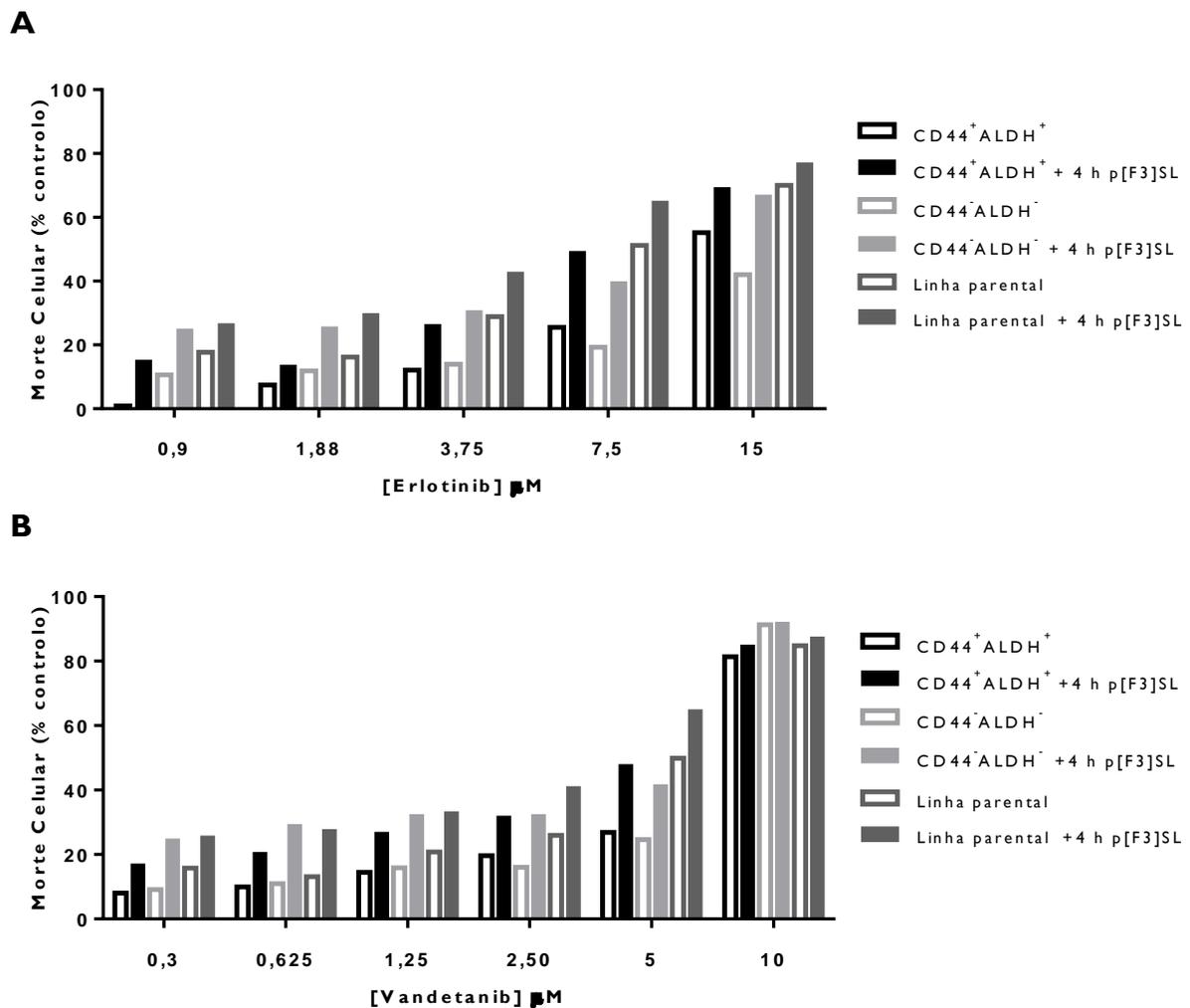


Figura 3.13. Citotoxicidade celular dos fármacos erlotinib e vandetanib nas subpopulações CD44⁺/ALDH⁺, CD44⁻/ALDH⁻ e na população parental da linha celular H1975.

As subpopulações CD44⁺/ALDH⁺ e CD44⁻/ALDH⁻ foram plaqueadas e depois incubadas com os fármacos erlotinib e vandetanib. Avaliaram-se várias concentrações dos fármacos a partir de uma []_{máx} de 15 µM, seguida de várias diluições até à []_{mín} de 0,9 µM, no caso do erlotinib (A). No caso do vandetanib foi testada uma []_{máx} de 10 µM até 0,3 µM. Para ambos os fármacos foi testado um período de 72 horas de incubação, a 37° C. Foi ainda avaliada a adição de 0,5 µM de doxorrubicina encapsulada nos lipossomas vetorizados com peptídeo F3, após 72 horas de incubação de cada um dos fármacos.

Após este período de incubação com o erlotinib ou vandetanib, o meio foi aspirado e as células incubadas com os lipossomas p[F3]SL durante mais 4 horas. Como controlo, foi testada a população parental nas mesmas condições. Os dados referem-se a uma experiência.

No caso do erlotinib, com o aumento da concentração nas células verifica-se também um conseqüente aumento da taxa de morte celular, no entanto esta taxa nunca se revelou superior a 70 % (Figura 3.13. A). Adicionalmente, verifica-se que, em concentrações mais baixas, a morte celular da população CD44⁻/ALDH⁻ é superior à morte celular da população CD44⁺/ALDH⁺ (população enriquecida em CSC), apesar de não ser uma diferença significativa. Apesar disto, a partir da concentração de 7,5 µM esta tendência deixou de se verificar (Figura 3.13).

Por outro lado, observou-se que as células que foram sujeitas à adição dos lipossomas direcionados com o peptídeo F3, depois de incubadas 72 h com o erlotinib, revelaram uma taxa de morte superior às células que foram sujeitas apenas à ação do erlotinib de forma isolada (Figura 3.13. A). Observou-se, assim, um aumento de eficácia em qualquer uma das subpopulações com a incubação posterior dos lipossomas às células pré-incubadas durante 72 horas com o erlotinib, com uma diminuição de 50 % a 70 % do valor do IC₅₀ (Tabela 5).

Tabela VI. Valores de IC₉₀ e IC₅₀ relativos à citotoxicidade induzida pelo erlotinib nas populações CD44⁺/ALDH⁺, CD44⁻/ALDH⁻ e parental, na linha celular HI975.

Células	IC ₅₀ (µM) Média		
	Linha parental	Erlotinib	
		CD44 ⁺ /ALDH ⁺	CD44 ⁻ /ALDH ⁻
HI975			
72 h	5,41	12,98	17,28
72 h + 4 h p[F3]SL	3,76	6,79	6,52
	IC ₉₀ (µM) Média		
	Linha parental	Erlotinib	
		CD44 ⁺ /ALDH ⁺	CD44 ⁻ /ALDH ⁻
72 h	>15	>15	>15
72 h + 4 h p[F3]SL	>15	>15	>15

Relativamente ao vandetanib, de uma forma geral, verificou-se igualmente um aumento da taxa da morte celular com o aumento da concentração de fármaco utilizada, em qualquer uma das populações (Figura 3.13. B). No entanto, constatou-se que o valor de IC₅₀ na população CD44⁺/ALDH⁺ é superior comparativamente a este valor tanto na população CD44⁻/ALDH⁻, como na população parental (Tabela 6).

Relativamente às células que foram sujeitas a incubação com os lipossomas vetorizados com o peptídeo F3 depois de serem incubadas com o vandetanib, verificou-se um aumento da taxa de morte celular (Figura 3.13. B). Observou-se, em qualquer uma das concentrações testadas e em qualquer uma das populações avaliadas, um aumento da eficácia com a combinação de ambas as terapias, traduzida na diminuição significativa dos valores do IC_{50} (Tabela 6). Assim, constatou-se que o valor de IC_{50} com a combinação das terapias foi menor e de forma mais acentuada na população $CD44^+/ALDH^+$, numa percentagem de 55 %. Ainda assim, na população $CD44^-/ALDH^-$ verificou-se uma diminuição de 45 % neste valor de IC_{50} (Tabela 6).

De forma geral, o vandetanib originou uma taxa de morte celular superior relativamente ao erlotinib, uma vez que foi necessária, sensivelmente, metade da concentração do erlotinib, na população $CD44^+/ALDH^+$, para atingir os 50 % de morte celular e menos de um terço da concentração do erlotinib na população $CD44^-/ALDH^-$ (Tabelas 5 e 6). De igual forma, a taxa de morte foi superior com a combinação do vandetanib com os lipossomas vetorizados com o peptídeo F3, relativamente à combinação dos lipossomas com o erlotinib, verificando-se uma diminuição de cerca de 60 % do valor de IC_{50} das populações $CD44^+/ALDH^+$ e $CD44^-/ALDH^-$ (Tabelas 5 e 6).

Tabela VII. Valores de IC_{90} e IC_{50} relativos à citotoxicidade induzida pelo vandetanib nas populações $CD44^+/ALDH^+$, $CD44^-/ALDH^-$ e parental, na linha celular H1975.

Células		IC_{50} (μ M) Média		
H1975		Vandetanib		
	Linha parental	$CD44^+/ALDH^+$	$CD44^-/ALDH^-$	
72 h	3,74	6,30	4,83	
72 h+ 4 h p[F3]SL	2,00	2,83	2,68	
		IC_{90} (μ M) Média		
		Vandetanib		
	Linha parental	$CD44^+/ALDH^+$	$CD44^-/ALDH^-$	
72 h	>10	>10	>10	
72 h+ 4 h p[F3]SL	>10	>10	>10	

3.7.2. Lipossomas Vetorizados com o Peptídeo F3

Pretendendo avaliar o impacto dos lipossomas vetorizados com o peptídeo F3 nas populações CD44⁺/ALDH⁺ e CD44⁻/ALDH⁻, efetuou-se um ensaio de citotoxicidade. Testaram-se várias concentrações de DXR encapsulada, desde os 0,08 μM até aos 10 μM , durante um período de incubação de 4 horas. (Figura 3.14).

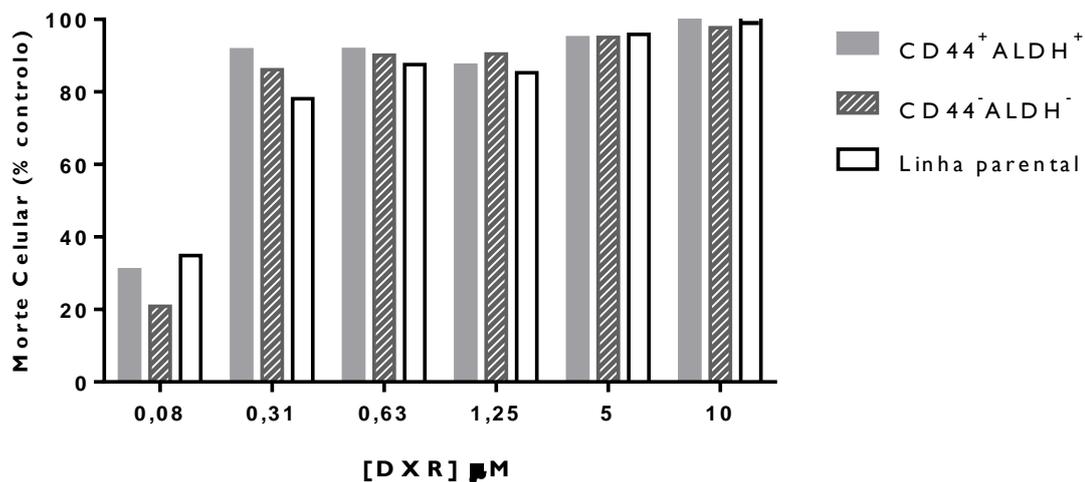


Figura 3.14. Citotoxicidade celular dos lipossomas direcionados com o peptídeo F3 nas subpopulações CD44⁺/ALDH⁺, CD44⁻/ALDH⁻ e na população parental da linha celular HI975.

As subpopulações CD44⁺/ALDH⁺ e CD44⁻/ALDH⁻ foram plaqueadas e depois incubadas com os lipossomas vetorizados com o peptídeo F3, encapsulando DXR (p[F3]SL). Foi testada uma $[\]_{\text{máx}}$ de 10 μM , sujeita a várias diluições até à concentração de 0,08 μM , durante um período de incubação de 4 horas, a 37° C. Como controlo, foi testada a população parental nas mesmas condições. Os dados referem-se à média de triplicados de uma experiência.

Na figura 3.14 observa-se que, em todas as concentrações, à exceção da concentração mínima testada (0,08 μM) a taxa de morte celular é sempre superior a 80 % em todas as populações avaliadas, chegando aos 95-100 % para as concentrações 5 e 10 μM . Verificou-se ainda que a nanopartícula é capaz de induzir morte tanto na população CD44⁺/ALDH⁺ como na população CD44⁻/ALDH⁻. No entanto, constatou-se que os valores de IC₅₀ e IC₉₀ são inferiores na população CD44⁺/ALDH⁺ (população enriquecida em células estaminais tumorais) (Tabela 7).

Quando comparados os valores de IC₅₀ e IC₉₀ dos fármacos erlotinib e vandetanib com a formulação vetorizada, observa-se uma diminuição muito acentuada destes valores. No caso da subpopulação CD44⁺/ALDH⁺, verifica-se uma diminuição do valor de IC₅₀ em 79 vezes

relativamente ao vandetanib e de 162 vezes no caso do erlotinib. Na subpopulação CD44⁻/ALDH⁻, esta diminuição foi igualmente acentuada, tendo sido necessária 44 vezes menor concentração de DXR encapsulada nos lipossomas para atingir 50 % de morte, relativamente ao vandetanib e de 157 vezes relativamente ao erlotinib (Tabelas 5,6 e 7).

Tabela VIII. Valores de IC₉₀ e IC₅₀ relativos à citotoxicidade induzida pelos lipossomas direcionados com o peptídeo F3 nas populações CD44⁺/ALDH⁺, CD44⁻/ALDH⁻ e parental, na linha celular HI975.

Células		IC ₅₀ (μM) Média		
HI975	Linha parental	p[F3]SL		
		CD44 ⁺ /ALDH ⁺	CD44 ⁻ /ALDH ⁻	
4 h		0,12	0,08	0,11
	Linha parental	IC ₉₀ (μM) Média		
		CD44 ⁺ /ALDH ⁺	CD44 ⁻ /ALDH ⁻	
		1,20	0,95	1,32

CAPÍTULO IV

Discussão

4. Discussão

Atualmente, as terapias que existem para controlar o cancro são bastante agressivas para o organismo, para além do baixo benefício terapêutico que apresentam em muitos casos. Assim, torna-se crucial a investigação e desenvolvimento de novas terapias com maior especificidade capazes de ultrapassar os efeitos colaterais associados às terapias existentes, tal como, de aumentar a eficácia no tratamento desta doença.

Nos últimos anos, a nanotecnologia tem emergido como um novo conceito de entrega terapêutica em cancro, uma vez que existem diversas vantagens inerentes a esta estratégia (Peer et al., 2007). As nanopartículas que possuem um tamanho relativamente pequeno (<200 nm), possuem uma maior facilidade no extravasamento através dos vasos sanguíneos tumorais relativamente a estruturas maiores, assim como se verifica um aumento do seu tempo de meia-vida na circulação sanguínea e um menor reconhecimento pelo sistema mononuclear fagocítico (Peer et al., 2007; Wang et al., 2012). Estas características aumentam a eficiência das nanopartículas relativamente a outras estratégias terapêuticas, uma vez que permitem que uma quantidade superior de fármaco chegue ao tumor (Fenske et al., 2005; Simões et al., 2004).

Desta forma, o fato de os lipossomas avaliados apresentarem um tamanho entre 70 e 90 nm (Figura 3.1. A e B), representa uma vantagem terapêutica que se traduz num aumento de eficácia quando se trata de administração sistémica. Encontra-se descrito na literatura que o método que foi utilizado na formulação dos lipossomas, injeção de etanol, possui um forte impacto no tamanho final destas nanopartículas (Maitani et al., 2007; Semple et al., 2001), o que se comprovou.

Com base nas vantagens associadas às nanopartículas, a vectorização das mesmas para alvos específicos no microambiente tumoral, constitui uma ferramenta bastante atrativa na inovação deste tipo de estratégia terapêutica (Lam et al., 2011; Pallis et al., 2009; Papaetis et al., 2007). Assim, uma vez que a angiogénese é essencial ao crescimento de um tumor, torna-se um alvo importante a inibir (Fukumura et al., 2007; Kerbel 2008; Pallis et al., 2012). Desta forma, uma nanopartícula desenvolvida no nosso laboratório, um lipossoma vectorizado com o peptídeo F3, específico para a nucleolina, é duplamente direcionado, uma vez que possui especificidade não só para as células tumorais mas também para as células endoteliais do tumor, devido à sobre-expressão de nucleolina nestas células (Christian et al., 2003). É demonstrado que a internalização celular é dependente do peptídeo F3 (figura 3.2 e 3.3) em cancro do pulmão de não pequenas células, como já anteriormente comprovado em cancro da mama (Moura et al., 2012). Através do estudo da associação celular, verificou-se ainda que

a internalização dos lipossomas é um processo dependente de energia, uma vez que se observa uma diminuição acentuada da associação celular no estudo a 4° C. A esta temperatura o metabolismo celular, inclusivamente a endocitose mediada por recetores, encontra-se inativo, pelo que a 4° C os lipossomas ligam à membrana celular mas não são internalizados. Contrariamente, a uma temperatura de 37° C, o metabolismo celular está ativo e as nanopartículas ligam-se às células e são internalizadas, o que sugere uma dependência de energia para que ocorra internalização celular (Gomes-Da-Silva et al., 2012; Moura et al., 2012).

Por outro lado, o fato de a diferença entre a associação celular verificada após 1 hora e após 4 horas não ser o dobro, indica que poderá existir uma saturação dos recetores. Segundo Hovnessian et al. (2010) o tempo de semi-vida da nucleolina em algumas linhas celulares à superfície é de, aproximadamente, 45 minutos (Hovnessian et al., 2010). Nesta linha celular, H1975, poderá ocorrer o mesmo, o que faz com exista uma menor disponibilidade da nucleolina na membrana celular após a saturação dos recetores.

Estes dados de associação celular foram complementados com estudos de citotoxicidade que mais uma vez indicaram uma especificidade por parte dos lipossomas vetorizados com o peptídeo F3 (p[F3]SL), apresentando uma eficácia muito superior quando comparados aos lipossomas não vetorizados (pSL) ou vetorizados com um ligando não específico (p[NS]SL) (Figura 3.3. A, B e C). Quando comparado ao efeito citotóxico provocado por qualquer um dos fármacos inibidores de tirosina cinase testados (erlotinib, vandetanib, gefitinib e sunitinib) (Figura 3.5, 3.6, 3.7 e 3.8) verificou-se que o IC₉₀ da formulação lipossomal funcionalizada com o peptídeo F3 é sempre substancialmente inferior (Tabelas 3 e 4), indicando um aumento de eficácia por parte da nanopartícula.

Existem vários estudos que comprovam a baixa eficácia e resistência aos fármacos inibidores de tirosina cinase em linhas celulares de cancro do pulmão, inclusivamente na linha H1975 (Cascone et al., 2011; Pao et al., 2005), pelo fato de esta linha celular ser um modelo de resistência adquirida, uma vez que possui uma mutação pontual no exão 21 (L858R), uma deleção do exão 19 (E746-E750) e uma mutação pontual no exão 20 (T790M) (Pao et al., 2005). Estas mutações encontram-se associadas, inicialmente, a uma maior sensibilidade aos fármacos inibidores de tirosina cinase, mas, posteriormente, acabam por estar igualmente associadas ao desenvolvimento de resistência aos fármacos inibidores de tirosina cinase (Pao et al., 2005b; Ling et al., 2009; Pallis et al., 2012). Desta forma, poderia verificar-se uma redução ainda mais acentuada na sensibilidade aos fármacos testados se o ensaio de citotoxicidade fosse prolongado por um período superior ou, adicionalmente, se avançarmos para estudos *in*

vivo, será possível efetuar este tipo de estudos de forma mais rigorosa e em condições que permitam aceder ao desenvolvimento tardio de resistência por parte da linha celular HI975.

Por outro lado, como já referido anteriormente, as células estaminais tumorais parecem estar envolvidas no processo de resistência e, neste estudo, depois da verificação de que a linha celular HI975 possuía potencial estaminal, através do ensaio de formação de esferas, foi possível identificar esta população, através dos marcadores CD44, CD133 e ALDH (Figuras 3.10 e 3.11). Contrariamente ao que tem sido vastamente descrito na literatura em tecidos e linhas de cancro do pulmão, a expressão de CD133 revelou-se bastante baixa na linha HI975, de CPNPC (Hilbe et al., 2004; Tirino et al., 2009). Adicionalmente, existem estudos recentes que referem que este marcador de células estaminais tumorais poderá não ser o mais indicado em linhas de CPNPC, uma vez que não revelaram potencial tumorigénico (Cui et al., 2011; Wang et al., 2011). Apesar destes dados, a associação celular dos lipossomas vetorizados com o peptídeo F3 foi superior na população que sobre-expressa CD133 e CD44 relativamente à população que sobre-expressa CD44 mas não CD133 (Figura 3.10). Este resultado poderá sugerir que as células que sobre-expressam os dois marcadores possuam igualmente uma sobre-expressão de nucleolina, que se encontra associada a homeostasia das células estaminais embrionárias, o que pode indicar que esta população possui características de células estaminais (Yang et al., 2011). Para comprovar estes dados, seria necessário efetuar outro tipo de estudos que permitissem verificar esta situação, como por exemplo efetuar *cell sorting* da população que sobre-expressa CD133 e da população que possui baixa marcação para CD133 e, posteriormente, efetuar um ensaio de formação de esferas, no sentido de avaliar qual o potencial replicativo de ambas as populações (Eramo et al., 2008).

Contrariamente ao marcador CD133, os marcadores CD44 e a ALDH têm sido descritos na literatura enquanto marcadores de células estaminais tumorais em CPNPC, de forma consistente (Miletti-González et al., 2005; Leung et al., 2010; Jiang et al., 2009; Huang et al., 2013). O fato de a população que sobre-expressa estes dois marcadores (CD44⁺/ALDH⁺), ou seja, potenciais células estaminais tumorais, possuir uma associação celular superior dos lipossomas vetorizados de forma específica relativamente às populações restantes (Figura 3.11), indica que esta nanopartícula poderá suprimir uma possível resistência associada a esta população (Visvader, 2011). Assim, verifica-se que os lipossomas funcionalizados com o peptídeo F3 possuem a capacidade de serem associados por várias subpopulações, o que representa uma característica essencial a uma terapêutica inovadora e eficaz (Visvader, 2012).

Adicionalmente, foi comprovado, através de uma experiência de *cell sorting* das populações CD44⁻/ALDH⁻ e CD44⁺/ALDH⁺, que os fármacos inibidores da tirosina cinase,

vandetanib e erlotinib, possuem elevados valores de IC_{50} em todas as populações, possuindo um baixo efeito citotóxico quando aplicados de forma isolada (Tabelas 6 e 7). No entanto, o IC_{50} do vandetanib na população $CD44^+/ALDH^+$ foi superior relativamente à população $CD44^-/ALDH^-$, o que sugere uma possível resistência a este fármaco por parte desta população (Tabela 7). Ainda assim, a adição dos lipossomas vetorizados com o peptídeo F3 após tratamento com os fármacos, resultou numa diminuição considerável do valor de IC_{50} , aumentando o efeito citotóxico nestas células (Tabelas 6 e 7). Recentemente, Liu et al. (2013) de forma semelhante, recorreram ao isolamento de células de cancro do pulmão que sobre-expressam os marcadores CD44 e ALDH, através de *cell sorting* para aceder à capacidade tumorigénica desta população, assim como à sua capacidade de resistência. Esta equipa comprovou que a população $CD44^+/ALDH^+$ não só possuía uma capacidade tumorigénica superior quando comparada com a população $CD44^-/ALDH^-$, como também apresentava um valor de IC_{50} respetivo ao fármaco gefitinib 8,5 vezes superior à população parental (Liu et al., 2013). Também Huang et al, verificaram que células de CPNPC que sobre-expressavam ALDH possuem um enorme potencial tumorigénico quando comparadas com as células que não sobre-expressavam esta enzima e, por outro lado, verificaram que esta população, potencialmente tumorigénica, se encontrava associada à resistência a inibidores de tirosina cinase (Huang et al., 2013).

Adicionalmente, no presente estudo, tivemos indicação, mais uma vez através da experiência de *cell sorting*, que, para além de a nanopartícula ser associada por várias subpopulações celulares, também possui um potente efeito citotóxico sobre elas, quando utilizada de forma isolada, como seria de esperar pelas características já descritas da mesma (Figura 3.14). Foi verificada uma elevada sensibilidade ao fármaco citostático doxorrubicina, por parte da linha celular H1975, sendo que, com baixas concentrações, a morte celular chega aos 90 % tanto na subpopulação $CD44^-/ALDH^-$ como na subpopulação $CD44^+/ALDH^+$, o que comprova a indicação anterior de que esta nanopartícula possuía capacidade de atingir as várias subpopulações que constituem o tumor (Figura 3.14). Apesar disso, o valor de IC_{50} na população enriquecida em células estaminais tumorais, $CD44^+/ALDH^+$, é inferior (Tabela 8), como seria expectável após o estudo de associação celular nesta subpopulação. Este dado poderá indicar uma possível sobre-expressão de nucleolina nesta população, o que confere à nanopartícula uma maior especificidade para a população enriquecida em células estaminais tumorais, como já descrito anteriormente por Fonseca et al. (2015) em linhas celulares de cancro da mama (Fonseca et al., 2015). Adicionalmente, como referido, a nanopartícula revelou de igual forma possuir um elevado potencial citotóxico na população de células

cancerígenas não estaminais, o que é de extrema importância uma vez que Chaffer et al. (2013) verificaram que esta população de células pode originar uma população de células estaminais tumorais, tornando-se por isso essencial a especificidade dos lipossomas para a população de células cancerígenas não tumorais (Chaffer et al., 2013).

Demonstra-se, assim, que apesar de os fármacos inibidores de tirosina cinase serem direcionados para o tumor, uma vez que inibem especificamente vias que estão sobre-expressas no mesmo, esta característica não os torna eficientes na toxicidade tumoral, dado que possivelmente as células estaminais tumorais terão um papel preponderante no desenvolvimento e progressão tumoral e estes fármacos não são específicos para esta população (Visvader, 2012). Por contraste, os lipossomas funcionalizados com o peptídeo F3, possuem vários alvos no microambiente tumoral, nomeadamente as células tumorais e as células endoteliais dos vasos sanguíneos tumorais, mediado pela elevada expressão de nucleolina nestas células quando comparada com células normais (Christian et al., 2003; Moura et al., 2012). Para além disso, esta nanopartícula demonstrou ser direcionada para a população enriquecida em células estaminais tumorais, representando uma potencial estratégia terapêutica multi-direcionada capaz de aceder a vários componentes do microambiente tumoral.

CAPÍTULO V

Conclusões e Perspetivas Futuras

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

As células estaminais tumorais têm sido vastamente associadas ao desenvolvimento e progressão tumoral, assim como ao desenvolvimento de resistência às terapias atualmente existentes (Eramo et al., 2008; Huang et al., 2013). Existe, por isso, uma necessidade constante de estudar os mecanismos associados a esta população, assim como de desenvolver inovadoras e eficazes terapias que possuam as células estaminais tumorais como alvo.

No presente estudo, demonstrou-se que a linha celular H1975, de cancro do pulmão de não pequenas células, possuía capacidade estaminal, tendo sido possível identificar a população enriquecida em células estaminais tumorais. Para além disso, foi possível verificar que os fármacos inibidores de tirosina cinase testados, erlotinib e vandetanib, possuíam uma baixa eficácia na citotoxicidade celular em qualquer uma das populações celulares isoladas por *cell sorting*: a população de células que não apresentam fenótipo característico de células estaminais tumorais (CD44⁻/ALDH⁻) e a população enriquecida em células estaminais tumorais (CD44⁺/ALDH⁺). No entanto, a combinação de qualquer um destes fármacos com a nanopartícula desenvolvida no nosso laboratório, um lipossoma PEGilado sensível ao pH, direcionado para a nucleolina através do peptídeo F3 e encapsulando com doxorrubicina, resultou num aumento de eficácia bastante acentuado, o que se poderá traduzir num benefício terapêutico em doentes com cancro do pulmão de não pequenas células.

Por outro lado, demonstrou-se que esta nanopartícula, através da sua especificidade para a nucleolina, é, simultaneamente, direcionada para a subpopulação de células tumorais não consideradas células estaminais tumorais e para a subpopulação enriquecida em células estaminais tumorais. Esta especificidade, associada ao fato de estes lipossomas possuírem, de igual forma, especificidade para as células dos vasos endoteliais tumorais através da sobre-expressão da nucleolina nos mesmos, torna-a uma estratégia terapêutica multidirecionada, capaz de aceder a vários componentes do microambiente tumoral. Adicionalmente, tratando-se de lipossomas direcionados para o tumor, esta estratégia diminui os efeitos colaterais associados à quimioterapia, nomeadamente cardiotoxicidade, assim como é expectável um aumento de eficácia terapêutica após administração sistémica destas nanopartículas.

No sentido de comprovar os resultados obtidos *in vitro*, serão necessários estudos adicionais, nomeadamente estudos *in vivo*. Somente em modelos animais, nomeadamente em modelos gerados a partir de tecido tumoral de doentes, será possível testar de forma mais rigorosa as várias terapias nas condições adequadas, para além de ser possível mimetizar o

microambiente tumoral e aceder ao potencial tumorigénico da população de células estaminais tumorais nestes modelos.

Por fim, os resultados obtidos *in vitro* revelaram-se bastante promissores, pelo que o impacto desta nanopartícula na população de células estaminais tumorais deve continuar a ser estudado de forma a aprofundar esta relação. Se os resultados obtidos continuarem a ser corroborados, esta estratégia terapêutica será dotada de um enorme potencial, expectando-se um grande impacto no benefício terapêutico em doentes com cancro do pulmão de não pequenas células.

CAPÍTULO VI

Referências

6. Referências

AKBULUT, H. [et.al] (2002) - Prognostic Role of Serum Vascular Endothelial Growth Factor, Basic Fibroblast Growth Factor and Nitric Oxide in Patients with Colorectal Carcinoma. "Cytokine" 20 (2002) 184–190.

ALAVANJA, M. [et.al] (2004) - Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. "IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans" 83 (2004) 1413–1413.

ALLEN, T. [et.al] (2013) - Liposomal Drug Delivery Systems: From Concept to Clinical Applications. "Advanced Drug Delivery Reviews" 65 (2013) 36–48.

ANAJWALA, C. [et.al] (2010) - Current Trends of Nanotechnology for Cancer Therapy. "International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology" 3 (2010) 1043–1056.

ARORA, A. [et.al] (2005) - Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. "Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics" 315 (2005) 971–979.

ASAHARA, T. [et.al] (1997) - Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. "Science" 275 (1997) 964–967.

BARENHOLZ, Y. (2012) - Doxil- The First FDA-Approved Nano-Drug: Lessons Learned. "Journal of Controlled Release" 160 (2012) 117–134.

BATCHELOR, T. [et.al] (2007) - AZD2171, a Pan-VEGF Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Normalizes Tumor Vasculature and Alleviates Edema in Glioblastoma Patients. "Cancer Cell" 11 (2007) 83–95.

BENAYOUN, L. [et.al] (2012) - Tumor-Initiating Cells of Various Tumor Types Exhibit Differential Angiogenic Properties and React Differently to Antiangiogenic Drugs. "Stem Cells" 30 (2012) 1831–1841.

BENDER, J. [et.al] (2004) - Vascular Remodeling and Clinical Resistance to Antiangiogenic Cancer Therapy. "Drug Resistance Updates" 7 (2004) 289–300.

BERGER, C. [et.al] (2015) - The Roles of Nucleolin Subcellular Localization in Cancer. "Biochimie" 113 (2015) 78–85.

BERGERS, G. [et.al] (2003) - Tumorigenesis and the Angiogenic Switch. "Nature reviews. Cancer" 3 (2003) 401–410.

BERGERS, G. [et.al] (2008) - Modes of Resistance to Anti-Angiogenic Therapy. "Nature reviews. Cancer" 8 (2008) 592–603.

BERTOLINI, G. [et.al] (2009) - Highly Tumorigenic Lung Cancer CD133+ Cells Display Stem-like Features and Are Spared by Cisplatin Treatment. "Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America" 106 (2009) 16281–16286.

BOLOTIN, E. [et.al] (1994) - Liposomes and Ligandoliposomes. "Journal of Liposome Research" 4 (1994) 455–479.

BROLL, R. [et.al] (2001) - Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-a Valuable Serum Tumour Marker in Patients with Colorectal Cancer? "European Journal of Surgical Oncology" 27 (2001) 37–42.

BUNN, P. [et.al] (2002) - Epidermal Growth Factor Receptor Expression, Signal Pathway, and Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. "Seminars in Oncology" 29 (2002) 38–44.

CARMELIET, P. (2000) - Mechanisms of Angiogenesis and Arteriogenesis. "Nature medicine" 6 (2000) 389–395.

CARMELIET, P. (2005) - Angiogenesis in Life, Disease and Medicine. "Nature" 438 (2005) 932–36.

CASANOVAS, O. [et.al] (2005) - Drug Resistance by Evasion of Antiangiogenic Targeting of VEGF Signaling in Late-Stage Pancreatic Islet Tumors. "Cancer Cell" 8 (2005) 299–309.

CASCONE, T. [et.al] (2011) - Upregulated Stromal EGFR and Vascular Remodeling in Mouse Xenograft Models of Angiogenesis Inhibitor-Resistant Human Lung Adenocarcinoma. "Journal of Clinical Investigation" 121 (2011) 1313–1328.

CERSOSIMO, R. (2006) - Gefitinib: An Adverse Effects Profile. “Expert Opinion on Drug Safety” 5 (2006) 469–479.

CHAFFER, C. [et.al] (2013) - Poised Chromatin at the ZEB1 Promoter Enables Breast Cancer Cell Plasticity and Enhances Tumorigenicity. “Cell” 154 (2013) 61–74.

CHEN, Y. [et.al] (2008) - Oct-4 Expression Maintained Cancer Stem-like Properties in Lung Cancer-Derived CD133-Positive Cells. “PLoS ONE” 3 (2008) 1–14.

CHEN, Z. [et.al] (2014) - Non-Small-Cell Lung Cancers: A Heterogeneous Set of Diseases. “Nature Reviews Cancer” 14 (2014) 535–546.

CHRISTIAN, S. [et.al] (2003) - Nucleolin Expressed at the Cell Surface Is a Marker of Endothelial Cells in Angiogenic Blood Vessels. “Journal of Cell Biology” 163 (2003) 871–878.

COHEN, M. [et.al] (2005) - FDA Drug Approval Summary: Erlotinib (Tarceva) Tablets. “Oncologist” 10 (2005) 461–466.

COLEMAN, W. [et.al] (2006) - Molecular Mechanisms of Human Carcinogenesis. “EXS Journal” 96 (2006) 321–349.

COLLISSON, E. [et.al] (2014) - Comprehensive Molecular Profiling of Lung Adenocarcinoma. “Nature” 511 (2014) 543–550.

COMMANDER, H. [et.al] (2011) - Vandetanib, First Global Approval. “Drugs” 71 (2011) 1355–1365.

COWGILL, S [et.al] (2003) - The Genetics of Pancreatic Cancer. “American Journal of Surgery” 186 (2003) 279–286.

CRAWFORD, Y. [et.al] (2009) - Tumor and Stromal Pathways Mediating Refractoriness/resistance to Anti-Angiogenic Therapies. “Trends in Pharmacological Sciences” 30 (2009) 624–360.

CRINÒ, L. [et.al] (2014) - Therapeutic Options Targeting Angiogenesis in Non Small Cell Lung Cancer. "European Respiratory Review" 23 (2014) 79–91.

CUENCA, A. [et.al] (2006) - Emerging Implications of Nanotechnology on Cancer Diagnostics and Therapeutics. "Cancer" 107 (2006) 459–466.

CUI, F. [et.al] (2011) - CD133 Is a Temporary Marker of Cancer Stem Cells in Small Cell Lung Cancer, but Not in Non-Small Cell Lung Cancer. "Oncology reports" 25 (2011) 701–708.

DANCEY, J. (2004) - Predictive Factors for Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors--the Bull's-Eye Hits the Arrow. "Cancer Cell" 5 (2004) 411–415.

DOLL, R. [et.al] (1954) - The Mortality of Doctors in Relation to Their Smoking Habits. "British Medical Journal" 1 (1954) 1451–1455.

DONG, W. [et.al] (2006) - An Orally Administered Multitarget Tyrosine Kinase Inhibitor, SUI1248, Is a Novel Potent Inhibitor of Thyroid Oncogenic RET/papillary Thyroid Cancer Kinases. "Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism" 91 (2006) 4070–4076.

DONTU, G. [et.al] (2003) - In Vitro Propagation and Transcriptional Profiling of Human Mammary Stem/progenitor Cells. "Genes & Development" 17 (2003) 1253–1270.

EBOS, J. [et.al] (2009a) - Accelerated Metastasis after Short-Term Treatment with a Potent Inhibitor of Tumor Angiogenesis. "Cancer Cell" 15 (2009) 232–239.

EBOS, J. [et.al] (2009b) - Tumor and Host-Mediated Pathways of Resistance and Disease Progression in Response to Antiangiogenic Therapy. "Clinical Cancer Research" 15 (2009) 5020–5025.

ELLIS, L. [et.al] (2008) - Pathways Mediating Resistance to Vascular Endothelial Growth Factor-Targeted Therapy. "Clinical Cancer Research" 14 (2008) 6371–6375.

ERAMO, A. [et.al] (2008) - Identification and Expansion of the Tumorigenic Lung Cancer Stem Cell Population. "Cell Death and Differentiation" 15 (2008) 504–514.

FALCHOOK, G. [et.al] (2014) - Effect of the RET Inhibitor Vandetanib in a Patient With RET Fusion-Positive Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. “Journal of Clinical Oncology” 32 (2014) 2013–2016.

FENSKE, D. [et.al] (2005) - Entrapment of Small Molecules and Nucleic Acid-Based Drugs in Liposomes. “Methods in Enzymology” 391 (2005) 7–40.

FERLAY, J. [et.al] (2013) - Cancer Incidence and Mortality Patterns in Europe: Estimates for 40 Countries in 2012. “European Journal of Cancer” 49 (2013) 1374–1403.

FERLAY, J. [et.al] (2015) - Cancer Incidence and Mortality Worldwide : Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012. “International Journal of Cancer” 186 (2015) 359–386.

FERRARA, N. [et.al] (1997) - The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. “Endocrine Reviews” 18 (1997) 4–25.

FERRARA, N. [et.al] (2003) - The Biology of VEGF and Its Receptors. “Nature Medicine” 9 (2003) 669–676.

FERRARA, N. (2004) - Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. “Endocrine Reviews” 25 (2004) 581–611.

FOLKMAN, J. (1971) – Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. “The New England Journal of Medicine” 285 (1971) 1182-1186.

FOLKMAN, J. (1972) - Anti-Angiogenesis: New Concept for Therapy of Solid Tumors. “Annals of Surgery” 175 (1972) 409–416.

FONSECA, N. [et.al] (2014) - Bridging Cancer Biology and the Patients’ Needs with Nanotechnology-Based Approaches. “Cancer Treatment Reviews” 40 (2014) 626–635.

FONSECA, N. [et.al] (2015) - Nucleolin Overexpression in Breast Cancer Cell Sub-Populations with Different Stem-like Phenotype Enables Targeted Intracellular Delivery of Synergistic Drug Combination. "Biomaterials" 69 (2015) 76–88.

FUJIKI, H. [et.al] (2014) - Cell-Surface Nucleolin Acts as a Central Mediator for Carcinogenic, Anti-Carcinogenic, and Disease-Related Ligands. "Journal of Cancer Research and Clinical Oncology" 140 (2014) 689–699.

FUKUMURA, D. [et.al] (2007) - Tumor Microvasculature and Microenvironment: Targets for Anti-Angiogenesis and Normalization. "Microvascular Research" 74 (2007) 72–84.

GAUMET, M. [et.al] (2008) - Nanoparticles for Drug Delivery: The Need for Precision in Reporting Particle Size Parameters. "European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics" 69 (2008) 1–9.

GAZDAR, A. (2009) - Activating and Resistance Mutations of EGFR in Non-Small-Cell Lung Cancer: Role in Clinical Response to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. "Oncogene" 28 (2009) 24–31.

GINESTIER, C. [et.al] (2007) - ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. "Cell Stem Cell" 1 (2007) 555–567.

GIULIANO, S. [et.al] (2013) - Mechanisms of Resistance to Anti-Angiogenesis Therapies. "Biochimie" 95 (2013) 1110–1119.

GOMES-DA-SILVA, L. [et.al] (2012) - Toward a siRNA-Containing Nanoparticle Targeted to Breast Cancer Cells and the Tumor Microenvironment. "International Journal of Pharmaceutics" 434 (2012) 9–19.

GOMES-DA-SILVA, L. [et.al] (2013) - Impact of Anti-PLK1 siRNA-Containing F3-Targeted Liposomes on the Viability of Both Cancer and Endothelial Cells. "European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics" 85 (2013) 356–364.

GRIDELLI, C. [et.al] (2014) - Phase II Randomized Study of Vandetanib Plus Gemcitabine or Gemcitabine Plus Placebo as First-Line Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer in Elderly Patients. "Journal of thoracic oncology" 9 (2014) 733–737.

GRIDELLI, C. [et.al] (2015) - Non-Small-Cell Lung Cancer. "Nature Reviews Disease Primers" 1 (2015) 1–16.

HAFEZ, I. [et.al] (2000a) - Tunable pH-Sensitive Liposomes Composed of Mixtures of Cationic and Anionic Lipids. "Biophysical journal" 79 (2000) 1438–1446.

HAFEZ, I. [et.al] (2000b) - Cholesteryl Hemisuccinate Exhibits pH Sensitive Polymorphic Phase Behavior. "Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes" 1463 (2000) 107–114.

HANAHAN, D. [et.al] (2000) - The Hallmarks of Cancer. "Cell" 100 (2000) 57–70.

HEIGENER, D. [et.al] (2011) - Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Non-Small Cell Lung Cancer: Impact on Treatment beyond Gefitinib and Erlotinib. "Advances in Therapy" 28 (2011) 126–133.

HERBST, R. (2005) - Phase I/II Trial Evaluating the Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Monoclonal Antibody Bevacizumab in Combination With the HER-1/Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Erlotinib for Patients With Recurrent Non-Small-Cell Lung Canc. "Journal of Clinical Oncology" 23 (2005) 2544–2555.

HERBST, R. [et.al] (2011) - Efficacy of Bevacizumab plus Erlotinib versus Erlotinib Alone in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer after Failure of Standard First-Line Chemotherapy (BeTa): A Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial. "The Lancet" 377 (2011) 1846–1854.

HEYMACH, J. [et.al] (2014) - EGFR Biomarkers Predict Benefit from Vandetanib in Combination with Docetaxel in a Randomized Phase III Study of Second Line Treatment for Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. "Annals of Oncology" 25 (2014) 1–20.

HEYMACH, J. [et.al] (2007) - Randomized, Placebo-Controlled Phase II Study of Vandetanib plus Docetaxel in Previously Treated Non Small-Cell Lung Cancer. “Journal of Clinical Oncology” 25 (2007) 4270–4277.

HICKLIN, D. [et.al] (2005) - Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. “Journal of Clinical Oncology” 23 (2005) 1011–1027.

HILBE, W. [et.al] (2004) - CD133 Positive Endothelial Progenitor Cells Contribute to the Tumour Vasculature in Non-Small Cell Lung Cancer. “Journal of Clinical Pathology” 57 (2004) 965–969.

HIRSCH, R. [et.al.] (2003) - Epidermal Growth Factor Receptor in Non-Small-Cell Lung Carcinomas: Correlation between Gene Copy Number and Protein Expression and Impact on Prognosis. “Journal of Clinical Oncology” 21 (2003) 3798–3807.

HO, M. [et.al] (2007) - Side Population in Human Lung Cancer Cell Lines and Tumors Is Enriched with Stem-like Cancer Cells. “Cancer Research” 67 (2007) 4827–4833.

HOOD, J. [et.al] (2002) - Tumor Regression by Targeted Gene Delivery to the Neovasculature. “Science” 296 (2002) 2404–2407.

HOVANEISSIAN, G. [et.al] (2010) - Surface Expressed Nucleolin Is Constantly Induced in Tumor Cells to Mediate Calcium-Dependent Ligand Internalization. “PLoS ONE” 5 (2010).

HUANG, C. [et.al] (2013) - ALDH-Positive Lung Cancer Stem Cells Confer Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors. “Cancer letters” 328 (2013) 144–151.

HURWITZ, H. [et.al] (2004) - Bevacizumab plus Irinotecan, Fluoracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. “The New England Journal of Medicine” 350 (2004) 2335–2342.

ICHIHARA, E. [et.al] (2011) - Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy. “Acta Medica Okayama” 65 (2011) 353–362.

- ICHIKAWA, Y. [et.al] (2014) - Cardiotoxicity of Doxorubicin Is Mediated through Mitochondrial Iron Accumulation. "Journal of Clinical Investigation" 124 (2014) 617–630.
- INOUE, A. [et.al] (2006) - Prospective Phase II Study of Gefitinib for Chemotherapy-Naive Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer with Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutations. "Journal of clinical oncology" 24 (2006) 3340–3346.
- JACKMAN, D. [et.al] (2010) - Clinical Definition of Acquired Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer. "Journal of Clinical Oncology" 28 (2010) 357–360.
- JAIN, R. [et.al] (2003) - What Brings Pericytes to Tumor Vessels? "J. Clin. Invest." 112 (2003) 1134–1136.
- JEMAL, A. [et.al] (2011) - Global Cancer Statistics. "CA Cancer J Clin" 61 (2011) 69–90.
- JIANG, F. [et.al] (2009) - Aldehyde Dehydrogenase I Is a Tumor Stem Cell-Associated Marker in Lung Cancer. "Molecular Cancer Research" 7 (2009) 330–338.
- KEITH, B. [et.al] (2007) - Hypoxia-Inducible Factors, Stem Cells, and Cancer. "Cell" 129 (2007) 465–472.
- KERBEL, R. (2008) - Tumor Angiogenesis. "The New England Journal of Medicine" 34 (2008) 189–201.
- KUMAR, Vinay [et al] **Robbins Basic Pathology**, 8ª edição Elsevier Health Sciences, 2007 ISBN- 9781437700664
- KUNKEL, P. [et.al] (2001) - Inhibition of Glioma Angiogenesis and Growth in Vivo by Systemic Treatment with a Monoclonal Antibody against Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 I. "Cancer Research UK" 61 (2001) 6624–6628.
- LAM, K. [et.al] (2011) - Targeted Therapy: An Evolving World of Lung Cancer. "Official Journal of the Asian Pacific Society of Respiratory" 16 (2011) 13–21.

LASIC, D. [et.al] (1991) - Sterically Stabilized Liposomes: A Hypothesis on the Molecular Origin of the Extended Circulation Times. “Biochimica et biophysica acta” 1070 (1991) 187–192.

LEUNG, E. [et.al] (2010) - Non-Small Cell Lung Cancer Cells Expressing CD44 Are Enriched for Stem Cell-like Properties. “PloS one” 5 (2010) 1–13.

LIANG, D. [et.al] (2012) - Aldehyde Dehydrogenase-I Is a Specific Marker for Stem Cells in Human Lung Adenocarcinoma. “Medical Oncology” 29 (2012) 633–639.

LING, Y. [et.al] (2009) - Molecular Pharmacodynamics of PM02734 (elisidepsin) as Single Agent and in Combination with Erlotinib; Synergistic Activity in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines and Xenograft Models. “European Journal of Cancer” 45 (2009) 1855–1864.

LIU, J. [et.al] (2013) - Lung Cancer Tumorigenicity and Drug Resistance Are Enhanced through ALDH^{hi} CD44^{hi} Tumor Initiating Cells. “Oncotarget” 4 (2013) 1698–1711.

REINO UNIDO, Cancer Research UK- **Worldwide Cancer.**

Londres, 2015

LOEB, K. [et.al] (2000) - Significance of Multiple Mutations in Cancer. “Carcinogenesis” 21 (2000) 379–385.

LUTHER, Brady. [et.al]- **Advances in Radiation Oncology in Lung Cancer.** 2^a Edição, J. Branislav Jeremic Ed. Springer, 2011 ISBN- 978-3-642-19924-0

LYNCH, T. [et.al] (2004) - Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. “The New England Journal of Medicine” 350 (2004) 2129–2139.

MA, S. [et.al] (2007) - Identification and Characterization of Tumorigenic Liver Cancer Stem/Progenitor Cells. “Gastroenterology” 132 (2007) 2542–2556.

MAITANI, Y. [et.al] (2007) - Cationic Liposome (DC-Chol/DOPE = 1:2) and a Modified Ethanol Injection Method to Prepare Liposomes, Increased Gene Expression. “International Journal of Pharmaceutics” 342 (2007) 33–39.

MANTOVANI, A. (2009) - Cancer: Inflaming Metastasis. “Nature” 457 (2009) 36–37.

MARCATO, P. [et.al] (2011) - Aldehyde Dehydrogenase Activity of Breast Cancer Stem Cells Is Primarily Due to Isoform ALDH1A3 and Its Expression Is Predictive of Metastasis. “BioScience” 29 (2011) 263–273.

MARTINEZ, Jesse [et al] – **Molecular Biology of Cancer**, in: Burger’s Medicinal Chemistry and Drug Discovery, D. Abraham, ed 2003 ISBN- 13 978-0-471-27090-4

MAURER, N. [et.al] (2001) - Spontaneous Entrapment of Polynucleotides upon Electrostatic Interaction with Ethanol-Destabilized Cationic Liposomes. “Biophysical Journal” 80 (2001) 2310–2326.

MENDELSON, J. (2001) - The Epidermal Growth Factor Receptor as a Target for Cancer Therapy. “Endocrine-Related Cancer” 8 (2001) 3–9.

MILETTI-GONZÁLEZ, K. [et.al] (2005) - The CD44 Receptor Interacts with P-Glycoprotein to Promote Cell Migration and Invasion in Cancer. “Cancer Research” 65 (2005) 6660–6667.

MILLER, K. [et.al] (2007) - Paclitaxel plus Bevacizumab versus Paclitaxel Alone for Metastatic Breast Cancer. “The New England Journal of Medicine” 357 (2007) 2666–2676.

MILLER, K. [et.al] (2005) - Can Tumor Angiogenesis Be Inhibited without Resistance? “Exs Journal” (2005) 95–112.

MOK, T. [et.al] (2009) - Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. “The New England Journal of Medicine” 361 (2009) 947–957.

MOREIRA, J. [et.al] (2001) - Targeting Stealth Liposomes in a Murine Model of Human Small Cell Lung Cancer. “Biochimica et Biophysica Acta” 1515 (2001) 167–176.

MOREIRA, J. [et.al] (2002) - Use of the Post-Insertion Technique to Insert Peptide Ligands into Pre-Formed Stealth Liposomes with Retention of Binding Activity and Cytotoxicity. "Pharmaceutical Research" 19 (2002) 265–269.

MORRISON, B. [et.al] (2013) - Lung Cancer-Initiating Cells: A Novel Target for Cancer Therapy. "Targeted Oncology" 8 (2013) 159–172.

MOURA, V. [et.al] (2012) - Targeted and Intracellular Triggered Delivery of Therapeutics to Cancer Cells and the Tumor Microenvironment: Impact on the Treatment of Breast Cancer. "Breast Cancer Research and Treatment" 133 (2012) 61–73.

MURRAY, L. [et.al] (2003) - SUI1248 Inhibits Tumor Growth and CSF-1R-Dependent Osteolysis in an Experimental Breast Cancer Bone Metastasis Model. "Clinical and Experimental Metastasis" 20 (2003) 757–766.

NATALE, R. [et.al] (2009) - Vandetanib versus Gefitinib in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Results from a Two-Part, Double-Blind, Randomized Phase II Study. "Journal of Clinical Oncology" 27 (2009) 2523–2529.

NGUYEN, K. [et.al] (2014) - Review of the Current Targeted Therapies for Non Small Cell Lung Cancer. "World Journal of Clinical Oncology" 5 (2014) 576–587.

NOVELLO, S. [et.al] (2009) - Phase II Study of Continuous Daily Sunitinib Dosing in Patients with Previously Treated Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. "British Journal of Cancer" 101 (2009) 1543–1548.

O'BRIEN, J. [et.al] (2000) - Investigation of the Alamar Blue (resazurin) Fluorescent Dye for the Assessment of Mammalian Cell Cytotoxicity. "European Journal of Biochemistry" 267 (2000) 5421–5426.

OSTREM, J. [et.al] (2013) - K-Ras (G12C) Inhibitors Allosterically Control GTP Affinity and Effector Interactions. "Nature" 503 (2013) 548–551.

PÀEZ-RIBES, M. (2009) - Antiangiogenic Therapy Elicits Malignant Progression of Tumors to Increased Local Invasion and Distant Metastasis. "Cancer Cell" 15 (2009) 220–231.

PAEZ, J. [et.al] (2004) - EGFR Mutations in Lung Cancer : Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. "Science" 304 (2004) 1497–1500.

PALIWAL, S. [et.al] (2014) - A Review of Mechanistic Insight and Application of pH-Sensitive Liposomes in Drug Delivery. "Drug Delivery" (2014) 1–12.

PALLIS, A. [et.al] (2009) - Targeted Therapies in the Treatment of Advanced/metastatic NSCLC. "European Journal of Cancer" 45 (2009) 2473–2487.

PALLIS, A. [et.al] (2012) - Targeting Tumor Neovasculature in Non-Small-Cell Lung Cancer. "Critical Reviews in Oncology/Hematology" 86 (2012) 130–142.

PAO, W. [et.al] (2005a) - Acquired Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib Is Associated with a Second Mutation in the EGFR Kinase Domain. "PLoS Medicine" 2 (2005) 225–235.

PAO, W. [et.al] (2005b) - Epidermal Growth Factor Receptor Mutations, Small-Molecule Kinase Inhibitors, and Non-Small-Cell Lung Cancer: Current Knowledge and Future Directions. "Journal of Clinical Oncology" 23 (2005) 2556–2568.

PAPAETIS, G. [et.al] (2007) - Targeted Therapies for Non-Small Cell Lung Cancer. "Current Pharmaceutical Design" 13 (2007) 2810–2831.

PAPAHADJOPOULOS, D. [et.al] (1991) - Sterically Stabilized Liposomes: Improvements in Pharmacokinetics and Antitumor Therapeutic Efficacy. "Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America" 88 (1991) 11460–11464.

PAPAVRAMIDOU, N. [et.al](2010) - Ancient Greek and Greco-Roman Methods in Modern Surgical Treatment of Cancer. "Annals of Surgical Oncology" 17 (2010) 665–667.

PARDAL, R. [et.al] (2003) - Applying the Principles of Stem-Cell Biology to Cancer. "Nature Reviews. Cancer" 3 (2003) 895–902.

PARKIN D, L. [et.al] (1988) - Estimates of the Worldwide Frequency of Sixteen Major Cancers in 1980. "International Journal of Cancer" 41 (1988) 184–197.

PEER, D. [et.al] (2007) - Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy. “Nature Nanotechnology” 2 (2007) 751–760.

PÉREZ-HERRERO, E. [et.al] (2015) - Advanced Targeted Therapies in Cancer: Drug Nanocarriers, the Future of Chemotherapy. “European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics” (2015).

PETRELLI, F. [et.al] (2012) - Efficacy of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients with EGFR-Mutated Nonsmall-Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis of 13 Randomized Trials. “Clinical Lung Cancer” 13 (2012) 107–114.

PORKKA, K. [et.al] (2002) - A Tumor-Homing Peptide with a Targeting Specificity Related to Lymphatic Vessels. “Nature Medicine” 8 (2002) 751–755.

PORTUGAL. Direcção-Geral da Saúde – **Doenças Oncológicas em Números**.
Lisboa: DGS, 2013.

RAMPERSAD, S. (2012) - Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. “Sensors” 12 (2012) 12347–12360.

RICCI-VITIANI, L. [et.al] (2007) - Identification and Expansion of Human Colon-Cancer-Initiating Cells. “Nature” 445 (2007) 111–115.

RUBENSTEIN, J. [et.al] (2000) - Anti-VEGF Antibody Treatment of Glioblastoma Prolongs Survival but Results in Increased Vascular Cooption I. “Neoplasia” 2 (2000) 306–314.

SADER, M. [et.al] (2015) - Nanoparticles Functionalized with Ligands of Cell Surface Nucleolin for Cancer Therapy and Diagnosis. “Journal of Nanomedicine & Nanotechnology” 6 (2015).

SANDLER, A. [et.al] (2006) - Paclitaxel-Carboplatin Alone or with Bevacizumab for Non-Small-Cell Lung Cancer. “The New England Journal of Medicine” 355 (2006) 2542–2550.

SANTOS, A. [et.al] (2010) - Design of Peptide-Targeted Liposomes Containing Nucleic Acids. “Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes” 1798 (2010) 433–441.

SAPRA, P. [et.al] (2003) - Ligand-Targeted Liposomal Anticancer Drugs. "Progress in Lipid Research" 42 (2003) 439–462.

SCAGLIOTTI, G. [et.al] (2012) - Sunitinib plus Erlotinib versus Placebo plus Erlotinib in Patients with Previously Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Phase III Trial. "Journal of Clinical Oncology" 30 (2012) 2070–2078.

SCHILLER, J. [et.al] (2002) - Comparison of Four Chemotherapy Regimens for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. "The New England Journal of Medicine" 346 (2002) 92–98.

SEMPLE, S. [et.al] (2001) - Efficient Encapsulation of Antisense Oligonucleotides in Lipid Vesicles Using Ionizable Aminolipids: Formation of Novel Small Multilamellar Vesicle Structures. "Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes" 1510 (2001) 152–166.

SEYFRIED, T. [et.al] (2010) - Cancer as a Metabolic Disease. "Nutrition & Metabolism" 7 (2010).

SHARMA, S. [et.al] (2007) - Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer. "Nature Reviews. Cancer" 7 (2007) 169–181.

SHETZER, Y. [et.al] (2014) - The Paradigm of Mutant p53-Expressing Cancer Stem Cells and Drug Resistance. "Carcinogenesis" 35 (2014) 1196–1208.

SHOJAEI, F. [et.al] (2007) - Tumor Refractoriness to Anti-VEGF Treatment Is Mediated by CD11b+Gr1+ Myeloid Cells. "Nature Biotechnology" 25 (2007) 911–920.

SIMÕES, S. [et.al] (2004) - On the Formulation of pH-Sensitive Liposomes with Long Circulation Times. "Advanced Drug Delivery Reviews" 56 (2004) 947–965.

SINGH, S. [et.al] (2004) - Identification of Human Brain Tumour Initiating Cells. "Nature" 432 (2004) 396–401.

SINGH, S. [et.al] (2012) - EGFR/Src/Akt Signaling Modulates Sox2 Expression and Self-Renewal of Stem-like Side-Population Cells in Non-Small Cell Lung Cancer. "Molecular Cancer" 11 (2012) 1–15.

- SOFUNI, A. [et.al] (2005) - Differential Diagnosis of Pancreatic Tumors Using Ultrasound Contrast Imaging. "Journal of Gastroenterology" 40 (2005) 518–525.
- SONG, S. [et.al] (2005) - PDGFRbeta+ Perivascular Progenitor Cells in Tumours Regulate Pericyte Differentiation and Vascular Survival. "Nature Cell Biology" 7 (2005) 870–879.
- SUBRAMANIAM, D. [et.al] (2010) - Cancer Stem Cells: A Novel Paradigm for Cancer Prevention and Treatment. "Mini Reviews in Medicinal Chemistry" 10 (2010) 359–371.
- SUGIO, K. [et.al] (2009) - Prospective Phase II Study of Gefitinib in Non-Small Cell Lung Cancer with Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutations. "Lung Cancer" 64 (2009) 314–318.
- SUN, X. [et.al] (2005) - An Assessment of the Effects of Shell Cross-Linked Nanoparticle Size, Core Composition, and Surface PEGylation on in Vivo Biodistribution. "Biomacromolecules" 6 (2005) 2541–2554.
- SUNAGA, N. [et.al] (2007) - Phase II Prospective Study of the Efficacy of Gefitinib for the Treatment of Stage III/IV Non-Small Cell Lung Cancer with EGFR Mutations, Irrespective of Previous Chemotherapy. "Lung Cancer" 56 (2007) 383–389.
- TIRINO, V. [et.al] (2009) - The Role of CD133 in the Identification and Characterisation of Tumour-Initiating Cells in Non-Small-Cell Lung Cancer. "European Journal of Cardio-thoracic Surgery" 36 (2009) 446–453.
- TORCHILIN, V. (2005) - Recent Advances with Liposomes as Pharmaceutical Carriers. "Nature Reviews. Drug discovery" 4 (2005) 145–160.
- TRAVIS, W. [et.al] (2013) - New Pathologic Classification of Lung Cancer: Relevance for Clinical Practice and Clinical Trials. "Journal of Clinical Oncology" 31 (2013) 992–1001.
- VINOGRADOV, S. [et.al] (2012) - Cancer Stem Cells and Drug Resistance: The Potential of Nanomedicine. "Nanomedicine" 7 (2012) 597–615.

VISVADER, J. [et.al] (2008) - Cancer Stem Cells in Solid Tumours: Accumulating Evidence and Unresolved Questions. "Nature Reviews. Cancer" 8 (2008) 755–768.

VISVADER, J. (2011) - Cells of Origin in Cancer. "Nature" 469 (2011) 314–322.

VISVADER, J. [et.al] (2012) - Cancer Stem Cells: Current Status and Evolving Complexities. "Cell Stem Cell" 10 (2012) 717–728.

WANG, A. [et.al] (2012) - Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs. "Annual Review of Medicine" 63 (2012) 185–198.

WANG, J. [et.al] (2014) - Lung Cancer Stem Cells and Implications for Future Therapeutics. "Cell Biochemistry and Biophysics" (2014).

WANG, R. [et.al] (2010) - Glioblastoma Stem-like Cells Give Rise to Tumour Endothelium. "Nature" 468 (2010) 829–833.

WANG, S. [et.al] (2013) - CD133+ Cancer Stem Cells in Lung Cancer. "Frontiers in Bioscience" 18 (2013) 447–453.

WANG, Y. [et.al] (2011) - More than 45% of A549 and H446 Cells Are Cancer Initiating Cells: Evidence from Cloning and Tumorigenic Analyses. "Oncology Reports" 25 (2011) 223–230.

WINKLER, V. [et.al] (2011) - Predicting Lung Cancer Deaths from Smoking Prevalence Data. "Lung Cancer" 74 (2011) 170–177.

WOLFF, J. [et.al] (2001) - Early Concepts of Cancer. "Cancer and Metastasis Reviews" 19 (2001) 205–217.

WU, Y. [et.al] (2009) - CD133 as a Marker for Cancer Stem Cells: Progresses and Concerns. "Stem Cells and Development" 18 (2009) 1127–1134.

YANG, A. [et.al] (2011) - Nucleolin Maintains Embryonic Stem Cell Self-Renewal by Suppression of p53 Protein-Dependent Pathway. "Journal of Biological Chemistry" 286 (2011) 43370–43382.

