

Estratégias Biotecnológicas para a Liberação Controlada de Antígenos e Adjuvantes em Vacinas Através de Lipossomas

Thalita Pedroni FORMARIZ ^{1,2}, Cristina Helena Bruno TERRUGGI ¹, Arnóbio Antonio SILVA-JÚNIOR ¹, Maria Virgínia SCARPA ¹ & Anselmo Gomes de OLIVEIRA ^{1*}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Rodovia Araraquara-Jaú Km 01, 14801-902 Araraquara, SP, Brasil.

² Centro Universitário de Araraquara - UNIARA, Rua Carlos Gomes, 1338, 14801-340 Araraquara, SP, Brasil.

RESUMO. Lipossomas (LP) são sistemas coloidais capazes de compartimentalizar fármacos com o objetivo de melhorar a atividade biológica, diminuir a toxicidade potencial e obter efeito prolongado. Nesse trabalho foi discutido o papel de vários tipos de lipossomas em encapsular moléculas capazes de provocar alguma resposta imunológica (fármacos, antígenos, DNA). O efeito do tipo dos lipossomas e aspectos sobre a formação dos mesmos também foram discutidos. Parâmetros que interferem na liberação dos fármacos a partir da estrutura dos lipossomas foram analisados. A verificação detalhada da literatura mostrou que, dependendo da polaridade das moléculas e da carga superficial das estruturas dos lipossomas o sistema pode ser usado eficientemente para aperfeiçoar o efeito terapêutico por meio do controle da velocidade ou do mecanismo de liberação de fármacos e substâncias imunogênicas.

SUMMARY. "Biotechnological Strategies for Controlled Delivery of Antigens and Vaccines Adjuvant Through Liposomes". Liposomes (LP) are colloidal systems with ability to compartmentalize therapeutic molecules in order to improve biological activity, decreases the potential toxicity, and to obtain prolonged effect. In this work it was discussed the role of the various liposomes types to encapsulate drug molecules able to provoke some immunological response (drugs, antigens and DNA). The effect of the liposomes and the parameters about the formation of the structures are also analyzed. Detailed literature review shows that, depending on the molecules polarity and the superficial charge of the liposome structures, the system may be efficiently used to optimize the therapeutic effects by means of the release control or through a drug delivery mechanism.

INTRODUÇÃO

A resposta imunológica é um dos mais importantes mecanismos adaptativos do organismo, pois permite a sobrevivência em ambientes adversos. A reação do organismo contra os antígenos se processa em duas frentes: a imunidade humoral, mediada por anticorpos; e a imunidade celular, mediada por células.

A interação antígeno-anticorpo ocorre em sítios específicos localizados na molécula do antígeno, denominados determinantes antigênicos ou epítomos. A natureza dessa interação depende da degradabilidade, complexidade, tamanho, acessibilidade e configuração espacial da molécula. Em geral, os antígenos possuem elevada massa molecular (> 10 kDa), porém há compostos chamados haptenos, de baixo peso molecu-

lar que, combinados com proteínas transportadoras, desencadeiam uma resposta imune ¹.

O organismo possui barreiras naturais, inescapáveis, como a da pele (queratina, lipídios e ácidos graxos), a saliva, o ácido clorídrico do estômago, o pH da vagina, a cera do ouvido externo, secreções das mucosas e do trato respiratório, cílios do epitélio respiratório, peristaltismo, flora normal, entre outros ². Se estas barreiras falharem, o sistema imunológico é, então, ativado. Nos tecidos, existem células que liberam substâncias vasoativas capazes de induzir a inflamação, cujo conjunto de alterações que tem como sintomas principais a hiperemia, inchaço, aumento da temperatura local e dor. Essas substâncias atraem células de defesa, como neutrófilos e macrófagos, para a área afetada. A va-

PALAVRAS-CHAVE: Imunologia, Liberação prolongada, Lipossomas.

KEY WORDS: Controlled release, Immunology, Liposomes.

* Autor a quem enviar a correspondência *E-mail*: oliveiag@fcfar.unesp.br

sodilatação aumenta a temperatura local, estimulando a migração de células de defesa. Algumas das substâncias liberadas no local da inflamação podem alcançar o centro termorregulador localizado no hipotálamo, originando a febre. Por diapedese, neutrófilos e monócitos são atraídos até o local da inflamação, passando a fagocitar os agentes invasores. A diapedese e a fagocitose fazem dos neutrófilos a linha de defesa do organismo no combate às infecções ². A inflamação determina o acúmulo de fibrina, que envolve o agente invasor ². Caso essa resposta inflamatória não seja eficaz, o sistema imunológico passa a depender de mecanismos mais específicos e sofisticados, dos quais tomam parte vários tipos de células, sendo chamado de resposta imune específica ³.

A resposta imune específica, como a produção de anticorpos contra determinado agente infeccioso, é conhecida como resposta imune adaptativa humoral e celular. A resposta imune celular é realizada pelos linfócitos T e consiste na destruição de células que apresentam moléculas estranhas em sua superfície, incluindo bactérias, células tumorais e células infectadas por vírus ³. A resposta imune humoral depende de glicoproteínas circulantes (imunoglobulinas - Ig) e de outras substâncias chamadas anticorpos. Estas moléculas neutralizam substâncias estranhas e auxiliam na destruição de células invasoras. Os linfócitos B participam deste tipo de resposta, produzindo as imunoglobulinas. Ambas as respostas podem ocorrer juntas. Tanto o linfócito T como o B são originados a partir de células-tronco hematopoéticas, que se diferenciam em linfócitos. Em seguida, os linfócitos formados passam por diferenciação, sendo que os linfócitos T completam a sua maturação no timo, sendo responsáveis pela imunidade celular, e os linfócitos B, destinados a produzir anticorpos, são responsáveis pela imunidade humoral ⁴.

Na resposta humoral, o antígeno é apresentado aos linfócitos T auxiliares e estes induzem a ativação dos linfócitos B, que se transformam em plasmócitos, passando a secretar anticorpos específicos para o antígeno (imunoglobulinas). Estes anticorpos reconhecem e osonizam o antígeno, que então é reconhecido e fagocitado pelos macrófagos ou PMN (neutrófilos polimorfonucleares). Neste tipo de resposta, a apresentação do antígeno aos linfócitos dispensa a presença das células apresentadoras de antígenos (APCs) ⁵.

Na imunidade celular, a indução de uma resposta contra um antígeno protéico envolve a in-

teração do antígeno com as APCs, que degradam parcialmente o antígeno. Baseada nas interações entre os diferentes tipos de moléculas (classe I ou II) do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e as APCs, os antígenos protéicos podem ser processados e apresentados pelas classes I ou II do MHC. Estas moléculas das classes I e II são proteínas de membrana altamente polimórficas, que se ligam e transportam fragmentos de peptídeos ou proteínas inteiras para a superfície das APCs. O complexo MHC-peptídeo interage com os linfócitos T CD8⁺ ou CD4⁺. As proteínas endógenas da célula são apresentadas via classe I do MHC enquanto que os antígenos exógenos não podem ser apresentados por esta classe por não conseguirem atingir o citosol celular. Assim sendo, a maioria dos antígenos solúveis, por serem processados e apresentados pelas moléculas de classe II do MHC, desencadeiam resposta imunológica muito ruim de linfócitos T citotóxicos restritos ao complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe I, a menos que eles sejam introduzidos artificialmente no citoplasma através da associação covalente ou não-covalente com carreadores lipídicos, conjugados com esferas de látex ou encapsulados em lipossomas ⁵.

O sucesso dos lipossomas como vetores imunológicos foi primeiramente atribuído à sua capacidade de sequestrar antígenos e liberá-los lentamente. Os lipossomas também se assemelham as estruturas que o sistema imunológico modifica para proteger-se contra vírus, bactéria e outros microrganismos. A eficiência da vacinação com lipossomas também depende da sua semelhança, promovendo a interação das APCs e a conversão do antígeno lipossomal em estruturas que estimulem os linfócitos T. Além disso, a incorporação de agentes imunogênicos na superfície dos lipossomas permite uma indução mais intensa das respostas CTL (linfócitos T citotóxicos) ⁶.

Os macrófagos são as principais APCs responsáveis pelo processamento e apresentação de partículas de antígeno, incluindo os antígenos lipossomais. As células dendríticas também estão envolvidas na indução das respostas CTL pelos antígenos encapsulados em lipossomas.

Com o avanço da biologia molecular e dos estudos da terapia gênica, as pesquisas envolvendo a utilização dos lipossomas como carreadores de antígenos foram intensificadas ^{7,8}. Com o mapeamento do genoma humano, aproximadamente 10.000 fenótipos variantes já são conhecidos, e a maioria destes são desencadeado-

res de doenças incuráveis. Diante disso, a aplicação clínica da terapia gênica pode tornar-se uma ferramenta estratégica no processo de cura das desordens de origem genética. A terapia gênica pode ser definida como sendo um procedimento terapêutico em que seqüências nucleotídicas são introduzidas ou modificadas em células ou tecidos humanos. Geralmente estas seqüências nucleotídicas introduzidas são moléculas de cDNA de genes normais que irão repor a funcionalidade de genes correspondentes que se encontram alterados nas células ou tecidos submetidos ao tratamento ⁹. Vários experimentos baseados na tecnologia da transferência gênica já estão sendo realizados com a aplicação de vacinas de imunização gênica ¹⁰. A imunização gênica mimetiza uma infecção natural do organismo, com a apresentação antigênica via moléculas do MHC das classes I e II, com ativação dos linfócitos T CD4+, CD8+ e produção de anticorpos ^{11,12}.

Dentre as desordens investigadas estão a deficiência da desaminase da adenosina, fibrose cística, hemofilia, doença de Gaucher entre outras. Estudos pré-clínicos envolvendo a terapia gênica no combate as doenças autoimunes ¹³, alergias ¹⁴ e na regeneração de tecidos e de transplantes celulares ^{15,16} têm sido descritos. A tecnologia de transferência gênica já é utilizada no estudo e na produção de vacinas contra várias doenças infecciosas, tais como a AIDS, malária ^{17,18}, esquistossomose, leishmaniose, tuberculose ¹², hepatite A, B e C ¹⁹, *influenza*, *Yersinia pestis*, *La crosse* e *ebóla* ²⁰.

Para que a terapia gênica tenha sucesso, é necessário que a introdução do gene reparador produza uma proteína "terapêutica" que corrija a alteração no tempo estimado, na concentração e local corretos. Os vetores virais utilizados na transferência gênica são primeiramente inativados quanto a sua capacidade de replicação, conservando apenas a sua capacidade de infecção, mas mesmo assim, podendo provocar efeitos indesejáveis como a ativação oncogênica por mutagênese de inserção, levando a doenças auto-imunes e câncer. Além disso, os vírus são incapazes de abrigar moléculas grandes de DNA exógeno (plasmídeos contendo gene terapêutico ou fragmentos de DNA).

Os lipossomas têm sido uma alternativa para o transporte destas moléculas grandes. Este sistema permite, por exemplo, aplicar a estratégia do RNA-antisense que promove uma "*down-regulation*" ou mesmo a supressão de certos genes "doentes" ²¹. Entretanto, a eficiência da

transferência gênica quando se utiliza os lipossomas é menor se comparada com a transferência gênica obtida pelos vetores virais, daí a necessidade das modificações na estrutura dos lipossomas com o intuito de aperfeiçoar a transferência gênica.

LIPOSSOMAS

Substâncias farmacologicamente ativas, como por exemplo, fármacos, antígenos e DNA quando veiculadas em formas farmacêuticas convencionais, geralmente não conseguem atingir concentração apreciável no tecido alvo no organismo, porque entre o local de aplicação e as células se interpõem uma série de barreiras físicas, químicas e biológicas que sempre contraria a obtenção do efeito desejado, na maioria das vezes sendo o reflexo da dificuldade dessas substâncias em transpor essas barreiras. Assim, os genes, proteínas e antígenos não conseguem ser reconhecidos de maneira efetiva e se ligar à célula alvo diminuindo a resposta imune fazendo dessas substâncias ideais candidatas para a tecnologia de direcionamento ^{22,23}.

Vacinas e oligonucleotídeos "antisense" têm sido encapsulados em lipossomas (Fig. 1) na tentativa de direcionar o fármaco para o citoplasma e núcleo das células alvo. O uso dos lipossomas com essa finalidade foi dificultado, inicialmente, pelo fato de que os lipossomas são rapidamente removidos da corrente circulatória e intensamente capturados no fígado pelos macrófagos ^{24,25}. No final dos anos 1980 e início de 90, foi amplamente demonstrando que a presença de ligantes na superfície dos lipossomas, como cadeias polioxietileno, diminuía parcialmente a remoção dos lipossomas, prevenindo a captura no fígado e no baço, quando eles eram injetados via endovenosa ²⁴⁻²⁷. A remoção desses lipossomas da corrente circulatória depende do tamanho, carga de superfície e estabilidade. Em geral, os lipossomas grandes não modificados são removidos mais rapidamente que os lipossomas pequenos, neutros ou positivamente carregados.

A captura reduzida desses lipossomas, estericamente impedidos, contendo cadeias de polietilenoglicol na superfície, é devido à redução da opsonização das estruturas pelas proteínas plasmáticas, tornando possível que eles escapem do reconhecimento pelo fígado e pelo baço ²⁸⁻³⁰, o que proporciona maior tempo de circulação. Além disso, a reduzida agregação desses lipossomas no sangue também é responsável pelo aumento do tempo de circulação ³⁰⁻³². Liposso-

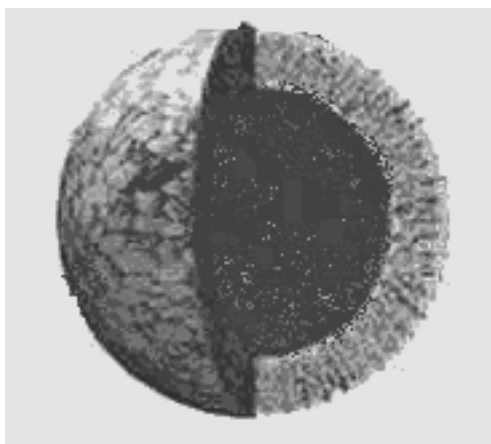


Figura 1. Lipossoma convencional.

mas estéricamente impedidos ou lipossomas furtivos possuem cerca de 100 nm de diâmetro e quando administrados por via endovenosa são direcionados passivamente para o citoplasma das células alvo ^{30,32} no interior do espaço extracelular.

Os imunolipossomas aumentam o acúmulo de fármacos nos tecidos e órgão alvos. Uma vez que esses lipossomas apresentam em sua superfície marcadores que aumentam capacidade de reconhecimento e ligação das estruturas com as células de interesse. Imunoglobulinas (Ig) das classes da IgG são amplamente utilizadas para o direcionamento de fármacos imunotativos visto que as mesmas não afetam a integridade do lipossoma ou as propriedades dos anticorpos. Os anticorpos podem se ligar na superfície do lipossoma por ligação covalente ou por incorporação do tipo hidrofóbica na bicamada lipídica, obtendo-se assim o controle de liberação ²³⁻²⁵.

A literatura mostra que os lipossomas catiônicos são os mais utilizados em imunologia, constituindo o método físico mais frequentemente utilizado de transferência genética. Geralmente a estrutura envolve um composto anfifílico positivamente carregado como, por exemplo, cloreto de [2,3-bis (oleoil) propil] trimetilamônio (DOTMA); 2,3-di-oleoyloxy-N-[(spermincarboxamino)etil]-N,N dimetil-1- propanamínium (DOSPA); ou o cloreto de N-(hidroxietil) N-ditetradeciloxipropanol) N,N - dimetilamônio (DMRIE) associados a um lipídio auxiliar formalmente neutro, sendo o dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) o mais comumente utilizado. Os lípidos catiônicos interagem eletrostaticamente com a molécula aniônica do DNA, promovendo a encapsulação do ácido nucleico. Os lipossomas assim produzidos possuem um amplo espectro de infectividade celular ³⁴⁻³⁶.

O complexo DNA-lipossoma, com carga externa positiva, liga-se mais facilmente à superfície celular com carga negativa por efeito eletrostático e é interiorizado em um endossoma. Intracelularmente, o endossoma é desestabilizado pelo fato dos lipossomas liberarem DNA para fins de transcrição (Fig. 2). As vantagens da utilização de lipossomas na terapia genética são a relativa simplicidade da tecnologia, a capacidade de submeter a transfecção a uma ampla variedade de células tumorais *in vitro*, e o baixo potencial de reações imunológicas e de contaminação do vírus auxiliador. Entre as desvantagens, encontra-se a eficiência de transfecção variável, toxicidade direta dos lipossomas sobre as células alvo e baixa eficiência de transfecção ³⁷.

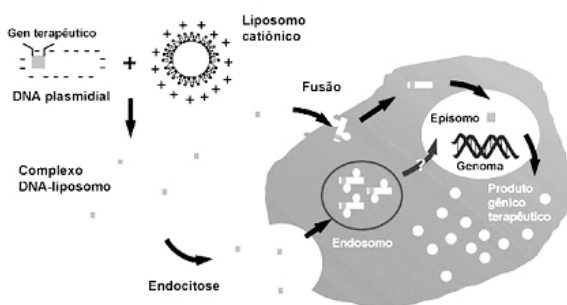


Figura 2. Os complexos formados entre lípidos ou fosfolípidos e DNA constituem lipossomas ³⁷.

Importantes abordagens na transferência genética mediada por lipossomas em estudos sobre terapia genética contra o câncer. Os lipossomas foram testados na transferência de genes da citocina para células tumorais *in vitro* como terapia com vacina de tumor geneticamente modificado contra o melanoma metastático ^{38,39}. Também foram utilizados para transferir o gene HLA-B7 para nódulos tumorais de melanoma *in vivo* através da injeção direta de DNA complexado com lipossomas. A transferência, mediada por lipossomas, do gene IL-2 para células tumorais *in vitro* com o objetivo de desenvolver uma vacina de células tumorais geneticamente modificadas prolonga a sobrevivência num modelo de camundongo de câncer de bexiga ³⁹. A literatura relata, também, a transferência, mediada por lipossomas, de genes supressores de tumores para o epitélio de células de transição de camundongos. Entretanto, a eficácia da transferência genética foi baixa e variável, possivelmente devido à presença de glicoproteínas revestindo o epitélio das células de transição. Os glicoproteínas são inibidores importantes da transferência genética mediada por lipossomas.

Dessa maneira, tentou-se melhorar a transferência genética no epitélio de células de transição *in vivo*, removendo a camada de glicoaminoglicanas mediante técnicas químicas, mas com pouco sucesso ³⁷.

O transporte e cedência intracelular de genes e oligonucleotídeos são, atualmente, considerados como uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento do cancro, doenças infecciosas e doenças congênitas, uma vez que as terapias convencionais revelam-se pouco eficazes ⁴⁰. Contudo, a incorporação de diestearoilfosfatidiletanolamina - polietilenoglicol (DSPE-PEG) na bicamada de lipossomas sensíveis ao pH, contendo por DOPE e hemissuccinato de colesterol (CHEMS), resulta na estabilização estérica dos lipossomas, permitindo que eles permaneçam maior tempo na circulação sanguínea e proporcionando um padrão de distribuição característico dos lipossomas do tipo “*stealth*®”, diferente dos lipossomas convencionais. Adicionalmente, demonstrou-se que os lipossomas “*stealth*” sensíveis ao pH são, particularmente, eficazes em mediar a cedência intracelular de substâncias presentes em seus conteúdos aquosos, comparativamente aos lipossomas não sensíveis ao pH. O potencial dos lipossomas sensíveis ao pH, estabilizados ou não estericamente, para o transporte e direcionamento intracelular de material genético ficou bem demonstrado através da potenciação do efeito anti-HIV-1 de oligonucleotídeos “*antisense*”, observado em macrófagos humanos infectados com o vírus, quando encapsulados em lipossomas ⁴¹. Além disso, esses lipossomas são capazes de proteger os fragmentos de DNA da ação de enzimas destrutivas presentes nos fluidos biológicos ⁴².

Proteínas solúveis encapsuladas em lipossomas pH-sensíveis podem desencadear forte resposta primária de linfócitos T citotóxicos (CTL). Este tipo de lipossoma é formado principalmente por DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamina) e de um anfifílico ácido. Em vesículas ácidas, tais como os endossomos, o anfifílico estrutural ácido do lipossomas é protonado, o que leva à desestabilização dos lipossomas e liberação do antígeno encapsulado ou à fusão com a membrana celular ¹⁷.

Lipossomas WRAIR (Walter Reed liposomes) constitui um veículo eficiente para o direcionamento de proteínas e peptídeos como as APCs via moléculas da classe I do MHC. Além do DMPC (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina), DMPG (2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilglicerol e CHOL (colesterol), o lipossoma

WRAIR contém o lipídio A ou o seu derivado monofosforil (MLP), funcionando como um adjuvante intrínseco. O lipídeo A é frequentemente requerido como um adjuvante para a indução dos CTLs contra os antígenos lipossomais. Este adjuvante induz forte resposta inflamatória com predominância de macrófagos contendo material lipídico fagocitado e devido a isso é utilizado com sucesso na proteína recombinante da malária, pois apresenta uma excelente indução de resposta aos CTLs ¹⁷.

O outro tipo de lipossoma que tem sido utilizado na área de imunologia é o lipossoma imunomagnético o qual libera a substância ativa através da ação de um campo magnético. Esse tipo de lipossoma é composto por fármaco e material magnético, geralmente o ferro, como por exemplo, o óxido de ferro que vai se localizar no compartimento aquoso do lipossoma ^{23,43}. A vantagem é o aumento da concentração local de fármaco na célula alvo, resultando numa melhoria significativa da eficácia terapêutica ^{23,44,45}. Esta técnica, não invasiva, pode proporcionar o controle de problemas de toxicidade, e permitir a monitoração e vetorização de substâncias. Entre as desvantagens, encontram-se o elevado custo do sensor magnético e do ambiente blindado visto que a interferência de ruído ambiental influencia na eficácia terapêutica ⁴⁶.

Atualmente, lipossomas fusogênicos também tem sido atrativos para no desenvolvimento de vacinas, principalmente para a tuberculose, hepatite B e terapia genética. O método mais frequentemente utilizado para a transferência genética, geralmente envolve um lipossoma convencional e o *Sendai vírus*, inativado, que contém glicoproteínas em sua membrana, como por exemplo as proteínas F e HANA (hemaglutinina e a neuramidase). A bicamada do lipossoma convencional funde-se com o *Sendai vírus*. O complexo lipossoma-vírus liga-se na membrana celular através da proteína de superfície (HANA), em seguida funde-se com a célula através da proteína F e ocorre a desestabilização do complexo liberando o seu conteúdo dentro do citoplasma celular. Esse tipo de lipossoma pode veicular oligonucleotídeos, peptídeos, materiais genéticos e antígenos ^{47,48} contendo todas essas substâncias.

A literatura mostra a aplicação *in vivo* do lipossoma fusogênico que pode encapsular proteínas antigênicas e ser utilizado como vacina, pois a proteína sendo liberada somente no citoplasma pode induzir resposta humoral e celular ⁴⁷. Des-

sa maneira, Kita e colaboradores¹² desenvolveram duas vacinas gênicas contra a tuberculose humana, utilizando em uma delas a tecnologia do lipossoma fusogênico. Os resultados preliminares mostraram que as vacinas induziram resposta imunológica 100 vezes maior do que a vacina convencional. Tanto a mucosa oral como a nasal produzem grande quantidade de IgA, e a produção de vacinas contendo antígenos na forma lipossomal para administração oral ou nasal foi investigada, uma vez que a presença de IgA em altas concentrações induz resposta imune humoral e celular eficientes⁵¹. A eficiência da transfecção foi aperfeiçoada com a utilização deste tipo de estrutura⁵².

Neste contexto, lipossomas fusogênicos podem ser utilizados na liberação de macromoléculas (polissacarídeos, proteínas, DNA, entre outras) em células de mamíferos⁴⁷. O lipossoma fusogênico é formado pela fusão de um lipossoma convencional já com a macromolécula incorporada no vírus *Sendai* inativado. Este vírus pertence ao gênero *paramyxoviridae* e tem como característica de interesse a capacidade de fundir-se com a membrana do lipossomal e com membranas celulares⁵³. Após a fusão com o lipossoma convencional, o lipossoma fusogênico introduz o conteúdo lipossomal no citoplasma celular⁴⁷.

A técnica de preparação do lipossoma fusogênico baseia-se na desidratação-reidratação. Após a reidratação ocorre a fusão da bicamada do lipossoma com o *Sendai virus* em pH neutro por 2 h a 37 °C. Em seguida, faz-se a purificação através da centrifugação do gradiente de sucrose a 77.000 x g por 2 h à 4 °C com a finalidade de retirar o resto da capa protéica ficando somente a proteína de ligação e de fusão. O tamanho final dos lipossomas fusogênicos obtidos pela técnica de espalhamento de luz ("*light scattering*") é na faixa de 380nm. A vantagem dessa técnica é o aumento da eficiência de antígenos e, portanto a melhora da resposta imunológica. As desvantagens são o elevado custo e a dificuldade na técnica de preparo^{47,48}.

Outra técnica atualmente utilizada na área de imunologia é a microencapsulação de lipossomas (MCV) a qual permite reprodutibilidade, formação de estruturas homogêneas e aumento na eficiência de encapsulação de antígenos, peptídeos e proteínas hidrofóbicas. O método de preparação consiste na obtenção de uma emulsão A/O misturando-se a fase oleosa que são o fosfolípido (geralmente lecitinas), o solvente orgânico (geralmente clorofórmio) e a fa-

se aquosa (água), com homogeneização por agitação a 7000 rpm por 10min. Em seguida, adiciona-se mais água na emulsão A/O homogeneiza-se a 450 rpm, a 45 °C e obtém-se a emulsão múltipla A/O/A. A homogeneização é mantida até evaporação total do solvente, com formação da bicamada lipídica e obtendo os lipossomas em suspensão⁴⁹.

Estudos têm apontado novas e práticas formas de utilização dos lipossomas como transportadores de substâncias terapêuticas. Transportadores coloidais como os lipossomas, podem ser utilizados para proteger uma substância da degradação enzimática, como por exemplo, a insulina. Fórmulas lipossomais contendo anti-inflamatórios não-esteróides foram testadas como alternativa para prevenir a toxicidade gastrointestinal desses fármacos em decorrência da administração oral^{34, 54-56}. Jacquet e colaboradores³⁶ demonstraram que a vacinação com o antígeno recombinante ProDerp p, obtido do *Dermatophagoides pteronyssinus* (conhecido agente causador da asma encontrada na poeira doméstica) e complexado aos lipossomas catiônicos previne a resposta alérgica em camundongos. Janssen e colaboradores⁵⁰ mostraram que peptídeos contendo a seqüência adesiva RGD (Arg-Gly-Asp), que possuem afinidade pela integrina $\alpha_v\beta_3$, acoplados a lipossomas-PEG (polietilenoglicol) possuem forte afinidade por células tumorais endoteliais *in vitro*. Estudos *in vivo* mostraram que os lipossomas-PEG-RGD ligam-se à superfície das células tumorais endoteliais de maneira específica, resultado esse promissor para fármacos que possam ser incorporados a este tipo de lipossoma e direcionados ao alvo específico.

Gowdak *et al.*⁵⁷ descreveram a utilização de lipossomas catiônicos como vetores na transfecção gênica em substituição aos vetores virais, evitando assim, possíveis efeitos devido ao uso de vetores virais (indução de mutagênese associada aos retrovírus, perda da integração dentro do genoma do hospedeiro, resposta imunológica desencadeada pela exposição a um vetor adenoviral). Avaliaram também a eficiência da terapia gênica utilizando lipossomas catiônicos acoplados ao cDNA VEGF₁₆₅, codificador para o VEGF (Fator de Crescimento de Endotélio de Vaso), na indução da angiogênese e aumento do fluxo sanguíneo para restabelecer a perfusão tecidual do músculo esquelético nos membros isquêmicos de coelhas. A administração intramuscular de VEGF₁₆₅ complexado com o lipossoma catiônico acelerou de maneira significativa

a perfusão tecidual promovendo angiogênese tardia no tecido isquêmico. O uso do gama-interferon concentrado e encapsulado em lipossomas para uso tópico foi utilizado em ensaios clínicos para tratamento do herpes cutâneo ³⁴, da mesma forma que vacinas gênicas contra a hepatite B também formuladas como lipossomas para uso tópico, sendo que os resultados obtidos até o momento mostram que a eficiência da vacina tópica é a mesma que a da administrada por via intramuscular ¹⁹.

CONCLUSÕES

O futuro dos lipossomas na biotecnologia para liberação controlada de fármacos na área de imunologia parece ser promissor. O estudo de vacinas contendo antígenos encapsulados em lipossomas, abriu a possibilidade do desencadeamento de respostas imunológicas com produção de anticorpos específicos e com níveis de resposta adequados com apenas uma única dose injetável, a qual seria equivalente ao uso de várias doses, em razão da liberação lenta e/ou programada dos antígenos. Esforços para aumentar o índice terapêutico dessas moléculas têm sido substancialmente direcionados no sentido do desenvolvimento de sistemas de liberação específicos para cada caso. A iotecnologia dos lipossomas tem proporcionado amplas oportunidades para novas formulações e sistemas de liberação para grande variedade de substâncias difíceis de formular, tais como genes, RNA, peptídeos, proteínas, entre outros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Nossal, G.J. (1987) *New England J. Med.* **316**: 1320-25.
- Borgans, J.A.M, A.J. Noest, & R.J. De Boer (1999) *J. Immunology* **163**: 569-75.
- Heather, L.D. (1999) *Monte Sinai J. Med.* **66**: 84-90.
- Abbas, A.K. & C.A. Janeway (2000) *Cell.* **100**: 129-38.
- Germain, R. N. & D.H Margoulies (1993) *Ann. Rev. Immunology* **11**: 403-50.
- Santos, N.C. & M.A.R.B. Castanho (2002) *Quím. Nova.* **25**: 1181-85.
- Lasic, D.& D. Papahadjopoulos (1995) *Sci.* **267**: 1275-6.
- Lasic, D.D. (1998) *Trends Biotech.* **16**: 307_21.
- Frézard, F. (1999) *Braz. J. Medical and Biol. Res.* **32**: 181-89.
- Otto, G., M. ingh, J. Kazzaz, M. Briones, E. Sosenawan, M. Uggozzoli & D.T. O'Hagan (2002) *J. Control. Rel.* **79**: 1-5.
- Haanen, J.B., M.C. Wolkers, A.M. Kruisbeek, & T.N. Schumacher (1999) *J. Exp. Med.* **190**: 1319-28.
- Kita, Y., T. Tanaka, S. Yoshida, N. Ohara, Y. Kaneda, S. Kuwayama, Y. Muraki, N. Kanamuru, S. Hashimoto, H. Takai, C. Okada, Y. Fukunaga, Y. Sakaguchi, I. Furukawa, K. Yamada, Y. Inoque, Y. Takemoto, M. Naito, T. Yamada, M. Matsumoto, D.N. McMurray, E.C. De la Cruz, E.V. Tan, R.M. Abalos, J.A. Burgos, R.Gelber, Y. Skeiky, S. Reed, M. Sakatani & M. Okada (2005) *Vaccine* **23**: 2132-5.
- Tillan-Capo, J. I., X. Perez-Gutierrez & C. Carrillo-Dominguez (2004) *Rev. Cubana Farm.* **38**: 1.
- Cabral, E.C.M., R.L. Zollner & M.H. Santana (2002) *First Braz. Winter School on Nanobio-tech.-Rede Nanobiotech.* **1**: 171-2.
- Honey, K., S.P. Cobbold & H. Waldmann (1999) *J. Immunology* **163**: 4805-10.
- Ohmori, K., S. Takeda, S. Miyoshi, M. Minami, S. Nakane, M. Ohta, Y. Sawa, & H. Matsuda (2005) *Eur. J. Cardio-Thoracic Surgery* **27**: 768-73.
- Richards, R.L., M. Rao, N.M. Wassef, G.M. Glenn, S.W. Rothwell & C.R. Alving (1998) *Inf. Immunity.* **66**: 2859-65.
- Rodrigues, M.M., S.B. Boscardin, J.R. Vasconcelos, M.I. Hiyane, G. Salay & I.S. Soares (2003) *Anais Acad. Bras. Ciências* **75**: 443-68.
- Vyas, S.P., R.P. Sing., S. Jain, V. Mishra, S. Mahor, P. Singh, P.N. Gupta, A. Rawat & P. Dubey (2005) *Int. J. Pharm.* **296**: 80-6.
- Bramwell, V. W., J.E. Eyles & O.H Alpar (2005) *Adv. Drug Del. Rev.* **57**: 1247-65.
- Weyermann, J., D. Lochmann & A. Zimmer (2004) *J. Control. Rel.* **100**: 411-23.
- Torchilin, V.P. (1985) *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1**: 65-115.
- Torchilin, V.P.T. (2005) *Nature Rev.* **4**: 145-60.
- Klibanov, A.L., K. Maruyama, V.P. Torchilin & L. Huang (1990) *FEBS Lett.* **268**: 235-7.
- Blume, G. & G. Cevc (1993) *Biochim. Biophys. Acta.* **1146**: 157-68.
- Maruyama, K., Yuda, T., Okamoto, A., Ishikura, C., Kojima, S. & M. Iwatsuru (1991) *Chem. Pharm. Bul.* **39**: 1620-2.
- Gabizon, A. & D. Papahadjopoulos (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1103**: 94-100.
- Senior, J., C. Delgado, D. Fisher, C. Tilcock & G. Gregoriadis (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1062**: 77-82.
- Allen, T.M. (1994) *TI/Pharmacol. Sci.* **15**: 215-20.
- Fomariz, T.P., B.J.Wanczinski, A.A. Júnior-Silva, M.V. Scarpa & A.G. Oliveira (2004) *Infar-ma* **16**: 44-57.
- Iga K., K. Ohkouchi, Y. Ogawa & H. Toguchi (1994) *J. Drug Target* **2**: 259-67.

32. Ahl, P.L., S.K. Bhatia, P. Meers, P. Roberts, R. Stevens & R. Dause (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1329**: 370-82.
33. Huang, S.K., D. Leek, K. Hong & D.S. Friend (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **52**: 5135-43.
34. Barrat, G.M. (2000) *Pharm. Sci. & Tech. Today* **3**: 163-71.
35. Pedrosa de Lima, M.C., S. Simoes, P. Pires, H. Faneca & N. Duzgunes (2001) *Adv Drug Deliv Rev.* **47**: 277-94.
36. Jacquet, A., J.F. Vanderschrick, M. Vandendrienen, A. Elouahabi, M. Magi, L. Garcia & J.M. Ruyschaert (2005) *Mol. Therapy* **11**: 960-8.
37. Silva, T.A (2000) *Terapia gênica, a medicina do ano 2000* (<http://www.ufv.br/dbg/trab2002/TERAPIAG/TRG001.htm> - acesso em 01.02.2006).
38. Verma, I.M. & N. Somia (1997) *Nature* **389**:239-42.
39. Mountain, A. (2000) *Trends Biotechnol.* **18**: 119-28.
40. Lima, M.C.P (2005) *Terapia genética: cancro e doenças neurodegenerativas* (http://www.cienciaviva.pt/healthXXI/topics.asp?lang=pt&acao=cnc4_doc_pt - acesso em 01.02.2006).
41. Simões, S.P.M. (1999) “*O uso de lipossomas fusogênicos em terapia gênica*”. Tese (Doutorado) - Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, f.196.
42. Oliveira, M. C., C. Dubernet, M. Paternostre, E. Fattal, P. Couvreur & M. Ollivon (2001) *Stp Pharm. Sci.* **11**: 103-7.
43. Elmi, M.M. & M.N Sarbolouki (2001) *Int. J. Pharm.* **215**: 45-50.
44. Kubo, T., T. Sugita, S. Shimose, Y. Nitta, Y. Ikuta & T. Murakami (2001) *Int. J. Oncol.* **18**: 121-5.
45. Nobuto, H., T. Sugita, T. Kubo, S. Shimose, Y. Yasunaga, T. Murakami & M. Ochi (2004) *Int. J. Cancer* **109**: 627-35.
46. Cora, L.A (2004) “*Formas farmacêuticas mag-néticas avaliadas no trato gastrointestinal humano por biosusceptometria AC*”. 2004. Dissertação (Mestrado) - UNESP - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, f. 117.
47. Kunisawa, J., T. Masuda, K. Katayama, T. Yosshikawa, Y. Tsutsumi, M. Akasshi, T. Mayumit & S. Nakagawa (2005) *J. Control. Rel.* **105**: 344-53.
48. Kunisawa, J., T. Nakanishi, I. Takahashi, A. Okudaira, Y. Tsutsumi, K. Katayama, S. Nakagawa, H. Kiyono & T. Mayumi (2001) *J. Immunology* **167**: 1406-12.
49. Nii, T. & F. Ishii (2005) *Int. J. Pharm.* **298**: 198-205.
50. Janssen, A.P.C.A., R.M. Schiffelers, T.L.M. Ten Hagen, G.A. Koning, A.J. Scraa, R.J. Kok, G. Storm & G. Molema (2003) *Int. J. Pharm.* **254**: 55-8.
51. Ogra, P.L., H. Faden & R.C. Welliver (2001) *Clin. Microbiol. Rev.* **14**: 430-45.
52. Romano, G., P. Micheli, C. Pacilio & A. Giordano (2000) *Stem Cells* **18**: 19-39.
53. Nakanishi, T., A. Hayashi, J. Kunisawa, Y. Tsutsumi, K. Tanaka, Y. Yashiro-Ohtatani, M. Nakanishi, H. Fujiwara, T. Hamaoka & T. Mayumi (2000) *Eur. J. Immunology.* **30**: 1740-7.
55. Lima, E.M. & A.G. Oliveira (2002) *Drug Dev. Ind. Pharm.* **28**: 673-80.
56. Lima, E.M., L.B. Lopes, M.V. Scarpa, & A.G. Oliveira (2001) *Rev. Ciênc. Farm.* **22**: 281-94.
57. Canto, G.S., S. Dalmora & A.G. Oliveira (1999) *Drug Dev. Ind. Pharm.* **25**: 1235-39.
54. Gowdak, L.H., L. Polliakova, Z. Li, R. Grove, E.G. Lakatta & M. Talan (2000) *J. Vasc. Surgery* **32**: 343-52.