

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS
COM A SUPERFÍCIE MODIFICADA COM
GANGLIOSÍDIOS PARA USO EM IMUNOTERAPIA**

Eng. Maria Helena Ambrosio Zanin

Autora

Profª Drª Maria Helena Andrade Santana

Orientadora

Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

Co-orientador

**Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como
parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em
Engenharia Química.**

Campinas - SP

Outubro de 2001

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

UNICAMP
 Nº CHAM: T/UNICAMP
 E 16p
 V _____
 TOMO: 48 081
 PROC: 16-837-2
 PREC: RB 11,00
 DATA: 11-04-02
 Nº CPO _____

CM00165796-6

016 ID 235706

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

Z16p Zanin, Maria Helena Ambrosio
 Preparação e caracterização de lipossomas com a superfície modificada com gangliosídios para uso em imunoterapia / Maria Helena Ambrosio Zanin. -Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientadores: Maria Helena Andrade Santana; Ricardo de Lima Zollner.
 Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Lipossomos. 2. Imunoterapia. 3. Biotecnologia. I. Santana, Maria Helena Andrade. II. Zollner, Ricardo de Lima. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Tese de doutorado defendida por Maria Helena Ambrosio Zanin e aprovada em 30 de Novembro de 2001 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Profª Drª Maria Helena Andrade Santana – Orientadora



Profª Drª Eneida de Paula (titular)



Profª Drª Iris L. Torriani (titular)



Profª Drª Maria Helena Bueno da Costa (titular)



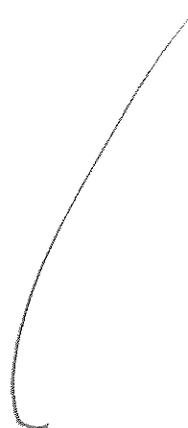
Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine (titular)

51.94.100000

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química.



Profª Drª Maria Helena Andrade Santana – Orientadora



A Deus

**Ao meu querido esposo Antônio Carlos
e à pequena que em breve vai nascer...**

AGRADECIMENTOS

À amiga e orientadora, Prof^a Dr^a Maria Helena Andrade Santana, pelo apoio, incentivo, compreensão, paciência, confiança e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner pela co-orientação neste trabalho.

Aos amigos: Elaine, Giuliana, Carla, Samantha e Paulo Hennies.

A todos os meus colegas do DPB: Fernanda, Salah, Cristiane, Líbia, Vinícius, Elcimar e Gilson.

Ao Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana pela utilização do seu laboratório.

À Conceição, Gláucia, Daniela, Maira e Margarida do Lab. de Imunologia Clínica, FCM, pela grande ajuda nos trabalhos com os camundongos, muitíssimo obrigada.

À Prof^a Dr^a Iris L. Torriani do Instituto de Física pelo apoio e carinho durante os experimentos de SAXS no Laboratório LNLS e à sua equipe, Guinther e Leide, pelo apoio nos experimentos e Cristiano pelo tratamento dos dados.

Ao Prof. Dr. Watson Loh do Instituto de Química pelo uso do microcalorímetro.

À Denise Pinheiro pelo apoio na avaliação microbiológica dos lipossomas.

Aos meus pais e irmãos, pelo amor, amizade apoio e confiança em toda minha carreira profissional.

À Neusa e Wallace pela amizade, carinho e apoio durante o período de permanência em Campinas.

À TRB Pharma pelo fornecimento dos gangliosídios utilizados no presente trabalho.

À CNPq pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

RESUMO

A importância farmacológica dos gangliosídios tem crescido nos últimos anos devido à identificação desses compostos como antígenos, produzindo anticorpos antigangliosídios que podem estar envolvidos em algumas doenças autoimunes ou neuropatias. Os estudos na literatura dos gangliosídios abrangem desde suas propriedades e funções nas membranas neuronais assim como a sua farmacologia no sistema nervoso central, quando injetados na forma pura em animais e humanos. Entretanto, o estudo de seus efeitos no sistema imunológico, quando associados aos lipossomas, ainda é escasso, o que motivou o desenvolvimento dessa pesquisa.

Este trabalho compreendeu a preparação e caracterização de lipossomas multilamelares compostos de dipalmitoilfosfatidilcolina, colesterol, dihexadecilfosfato e gangliosídios, monossialogangliosídio (GM1) e Mist (mistura de GM1 21%, dissialogangliosídio (GD1a) 40%, dissialogangliosídio (GD1b) 16%, trissialogangliosídio (GT1b) 19%) e avaliação do efeito imunológico destes lipossomas quando injetados em camundongos. Os animais testados foram camundongos do tipo Balb/c, os quais receberam seis doses de lipossomas a cada duas semanas, perfazendo um total de doze semanas. Após este período os animais foram sacrificados e seus soros submetidos a testes ELISA para avaliação da produção de anticorpos antigangliosídios, classes IgM e IgG. Em termos de significância estatística os lipossomas livres de gangliosídios e os associados à Mist não apresentaram imunogenicidade e alguns soros de animais tratados com lipossomas associados ao GM1 apresentaram algumas classes de imunoglobulinas. Porém, em termos de avaliação para diagnóstico de anticorpos, todas as formulações foram consideradas não imunogênicas quando considerada as unidades arbitrárias.

Palavras chave: lipossomas, gangliosídios, anticorpos antigangliosídios

ABSTRACT

The pharmacological importance of gangliosides has increased in the last few years due to the identification of these compounds as antigens, producing antiganglioside antibodies, which may be involved in autoimmune diseases or neuropathy. Studies in ganglioside literature encompass their properties and functions in the neuronal membranes as well as their pharmacology in the central nervous system upon injection in pure ganglioside form in animals and humans. However, as associated to the liposomes, the studies of their effects on the immunological system are still scarce, which motivated the development of this research.

This work includes the preparation and characterization of multilamellar liposomes consisting of dipalmitoyl phosphatidyl choline, cholesterol, dihexadecylphosphate and gangliosides, monosialoganglioside (GM1) and Mist (mixture of GM1 21%, disialoganglioside (GD1a) 40%, disialoganglioside (GD1b) 16%, trisialoganglioside (GT1b) 19%) and evaluation of immunologic effect of these liposomes as administered in mice. The animals tested were Balb/c mice, which were treated with six liposome doses at 2 week-intervals during twelve weeks. After this period the animals were sacrificed and their sera were assayed by ELISA tests in order to evaluate the production of antiganglioside antibodies of IgM and IgG classes. With respect to the statistical significance, the liposomes without gangliosides and the ones associated to the Mist were non immunogenic and some of animal sera, which were treated with liposomes associated to the GM1, showed some Immunoglobulin classes. However, in terms of evaluation of the antibody diagnostic, all of liposome formulations were considered non immunogenic in regard to the arbitrary units.

Key words: *liposomes, gangliosides, antiganglioside antibodies.*

SUMÁRIO

Capítulo 1 - INTRODUÇÃO	1
Capítulo 2 - OBJETIVO	4
Capítulo 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 - Lipossomas - conceito, estrutura e classificação.....	5
3.2 - Interações de lipossomas <i>in vivo</i>	10
3.3 - Aplicações de lipossomas em imunologia.....	14
3.3.1 - Lipossomas associados a antígenos de proteínas ou peptídeos..	14
3.3.2 - Lipossomas associados a antígenos de lipídios.....	16
3.4 - Gangliosídios.....	18
3.5 - Lipossomas associados a gangliosídios.....	21
3.6 - Potencial dos gangliosídios como imunomoduladores.....	24
3.7 - Gangliosídios como antígenos.....	27
3.8 - Preparação de lipossomas com gangliosídios.....	28
Capítulo 4 - MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 - Materiais.....	31
4.2 - Equipamentos.....	32
4.3 - Métodos.....	33
4.3.1 - Preparação dos lipossomas MLV's.....	33
4.3.2 - Caracterização dos lipossomas.....	34

4.3.2.1 - Determinação do teor total de fosfato.....	34
4.3.2.2 - Quantificação dos gangliosídeos.....	34
4.3.2.3 - Determinação do raio hidrodinâmico e distribuição de tamanhos das vesículas.....	35
4.3.2.4 - Análise da estabilidade dos lipossomas.....	36
4.3.2.5 - Determinação da temperatura de transição de fase.....	38
4.3.2.6 - Caracterização estrutural dos lipossomas.....	38
4.3.2.7 - Morfologia dos lipossomas.....	42
4.3.2.8 - Análise microbiológica dos lipossomas.....	43
4.3.3 - Administração dos lipossomas.....	43
4.3.4 - Avaliação dos efeitos imunomoduladores dos gangliosídeos via teste ELISA.....	45
Capítulo 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1 - Condições de processo para a preparação dos lipossomas.....	47
5.2 - Caracterização dos lipossomas.....	50
5.2.1 - Medidas da distribuição de tamanho das vesículas MLV's.....	50
5.2.2 - Avaliação da estabilidade dos lipossomas na presença de tensoativo não iônico (C ₁₂ E ₅).....	51
5.2.3 - Temperatura de transição de fase.....	54
5.2.4 - Morfologia dos lipossomas.....	61
5.2.5 - Caracterização estrutural dos lipossomas.....	65
5.3 - Avaliação dos lipossomas após injeção em camundongos Balb/c.....	69

5.3.1 - Peso corporal dos animais.....	69
5.3.2 - Efeitos dos lipossomas sobre o sistema imunológico.....	69
5.3.2.1 - Detecção de anticorpos antigangliosídios GM1.....	70
5.3.2.2 - Detecção de anticorpos antigangliosídios Mist (GM1 21%, GD1a 40%, GD1b 16%, GT1b 19%).....	74
5.3.2.3 - Classificação dos anticorpos através de unidades arbitrárias.....	78
Capítulo 6 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1** - Agregados de lipídios anfífilos formados em meio aquoso. a) micela esférica; b) bicamada; c) lipossoma. Figura adaptada de Lehninger et al, 1993.....5
- Figura 3.2** - Fórmulas estruturais moleculares de fosfolipídios de fosfatidil. Figura adaptada de New, 1990.....6
- Figura 3.3** - Representação esquemática dos tipos de lipossomas baseados na interação com os sistemas biológicos. Figura adaptada de Storm & Crommelin, 1998.....8
- Figura 3.4** - Esquema geral da imunomodulação dos lipossomas no sistema imunológico.....13
- Figura 3.5** - Esquema geral do processo de obtenção da resposta imune usando uma proteína como antígeno, associada aos lipossomas.....15
- Figura 3.6** - Ácido siálico (adaptação de Lehninger et al. 1993).....18
- Figura 3.7** - Classificação dos gangliosídeos. Abreviações: Cer:ceramida; Gal:galactose, GalNAc: N-acetilgalactosamina, Glc: glicose, SA: ácido siálico....19
- Figura 3.8** - Estrutura e similaridades dos principais gangliosídeos presentes no sistema nervoso de vertebrados.Figura adaptada de Tettamanti & Riboni,1994..20
- Figura 3.9** - Organização dos gangliosídeos na superfície celular (adaptado de Hakomori, 1994).....21
- Figura 3.10** - Conformações de superfícies de bicamadas contendo anfífilos poliméricos incorporados. A) Conformação estendida “brush”. B) Conformação enovelada “mushrooms” (Adaptação de Hristova & Needham, 1995).....29
- Figura 4.1** - Esquema do equipamento para determinação de medidas de tamanho de partículas (adaptado de Ostrowsky, 1993).....36

- Figura 4.2** - Esquema da distribuição das amostras em placa de poliestireno do tipo ELISA.....37
- Figura 4.3** - Esquema da geometria para o espalhamento de raios X a baixo ângulo, sendo 2θ o ângulo de espalhamento, \vec{q}_0 o vetor da onda incidente, \vec{q} o vetor de espalhamento ($\vec{q} = 4\pi \text{sen } \theta/\lambda$) (Cavalcanti, 2001).....39
- Figura 4.4** - Esquema do imunoenensaio (ELISA) adaptado de Roitt et al. (1996).....46
- Figura 5.1** - Curvas de intensidade de espalhamento para lipossomas com diferentes composições em %molar para (■)DPPC:Chol(60:40), (●)DPPC:Chol:GM1(40:40:20), (▲)DPPC:Chol:GM1:DHP(40:35:20:5), (▼)DPPC:Chol:GM1:DHP(35:35:20:10) na presença de tensoativo não iônico $C_{12}E_5$ na temperatura ambiente.....52
- Figura 5.2** - Curvas de intensidade de espalhamento para os lipossomas com diferentes composições em %molar para (■) DPPC:Chol(60:40), (●)DPPC:Chol:Mist (40:40:20), (▲) DPPC:Chol:Mist:DHP (40:35:20:5), (▼)DPPC:Chol:Mist:DHP (35:35:20:10) na presença de tensoativo não iônico $C_{12}E_5$ na temperatura ambiente.....53
- Figura 5.3** - Termograma de DSC de vesículas multilamelares de DPPC.....55
- Figura 5.4** - Termograma de DSC de vesículas constituídas de DPPC:Chol (80:20 mol %)......56
- Figura 5.5** - Diagramas moleculares para: (a) fosfolipídio puro na fase gel, abaixo da temperatura de transição T_m e fase líquida, acima da T_m . (b) mistura de fosfolipídio/colesterol no estado intermediário. Colesterol induz ordenação parcial das cadeias de hidrocarbonetos, os quais retêm um grau limitado de mobilidade sobre uma larga faixa de temperatura. Figura adaptada de Warren, 1987.....57
- Figura 5.6** - Termograma de DSC de vesículas de DHP.....58
- Figura 5.7** - Termogramas de vesículas de DPPC contendo (a)8, (b)10, (c)20 % molar de GM1 e (d) 6, (e) 10, (f)20 % molar Mist.....59

Figura 5.8 - Termogramas de vesículas constituídas de (a) DPPC:GM1:DHP (75:20:5), (b) DPPC:GM1:DHP(70:20:10), (c)DPPC:Mist:DHP(75:20:5), (d) DPPC:Mist:DHP (70:20:10) em % molar.....61

Figura 5.9 - Microscopia eletrônica de transmissão de vesículas multilamelares constituídas de DPPC:Chol (60:40 % mol). a) 16700 X; b) 16700 X.....62

Figura 5.10 - Microscopia eletrônica de transmissão de vesículas multilamelares constituídas de DPPC:Chol:GM1 (40:40:20 % molar). a) 46460 X; b) 60000 X....63

Figura 5.11 - Microscopia eletrônica de transmissão de vesículas multilamelares constituídas de DPPC:Chol:Mist (40:40:20 % mol). a) 46460 X; b) 60000 X.....64

Figura 5.12 - Curvas de espalhamento de SAXS, a 22 °C, para lipossomas do tipo MLV em solução salina 0,9%.....65

Figura 5.13 - Funções de $p(r)$ para lipossomas do tipo MLV, a 22 °C, em solução salina 0,9%.....67

Figura 5.14 - Detecção de anticorpos antigangliosídios das classes IgM e IgG em placas de poliestireno de fundo chato recobertas com 5 $\mu\text{g/mL}$ de GM1. Os soros utilizados foram diluídos em soluções de PBS, nas proporções de 1:50 e 1:100 e os soros controles foram obtidos de animais sadios não tratados com lipossomas. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle.....70

Figura 5.15 - Detecção de anticorpos antigangliosídios das classes IgM e IgG em placas de poliestireno de fundo chato recobertas com 10 $\mu\text{g/mL}$ de GM1. Os soros foram diluídos em soluções de PBS, nas proporções de 1:50 e 1:100 e os soros controles foram obtidos de animais sadios não tratados com lipossomas.* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle.....72

Figura 5.16 - Detecção de anticorpos antigangliosídios das classes IgM e IgG em placas de poliestireno de fundo chato recobertas com 20 $\mu\text{g/mL}$ de GM1. Os soros foram diluídos em soluções de PBS, nas proporções de 1:50 e 1:100 e os soros controles foram obtidos de animais sadios não tratados com lipossomas. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle.....73

Figura 5.17 - Detecção de anticorpos antigangliosídios das classes IgM e IgG em placas de poliestireno de fundo chato recobertas com 5 $\mu\text{g/mL}$ de Mist. Os soros foram diluídos em soluções de PBS, nas proporções de 1:50 e 1:100 e os soros

controles foram obtidos de animais sadios não tratados com lipossomas.....75

Figura 5.18 - Detecção de anticorpos antigangliosídios das classes IgM e IgG em placas de poliestireno de fundo chato recobertas com 10 µg/mL de Mist. Os soros foram diluídos em soluções de PBS, nas proporções de 1:50 e 1:100 e os soros controles foram obtidos de animais sadios não tratados com lipossomas.....76

Figura 5.19 - Detecção de anticorpos antigangliosídios das classes IgM e IgG em placas de poliestireno de fundo chato recobertas com 20 µg/mL de Mist. Os soros foram diluídos em soluções de PBS, nas proporções de 1:50 e 1:100 e os soros controles foram obtidos de animais sadios não tratados com lipossomas.....77

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1- Classificação dos lipossomas quanto à estrutura e o método de preparação. Tabela adaptada de Crommelin & Schreier (1994).....	7
Tabela 3.2 - Composições lipídicas e razões molares usadas nos estudos de Massó et al. (1996).....	23
Tabela 4.1 - Lipossomas submetidos a estudos em SAXS.....	39
Tabela 4.2 - Protocolos e grupos experimentais.....	44
Tabela 5.1 - Efeito do tempo de processamento sobre o diâmetro médio (nm) e a distribuição de tamanho das vesículas de DPPC-Chol, concentração de 2,5 mM de lipídio total. Velocidades de rotação e evaporação de 42 r.p.m.....	47
Tabela 5.2 - Tamanho médio e distribuição de tamanho dos lipossomas preparados usando a técnica de congelamento e descongelamento.....	48
Tabela 5.3 - Formulações e concentrações em porcentagem molar (mol%) dos lipossomas estudados.....	49
Tabela 5.4 - Distribuição de tamanho dos lipossomas MLV's. Concentração total de lipídios: 2,5 mM.....	50
Tabela 5.5 - Produção de anticorpos antigangliosídios, classes IgM e IgG, em amostras séricas de Balb/c (diluição 1:50 em PBS) tratados com quatro diferentes composições de lipossomas e imunoensaio realizado em placas de poliestireno recoberta com GM1 nas concentrações 5, 10 e 20 µg/ mL ; n=4.....	79
Tabela 5.6 - Produção de anticorpos antigangliosídios, classes IgM e IgG, em amostras séricas de Balb/c (diluição 1:100 em PBS) tratados com quatro diferentes composições de lipossomas e imunoensaio realizado em placas de poliestireno recoberta com GM1 nas concentrações 5, 10 e 20 µg/ mL; n=4.....	80
Tabela 5.7 - Produção de anticorpos antigangliosídio, classes IgM e IgG, em amostras séricas de Balb/c (diluição 1:50 em PBS) tratados com quatro diferentes	

composições de lipossomas e imunoensaio realizado em placas de poliestireno recoberta com Mist nas concentrações 5, 10 e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; n=4.....81

Tabela 5.8 - Produção de anticorpos antigangliosídeo, classes IgM e IgG, em amostras séricas de Balb/c (diluição 1:100 em PBS) tratados com quatro diferentes composições de lipossomas e imunoensaio realizado em placas de poliestireno recoberta com Mist nas concentrações 5, 10 e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; n=4.....81

NOMENCLATURA

Abreviaturas

APC	Células apresentadoras de antígenos
C ₁₂ E ₅	Polioxietileno 5 Lauril Éter
Chol	Colesterol
DHP	Dihexadecilfosfato
DO	Densidade óptica
DO _{corte}	Densidade óptica de corte
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
EAE	Encefalomielite experimental autoimune
ELISA	Ensaio imunoenzimático em fase sólida
Fc	Fragmento cristalizável
GM1	Monossialogangliosídeo
GD1a	Dissialogangliosídeo 1a
GD1b	Dissialogangliosídeo 1b
GT1b	Trissialogangliosídeo 1b
Hepes	-N-2-Hidroxietilpiperine-N'-[ácido etanosulfônico]
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
MDP	Muramildipeptídeo

Mist	Mistura de gangliosídios composta de GM1 21%, GD1a 40%, GD1b, 16%, GT1b, 19% (Sinaxial [®])
MPS	Sistema mononuclear fagocítico
MLV	Vesículas multilamelares grandes
NeuNac/NANA	Ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico)
NK	Linfócito natural "killer"
PC	Fosfatidilcolina
RES	Sistema retículoendotelial
SAXS	"Small angle X ray scattering"
SM	Esfingomielina
SNC	Sistema nervoso central
SUV	Vesículas unilamelares pequenas
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
Th1	Linfócito T "helper" 1
Th2	Linfócito T "helper" 2
Tm	Temperatura principal de transição de fase
Tpt	Temperatura de pré transição de fase
TNF- α	Fator de necrose tumoral

Letras latinas

D	Coefficiente de difusão das partículas
K	Constante de Boltzmann
Rh	Raio hidrodinâmico

Letras gregas

μ	Viscosidade dinâmica
-------	----------------------

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Os gangliosídeos são componentes normais da membrana celular da maioria dos tipos de células, com concentrações maiores nas células do sistema nervoso (Tettamanti & Riboni, 1994). Funcionam como receptores ou co-receptores para agentes bioativos tais como citocinas, hormônios e toxinas. Considera-se que eles estão envolvidos em processos celulares tais como, diferenciação, morfogênese, reconhecimento celular, interações célula-célula e controle do crescimento (Bergelson, 1995).

A maioria dos estudos dos gangliosídeos na literatura abrange suas propriedades e funções nas membranas neuronais (Tettamanti & Riboni, 1994). Recentemente o interesse pelo seu estudo tem crescido devido à identificação destes compostos como antígenos, produzindo anticorpos antigangliosídeos, os quais têm sido detectados em pacientes com doenças autoimunes (Mizutamari et al., 1998). Desde a sua identificação como antígenos em pacientes com neuropatias tem crescido o interesse pelo estudo do papel patológico dos anticorpos anti gangliosídeos.

Suas ações farmacológicas têm sido demonstradas em células do sistema nervoso central e tecidos, em testes *in vitro* e *in vivo* em animais sadios e principalmente com lesões cerebrais de diferentes naturezas (Peppeu et al., 1994). Acredita-se que misturas de gangliosídeos livres de proteínas, originadas do cérebro bovino, não são capazes de produzir efeitos colaterais mediados pelo sistema imunológico quando administradas parenteralmente (Asbury, 1994). No entanto, os efeitos colaterais dos gangliosídeos usados terapeuticamente ainda não estão totalmente elucidados.

A associação de gangliosídeos a veículos carreadores representa uma forma alternativa para sua apresentação ao sistema imunológico, bem como uma alternativa para contornar possíveis efeitos colaterais da substância ativa.

Dentre os veículos carreadores, os lipossomas (vesículas lipídicas) constituem opções relevantes em aplicações, onde a encapsulação e / ou a associação de compostos à sua superfície são requeridos tanto como forma alternativa de apresentação de antígenos como para a liberação controlada de compostos terapêuticos. O sucesso dos lipossomas em aplicações médico-farmacêuticas, ressaltado em inúmeros trabalhos desde a década de 60, está diretamente associado às suas características físico-químicas, biocompatibilidade, baixa toxicidade e imunogenicidade reduzida ou inexistente, além de apresentar uma composição semelhante à da membrana celular (Lasic, 1993). Vários estudos sobre a interação de lipossomas vazios com o sistema imunológico foram realizados na década de 90.

A associação de gangliosídeo tipo GM1 a lipossomas foi muito estudada, com o objetivo de prolongar o tempo de meia vida dos lipossomas na corrente sanguínea (Marjan & Allen, 1996). No entanto, os estudos dos efeitos dos gangliosídios associados a lipossomas, quando usados para fins terapêuticos, ainda são escassos na literatura e envolvem praticamente os trabalhos de Massó et al. (1996) que tiveram como objetivo a avaliação da resposta imune humoral em camundongos tratados com o gangliosídeo GD3 associado a lipossomas.

A importância farmacológica dos gangliosídios, a não imunogenicidade dos lipossomas e a escassez de dados sobre os efeitos dos lipossomas associados a gangliosídios no sistema imunológico motivaram o desenvolvimento deste trabalho, cujo objetivo principal foi avaliar a produção de anticorpos dos isotipos IgM e IgG, decorrentes da administração em camundongos saudáveis, de gangliosídios GM1 e uma mistura desses compostos com vários comprimentos de cadeia, associados a lipossomas. A abordagem do assunto foi feita em duas grandes etapas: preparação e caracterização de lipossomas multilamelares compostos de dipalmitoilfosfatidilcolina, colesterol, dihexadecilfosfato e gangliosídios, a saber: monossialogangliosídeo (GM1) e Mist (mistura de GM1 21%, dissialogangliosídeo (GD1a) 40%, dissialogangliosídeo (GD1b) 16%, trissialogangliosídeo (GT1b) 19%)) e avaliação do efeito imunológico destes lipossomas quando injetados em camundongos.

Os gangliosídios GM1 e Mist usados neste trabalho são empregados em tratamentos clínicos com o objetivo de recuperar lesões de diferentes ordens no sistema nervoso central.

Os lipossomas foram do tipo multilamelares compostos de dipalmitoilfosfatilcolina e colesterol, contendo 20 %mol de gangliosídio e quantidades variáveis de dihexadecilfosfato.

Os animais usados foram camundongos do tipo Balb/c, os quais receberam 6 doses de lipossomas a cada duas semanas, perfazendo um total de doze semanas. Após esse período os animais foram sacrificados, e seus soros submetidos a testes ELISA para avaliação da produção de anticorpos antigangliosídios.

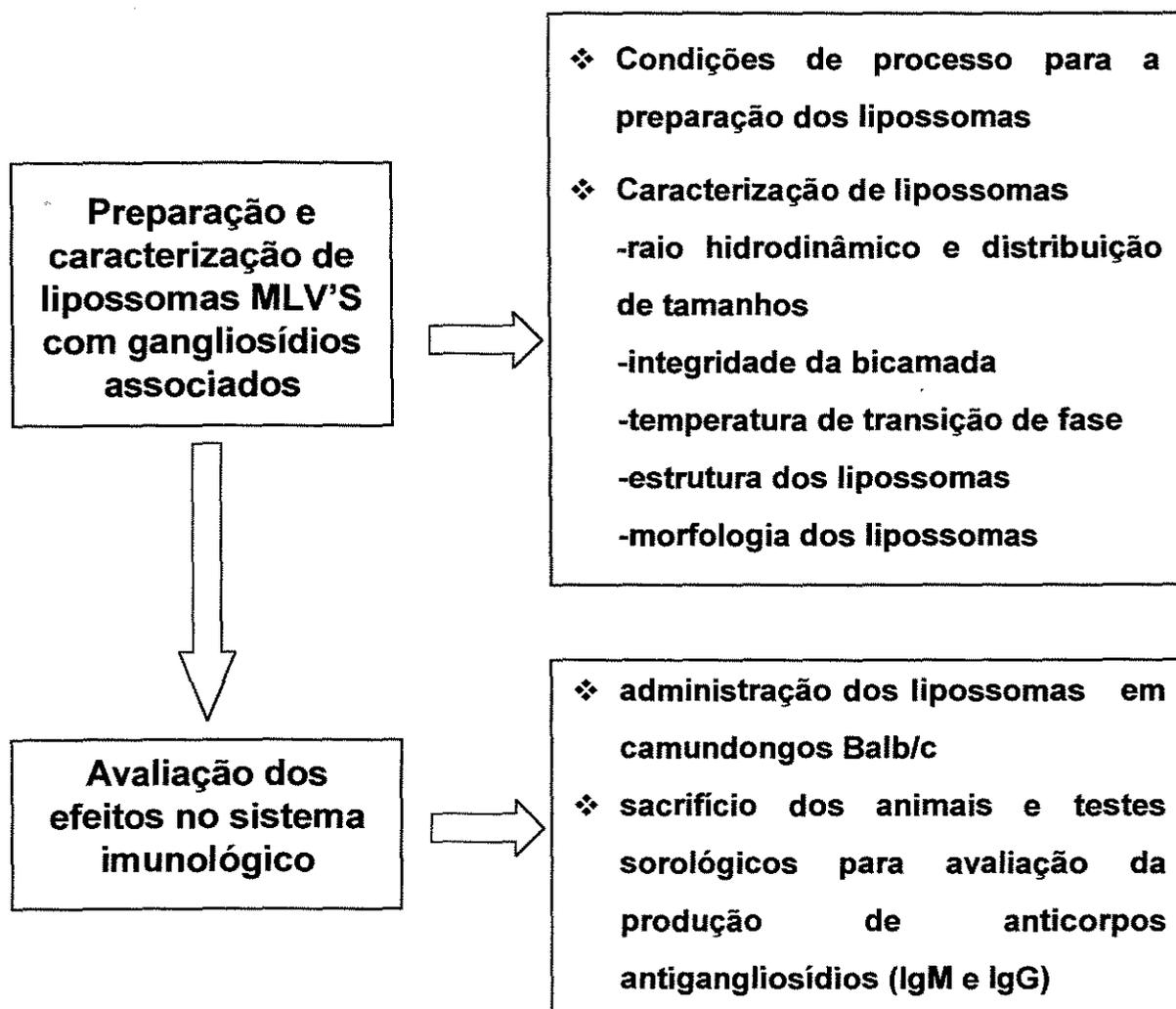
A relevância deste trabalho reside na contribuição para as aplicações terapêuticas dos gangliosídios associados a lipossomas, através da avaliação da produção de anticorpos antigangliosídios em animais sadios.

Capítulo 2

OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo a preparação e caracterização de lipossomas multilamelares compostos de dipalmitoilfosfatidilcolina, colesterol, dihexadecilfosfato e gangliosídeos, monossialogangliosídeo (GM1) e Sinaxial[®] (Mistura de GM1 21%, dissialogangliosídeo (GD1a) 40%, dissialogangliosídeo (GD1b) 16%, trissialogangliosídeo (GT1b) 19%) e avaliação do efeito imunológico desses lipossomas quando injetados em camundongos Balb/c.

O trabalho foi composto de duas grandes etapas, cujos aspectos estudados estão apresentados no diagrama abaixo:



Capítulo 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - Lipossomas – conceito, estrutura e classificação

Conceito - Os lipossomas são vesículas esféricas constituídas predominantemente de lipídios anfifílicos, os quais são caracterizados pela presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. Esses lipídios quando dispersos em água organizam-se espontaneamente em agregados, de modo a não exporem seus grupos hidrofóbicos ao meio aquoso, formando uma bicamada que isola um compartimento aquoso interno envolvido pela porção hidrofílica, conforme Figura 3.1c. Entretanto, nem todos os lipídios anfifílicos formam lipossomas em meio aquoso, podendo originar outros diferentes agregados lipídicos, tais como micelas e outras estruturas. A formação dessas diferentes estruturas depende das interações entre as moléculas, das interações com a água e da relação entre as áreas das regiões hidrofílica e hidrofóbica da molécula.

A formação de micelas é favorecida quando a área da cabeça polar é maior que da cadeia acila (Figura 3.1a). Na formação das bicamadas há a combinação de duas monocamadas lipídicas formando uma folha de duas dimensões, onde as caudas hidrofóbicas de cada monocamada interagem expulsando a água do seu interior. Esta estrutura de agregados lipídicos ocorre principalmente quando as áreas das porções hidrofóbicas e hidrofílicas são similares (Figura 3.1b).

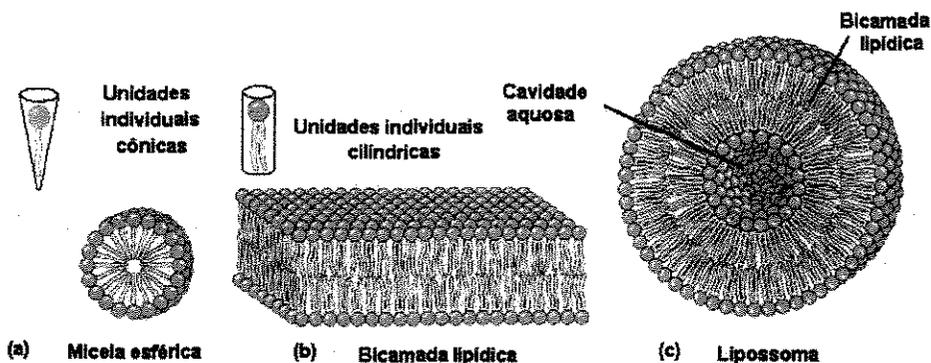


Figura 3.1 - Agregados de lipídios anfifílicos formados em meio aquoso. a) micela esférica; b) bicamada; c) lipossoma. Figura adaptada de Lehninger et al. (1993).

Estrutura – Os compostos anfífilos que contêm duas cadeias longas de hidrocarbonetos tal como fosfolípidos tendem a formar bicamadas. Na Figura 3.2 estão representadas as fórmulas estruturais moleculares dos fosfolípidos mais comumente usados em estudos animais e clínicos com lipossomas. Esta classe de lípidos é caracterizada pela presença de um grupo fosfatidil (cauda) e um segundo grupo (cabeça polar), o qual define o tipo de fosfolípido, podendo ser: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG), ácido fosfatídico (PA) e fosfatidilinositol (PI).

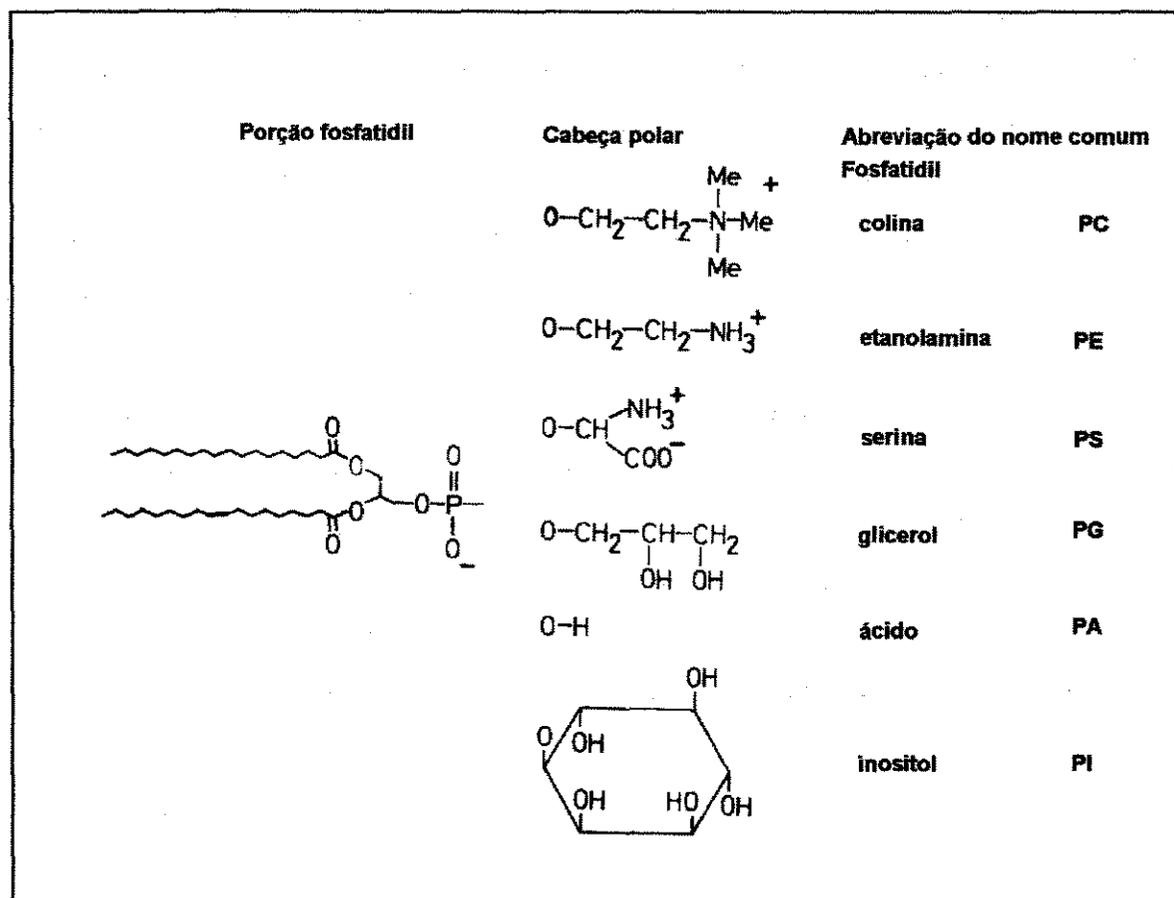


Figura 3.2 – Fórmulas estruturais moleculares de fosfolípidos de fosfatidil. Figura adaptada de New, 1990.

A fosfatidilcolina (PC) tem sido o lípido estrutural mais utilizado como componente dos lipossomas para aplicações farmacêuticas, sendo a rigidez e a permeabilidade das bicamadas dependentes do tipo e da pureza da PC como,

também, dos outros lipídios adicionais, como o colesterol que tende a modificar a rigidez das bicamadas. O comprimento da cadeia alquila e o grau de insaturação interferem diretamente na rigidez das bicamadas lipídicas (Storm & Crommelin, 1998).

Conforme relatado por New (1990), devido às bicamadas dos lipossomas serem constituídas de fosfolipídios, os quais são também os constituintes lipídicos principais das membranas celulares, pode-se utilizá-las como modelos de membranas celulares e, também, como veículos para aplicações nas áreas médicas com diferentes propósitos. Os fosfolipídios são derivados de fontes naturais e sintéticas.

Classificação - Os lipossomas podem ser classificados quanto às suas propriedades estruturais ou quanto ao método de preparação. Crommelin & Schreier (1994) apresentam a classificação dos lipossomas baseada em sua estrutura e método de preparação (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Classificação dos lipossomas quanto à estrutura e o método de preparação. Tabela adaptada de Crommelin & Schreier (1994).

(a) Baseado nos parâmetros estruturais

MLV	Vesículas grandes multilamelares ("Multilamellar Large Vesicles") >0,5 µm
OLV	Vesículas oligolamelares ("Oligolamellar Vesicles") 0,1 – 1µm
UV	Vesículas unilamelares ("Unilamellar Vesicles") todas as faixas de tamanhos
SUV	Vesículas unilamelares pequenas, ("Small Unilamellar Vesicles") 20-100 nm
MUV	Vesículas unilamelares tamanho médio ("Medium size Unilamellar Vesicles")
LUV	Vesículas unilamelares grandes ("Large Unilamellar Vesicles") >100 nm
GUV	Vesículas unilamelares gigantes ("Giant Unilamellar Vesicles") diâmetros >1 µm
MVV	Vesículas multivesiculares ("Multivesicular Vesicles") >1 µm

(b) Baseado no método de preparação dos lipossomas

REV	Vesículas simples ou oligolamelares obtidas pelo método de evaporação de fase-reversa ("Reverse-phase Evaporation")
MLV-REV	Vesículas multilamelares obtidas pelo método de fase reversa
SPLV	Vesículas plurilamelares estáveis ("Stable Plurilamellar Vesicles")
FATMLV	MLV obtida pelo método de congelamento – descongelamento ("Frozen and Thawed MLV")
VET	Vesículas preparadas pelo método de extrusão
DRV	Vesículas obtidas pelo método de desidratação-reidratação ("Dehydration-Rehydration Vesicles")

De acordo com a Tabela 3.1 as vesículas podem variar quanto ao tamanho, número e posição das lamelas de acordo com os lipídios e os métodos de preparação empregados. A variação do número de lamelas desde SUV até GUV define o tamanho das vesículas, embora os limites de cada faixa de tamanho não sejam rigorosamente seguidos.

Embora existam atualmente vários tipos de lipossomas em desenvolvimento e avaliação em organismos vivos, Storm & Crommelin (1998) apresentaram uma classificação dos lipossomas com relação às características de interação com sistemas biológicos. A Figura 3.3 ilustra esquematicamente estes lipossomas: convencional, "Stealth" (estabilizados estericamente), direcionados ou "targeted" e catiônico. Neles as interações são modificadas através da presença de cargas ou modificações de superfície dos lipossomas.

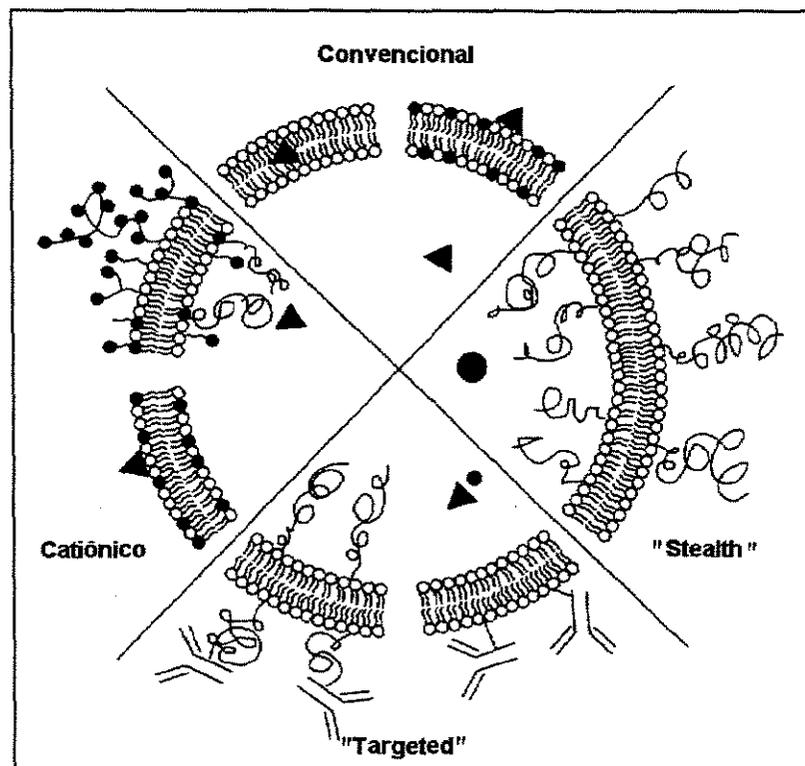


Figura 3.3 – Representação esquemática dos tipos de lipossomas baseados na interação com os sistemas biológicos. Figura adaptada de Storm & Crommelin, 1998.

Os lipossomas convencionais são tipicamente constituídos de fosfolipídios (neutros e / ou carregados) e / ou colesterol e pertencem a uma família de vesículas cuja estrutura é formada por um compartimento aquoso cercado pelas bicamadas lipídicas. Baseado no trabalho de revisão apresentado por Storm & Crommelin (1998), verifica-se que estes lipossomas, quando administrados *in vivo*, apresentam um baixo tempo de circulação na corrente sanguínea, tendendo a se acumular rapidamente nas células fagocitárias do sistema fagocítico mononuclear (MPS), também conhecido como sistema retículo endotelial (RES). Devido à abundância de macrófagos e à elevada irrigação sanguínea do fígado e baço, há um grande acúmulo das vesículas nesses órgãos.

Com a tendência de distribuição dos lipossomas convencionais no MPS, o uso destes lipossomas tem sido direcionado preferencialmente para aplicações que têm como alvo os macrófagos do MPS, tais como: liberação de agentes antimicrobiais em macrófagos infectados, liberação de imunomoduladores para destruição de células neoplásicas, para aumentar a resistência contra microorganismos infecciosos e, também, para entrega de antígenos.

Com a baixa estabilidade dos lipossomas convencionais na corrente sanguínea e a necessidade de seu direcionamento para outros órgãos que não os do MPS, no final dos anos 80 novos tipos de lipossomas capazes de permanecer por maiores períodos de tempo na corrente sanguínea, foram estudados. Esses lipossomas, designados como de longo tempo de circulação, apresentam modificações na superfície das vesículas com a incorporação de glicolipídios, GM1 e polietilenoglicol (PEG). Com a inclusão do gangliosídeo GM1 na bicamada de fosfolipídio há um prolongamento no tempo de circulação dos lipossomas na corrente sanguínea escondendo, assim, as vesículas das células do MPS, dando origem ao termo lipossomas “Stealth” ou furtivo. Apesar dos bons resultados obtidos para as aplicações terapêuticas com estas vesículas, a extração do GM1 via fonte natural (cérebro bovino) ou sintética, tornou a preparação desses lipossomas de alto custo, levando ao surgimento de uma segunda geração de formulações de lipossomas de longa duração, a qual é obtida através da ligação covalente de um polímero hidrofílico de polietilenoglicol (PEG) nas bicamadas

lipídicas. Essas vesículas modificadas são conhecidas como “Stealth” ou lipossomas estericamente estabilizados e sua estabilização estérica resulta da concentração dos grupos de PEG altamente hidratados na superfície dos lipossomas, criando uma barreira contra as interações com moléculas e componentes celulares do meio biológico. Neste caso, o tempo de meia vida na corrente sanguínea de humanos pode ser prolongado em relação aos convencionais e tem sido muito utilizadas atualmente (Marjan & Allen, 1996).

Muitos exemplos de aplicação de lipossomas do tipo “Stealth” para encapsulamento de drogas são apresentados na literatura, tais como: doxorrubicina (Vaage & Barbera, 1995), vincristina (Uster, 1995), citosina arabinosídeo (Allen, 1995).

Os lipossomas do tipo “targeted” são também chamados de imunolipossomas por possuírem anticorpos ou fragmentos específicos de anticorpos na sua superfície. Embora essas vesículas tenham sido pesquisadas para várias aplicações terapêuticas, o seu foco básico tem sido a liberação de agentes anti-cancerígenos em tumores.

Os tipos mais recentes dentro dessa mesma classificação, quanto às aplicações *in vivo*, são os lipossomas catiônicos, os quais têm sido estudados como vetores para melhorar o transporte de materiais genéticos em organismos vivos. Os componentes lipídios catiônicos interagem com o DNA carregado negativamente, neutralizando-o e promovendo a sua condensação em estruturas mais compactas. Os complexos resultantes, lipídio-DNA protegem o DNA melhor que quando encapsulados em lipossomas, promovendo a internalização celular e possibilitando a expressão do plasmídeo condensado.

3.2 - Interações de lipossomas *in vivo*

Os lipossomas podem interagir de diferentes maneiras com as células. O estudo dessas interações é de grande interesse nas investigações e aplicações dos lipossomas em liberação de drogas e imunoterapia, além de fornecer informações sobre as interações célula-célula, pois as bicamadas são bons

modelos de membranas celulares (New, 1990; Lasic, 1993). Estes autores apresentam uma classificação para as diferentes formas de interação dos lipossomas com as células, como:

a) Troca de lipídios ou proteínas com as membranas celulares

A transferência de lipídios ocorre por dois processos separados: por transferência associada a proteínas, via solubilidade molecular na fase aquosa ou por colisões.

Devido à similaridade dos lipossomas com a bicamada fosfolipídica das membranas celulares, os lipídios que fazem a transferência das proteínas com a membrana celular, também reconhecem lipossomas e realizam uma transferência lipídica. A troca de lipídios, incluindo o colesterol pode ocorrer, também, na ausência de atividade enzimática. Durante a troca de lipídios os lipossomas e seus conteúdos praticamente não se misturam, exceto em casos nos quais os lipossomas contêm drogas lipofílicas, as quais podem ser transferidas para as lipoproteínas do plasma. Este mecanismo de transferência ainda é pouco entendido.

b) Adsorção ou ligação dos lipossomas às células

Os lipossomas adsorvem em superfícies de diversas células, podendo levá-las a outras interações. Podem permanecer ligados às superfícies celulares até que sejam degradados por mecanismos, como reconhecimento pelos macrófagos e captura, degradação por lipases e outras enzimas, desintegração física.

c) Internalização por endocitose ou fagocitose

O mecanismo mais simples para distribuição de conteúdo de lipossomas em células é a endocitose. Existem poucas espécies de células envolvidas nesta internalização as quais são, em geral, derivadas da medula óssea e fagocitam principalmente vesículas grandes. Essas células fagocitam os lipossomas no endossoma (vacúolos formados pela invaginação das membranas do plasma) os quais apresentam um pH de 5,0 - 5,5. Os endossomas, a seguir, são fundidos com os lisossomas formando um

lisossoma secundário onde os lipossomas serão degradados sob pHs de aproximadamente 4,5. Durante o processo de ruptura dos lipossomas no lisossoma os conteúdos do compartimento aquoso são liberados e permanecem nos lisossomas até que sofram a exocitose ou se desprendam no conteúdo celular.

d) Fusão da bicamada lipídica com a membrana celular

Essa forma de interação é proveniente da aproximação dos lipossomas e membranas celulares que leva à fusão, dando origem a uma mistura de lipídios lipossômicos e da membrana celular com liberação do conteúdo lipossomal no citoplasma. Esse modelo de interação é mais raro de ser encontrado e é largamente controlado por proteínas de membranas tanto de células como de vírus.

As diferentes interações entre os lipossomas e as células variam com o tipo de lipídio empregado, a preparação da vesícula e o tipo de célula envolvida, com a presença de receptores específicos e de muitos outros fatores.

A fagocitose é o principal mecanismo de eliminação de partículas estranhas do organismo vivo através do seu engolfamento, ingestão e destruição consecutiva. Diversos fatores podem aumentar esta taxa de eliminação, os quais são referenciados principalmente como opsoninas, as quais são substâncias capazes de aumentar a fagocitose, sendo os anticorpos e as proteínas do complemento as principais. É comumente dividida em endocitose (ingestão de materiais particulados) e pinocitose (ingestão de materiais solúveis), sendo a endocitose a principal responsável pela captura dos lipossomas nos organismos vivos. As células fagocíticas incluem os macrófagos granulócitos, circulantes (monócitos fagocíticos) e os locais. Os macrófagos locais são os mais importantes na captura dos lipossomas e se localizam no fígado (células de Kupfer), tecidos linfóides (baço, linfonodo), pulmão (macrófagos alveolares) e tecidos conjuntivos.

Os macrófagos são ativos em processos de inflamação ou imunidade e sua função mais simples é fagocitar partículas estranhas ao organismo em

circulação. Normalmente os macrófagos são referidos como sistema retículo endotelial (RES) ou como sistema fagocítico mononuclear (MPS) e contêm em sua superfície ligantes seletivos, os quais são receptores específicos de açúcares para glicoconjugados, fragmentos cristalizável (Fc) de subclasses de IgG e, possivelmente, receptores para lipídios específicos (Lasic, 1993).

Os efeitos dos lipossomas na imunopotentiação para alguns antígenos já está estabelecido; entretanto, o seu mecanismo de ação para estimular a produção de anticorpos ainda não se encontra bem elucidado. Acredita-se que os lipossomas atuam como imunomoduladores com ação imunoadjuvante ativando macrófagos, ou atuando sobre outras células do sistema imunológico como os linfócitos B (Ghosh & Bachhawat, 1995).

A Figura 3.4 ilustra, de forma geral, a imunomodulação dos lipossomas no sistema imunológico.

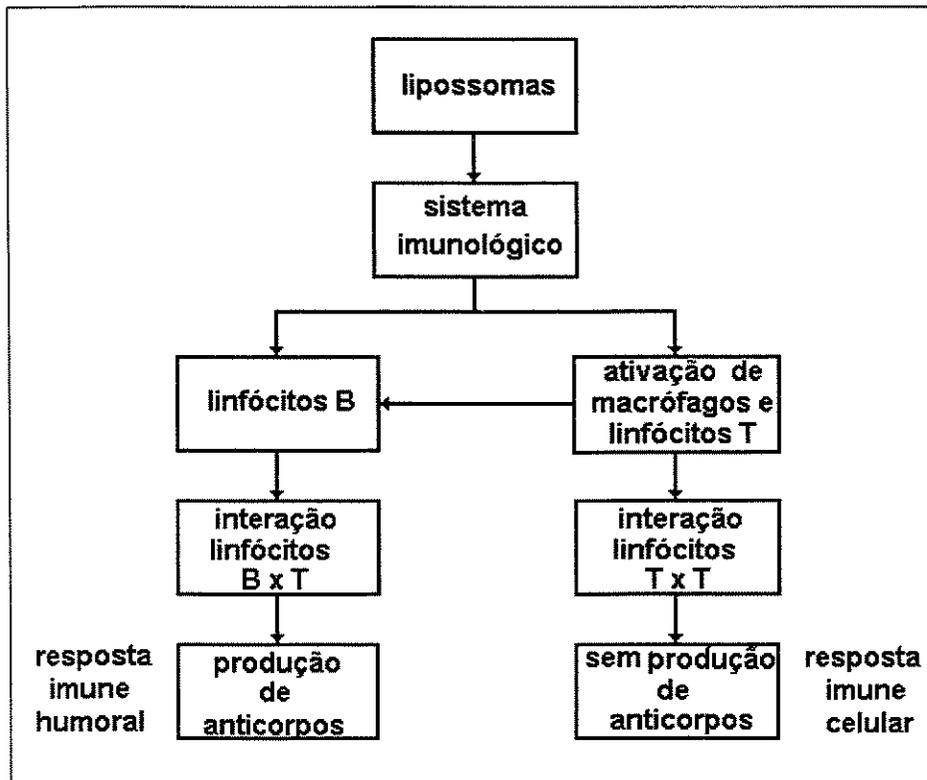


Figura 3.4 – Esquema geral da imunomodulação dos lipossomas no sistema imunológico.

A atuação dos lipossomas no sistema imunológico pode levar a dois tipos de respostas, imune humoral ou imune celular. A resposta imune humoral resulta na produção de anticorpos e a imune celular sem a produção de anticorpos.

Os lipossomas podem ser fagocitados pelos macrófagos, apresentados e reconhecidos pelos linfócitos T, os quais mediados pelos linfócitos B e linfócitos T auxiliares levam a produção de anticorpos ou através das vesículas que podem ser reconhecidas pelos linfócitos B e levando, também, à produção de anticorpos. Para a resposta imune celular os lipossomas fagocitados são processados basicamente pelos linfócitos T citotóxicos e pelas células T auxiliares (Harlow & Lane, 1988).

O comportamento *in vivo* dos lipossomas pode ser muito diferente do comportamento *in vitro*, pois as opsoninas, as quais não necessariamente induzem maiores alterações *in vitro*, podem produzir um aumento da fagocitose pelos macrófagos.

3.3 - Aplicações de lipossomas em imunologia

3.3.1 - Lipossomas associados a antígenos de proteínas ou peptídios

Os antígenos podem ser encapsulados em lipossomas ou associados às suas superfícies. A Figura 3.5 apresenta um esquema geral da atuação de lipossoma-antígeno na geração de resposta imune. Neste esquema o antígeno considerado é uma proteína ou peptídeo. Conforme estudos apresentados por Huang et al. (1992) e New (1990) inicialmente os lipossomas são absorvidos pelos macrófagos via endocitose.

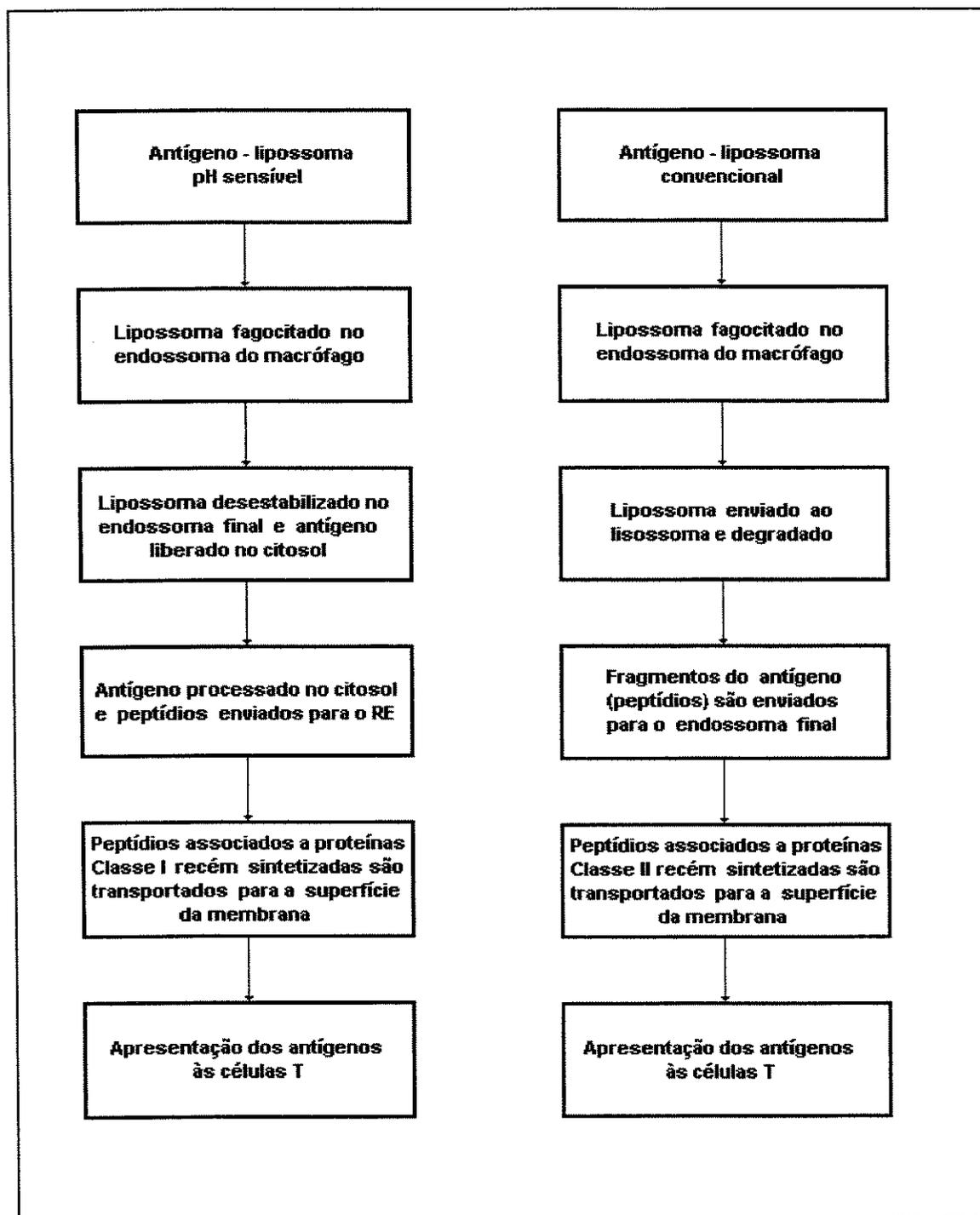


Figura 3.5 - Esquema geral do processo de obtenção da resposta imune usando uma proteína como antígeno, associada aos lipossomas.

No compartimento endossômico final das células, cujo pH varia entre 5,0 e 5,5 os lipossomas formados por lipídios mais sensíveis a esses pHs sofrem desestabilização liberando parte dos antígenos no citosol. Neste local o antígeno é processado e os peptídios obtidos são transportados para o retículo endoplasmático (RE) onde serão complexados com proteínas de classe I previamente sintetizadas. Este complexo é transportado para a superfície da membrana celular, a qual apresentará o antígeno às células T e levará à produção de anticorpo específico para o antígeno.

Quando os lipossomas são mais resistentes em meios com pHs de 5,0 a 5,5, neste caso os convencionais, eles são enviados a partir do endossoma final para o lisossoma (pH aproximadamente 4,0), onde na presença de enzimas desse compartimento sofrem digestão liberando o seu conteúdo. Assim o antígeno é liberado e processado e seus fragmentos são enviados de volta para o endossoma final onde serão complexados com proteínas de classe II previamente sintetizadas. Este complexo também é transportado para a superfície da membrana celular e apresentado às células T a fim de produzir o anticorpo específico.

Harding et al. (1992) em estudos com lipossomas constituídos de diferentes fosfolipídios, mostraram que as vesículas preparadas com dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE) e palmitoilhomocisteína (PHC) são sensíveis a meios com pH menores que 6,5 e as constituídas com os fosfolipídios dioleilfosfatidildicolina (DOPC) e dioleilfosfatidilserina (DOPS) são resistentes e permanecem estáveis em todas as faixas de pH fisiológico.

3.3.2 - Lipossomas associados a antígenos de lipídios

Estudos que abordam mecanismos de apresentação dos antígenos de lipídios pelas células ao sistema imune ainda são escassos. Os primeiros antígenos de lipídios estudados e mais altamente purificados foram os de fosfolipídio e colesterol. Uma revisão sobre esse assunto é apresentada por Alving (1992).

O estudo do papel imunológico destes antígenos data do início do século vinte e foi estimulado principalmente após a detecção de cardiolipina, lecitina e colesterol em testes para sífilis.

As teorias e modelos de apresentação dos antígenos às células do sistema imune encontrados na literatura fundamentam-se nos comportamentos dos antígenos de proteínas e peptídios.

Fogler (1993) descreve em seu artigo que, até 1979, os fosfolipídios não eram considerados antígenos, pois muitos experimentos tinham sido realizados com fosfolipídios sintéticos em animais e nenhuma resposta imune humoral ou celular tinha sido detectada. Entretanto, a partir desse ano foram realizados experimentos com lipossomas contendo Lipídio A (porção lipídica lipopolisacarídea de bactéria gram negativa) como adjuvante em coelhos e levado à indução de anticorpos policlonais IgM. Para os lipossomas sem o Lipídio A não foram detectados anticorpos. A descoberta da inclusão do Lipídio A em lipossomas como adjuvante para induzir uma resposta imune para os lipídios dos lipossomas introduziu uma nova forma de estudos de imunogenicidade de fosfatidilcolinas associadas a membranas. Esta nova técnica veio também contribuir com a indução de anticorpos para outros fosfolipídios. Segundo o autor em seu artigo, estes estudos mostraram que os anticorpos para os lipossomas reconhecem toda a superfície do lipossoma como um antígeno e que os constituintes individuais dos lipossomas são reconhecidos como complemento na região combinante do antígeno. Adicional a isto, concluiu-se que a configuração, orientação, carga, densidade de empacotamento, fluidez dos fosfolipídios na membrana e a especificidade conformacional complementar dos anticorpos são os principais fatores responsáveis pela especificidade dos anticorpos para os fosfolipídios.

O desenvolvimento de lipossomas como modelo para mecanismos efetores das reações imunes, quando combinado com as descobertas da imunogenicidade das fosfatidilcolinas lipossomais e outros fosfolipídios e de anticorpos monoclonais para o colesterol de lipossomas, compõem um conjunto de fatores que tem contribuído para o estudo das interações dos lipídios com os

vários componentes envolvidos no sistema imunológico. Apesar de todos esses estudos, ainda não se tem um mecanismo claro do antígeno de lipídios nesse sistema (Alving, 1992).

3.4 - Gangliosídios

Os gangliosídios pertencem à família de glicoesfingolipídios presentes em todas as células eucarióticas, cuja estrutura é formada por uma cauda hidrofóbica constituída de ceramidas, uma porção hidrofílica constituída de oligosacarídeos e resíduos de ácido siálico os quais conferem cargas negativas à molécula. O oligossacarídeo contendo os resíduos de ácido siálico é ligado à porção ceramida formada por uma longa cadeia de ácidos graxos, geralmente o ácido esteárico e uma longa cadeia de hidrocarbonetos (C18 ou C20) principalmente na forma insaturada (esfingosina).

Ácido siálico (SA) é um termo genérico dado a uma série de compostos derivados do ácido neuramínico. Existem aproximadamente vinte diferentes ácidos siálicos; entretanto, poucos deles foram detectados em gangliosídios. Os ácidos siálicos mais comumente encontrados em gangliosídios são: ácido N-acetilneuramínico (NeuNac ou NANA) e N-glicolilneuramínico (NeuNGc), sendo o NeuNac mais encontrado no cérebro humano e o NeuNGc mais largamente distribuído nos tecidos extraneurais e, em menor quantidade, em cérebros de alguns mamíferos.

A Figura 3.6 apresenta a estrutura do ácido siálico (NeuNac ou NANA).

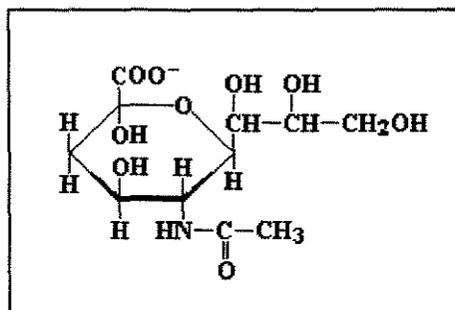


Figura 3.6 - Ácido siálico (adaptação de Lehninger et al. 1993).

Os carboidratos geralmente presentes nos gangliosídios são: glicose, galactose, N-acetilglicosamina ou N-acetilgalactosamina e, em poucas estruturas, a fucose (Ledeen & Yu, 1982; Tettamanti & Riboni, 1994).

Os gangliosídios são classificados de acordo com o número de resíduos de ácido siálico, podendo variar de 1 a 7, e quanto à posição dos resíduos, conforme apresentado na Figura 3.7 (Svennerholm, 1994; Bergerlison, 1995).

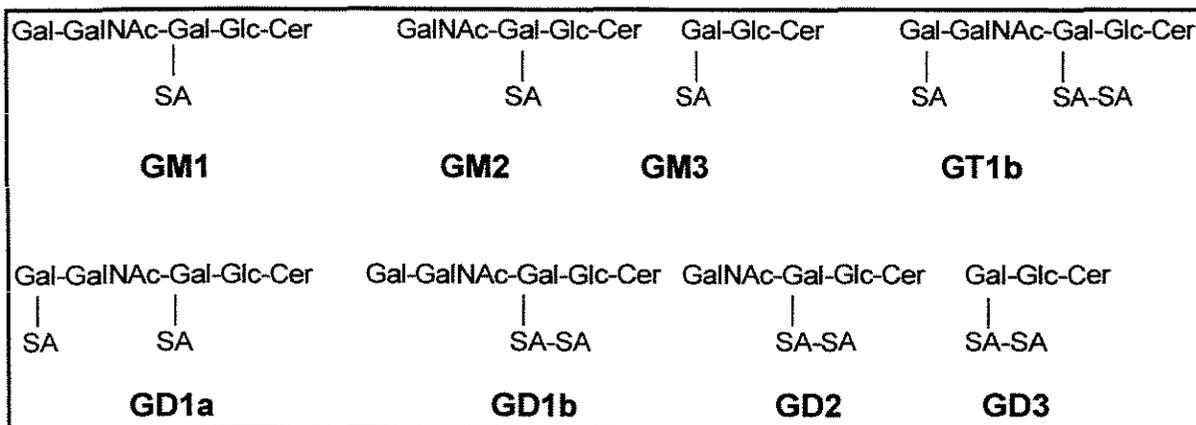


Figura 3.7 - Classificação dos gangliosídios. Abreviações: Cer: ceramida; Gal: galactose, GalNAc: N-acetilgalactosamina, Glc: glicose, SA: ácido siálico

A classificação dos gangliosídios representada na Figura 3.7 é a mais utilizada e emprega o termo GM para gangliosídio monossialico (uma molécula de ácido siálico), GD gangliosídio dissialico (duas moléculas de ácido siálico) e GT gangliosídio trissialico (três moléculas de ácido siálico). Os números 1, 2, e 3 junto às letras se referem à presença de galactose, ausência de galactose e ausência de galactosil-N-acetilgalactosamina nas cadeias terminais, respectivamente. Nos compostos GD1a e GD1b, a letra minúscula b designa a presença de grupos disialicos ligados à galactose interna, enquanto que a letra a tem significado oposto, presença de uma molécula de ácido siálico ligado à galactose interna.

O GM1 é a molécula de gangliosídio mais simples encontrada dentro desta família de compostos. Na Figura 3.8 são apresentadas as estruturas dos principais gangliosídios presentes em vertebrados.

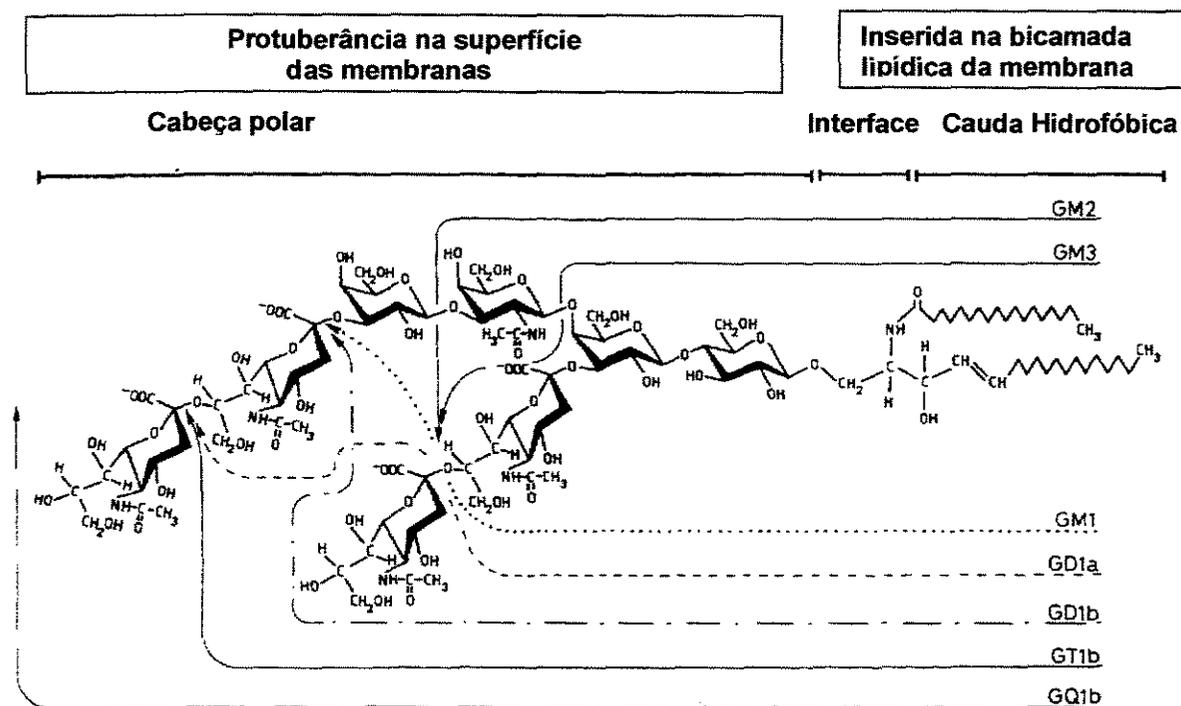


Figura 3.8 - Estrutura e similaridades dos principais gangliosídeos presentes no sistema nervoso de vertebrados. Figura adaptada de Tettamanti & Riboni, 1994.

As moléculas de gangliosídeos são heterogêneas tanto nas porções oligossacarídeos como nas porções ceramídicas, podendo ocorrer em diferentes formas em uma mesma célula. Estão presentes nas membranas plasmáticas das células de vertebrados e assimetricamente distribuídas, com a porção dos oligossacarídeos expostos na superfície da membrana e a porção de ceramida inserida na bicamada lipídica. Estas moléculas ocorrem em todos os tipos de células do sistema nervoso; entretanto, com maior concentração nos neurônios, representando 10% da quantidade total de lipídios ligados nessas membranas (Tettamanti & Riboni, 1994). A Figura 3.9 ilustra o modelo de membrana plasmática contendo gangliosídeos e glicoproteínas na superfície celular.

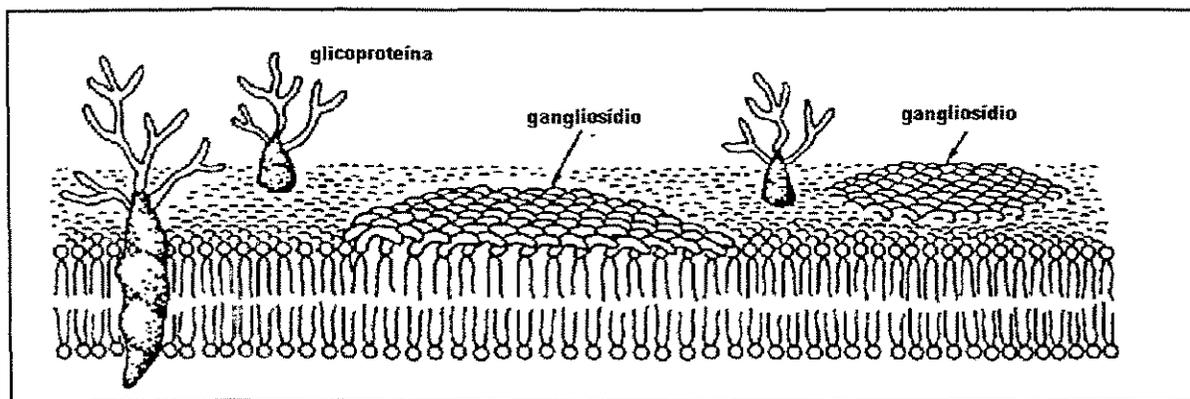


Figura 3.9 - Organização dos gangliosídios na superfície celular (adaptado de Hakomori, 1994).

Embora os gangliosídios sejam principalmente encontrados na membrana plasmática, também podem ser encontrados ligados parcialmente no compartimento intracelular às organelas responsáveis pelo transporte intracelular e metabolismo.

3.5 - Lipossomas associados a gangliosídios

Os efeitos da modificação da superfície com glicolipídios e polissacarídeos sobre o destino dos lipossomas *in vivo* foram extensamente estudados em carreadores para liberação de drogas com o objetivo de prolongar o tempo de vida desses lipossomas na corrente sanguínea. Em particular, foi estudado o papel do monossialogangliosídeo (GM1) na modulação do comportamento dos lipossomas *in vivo*, quanto aos efeitos de tamanho e mecanismo de prolongação do seu tempo de vida na corrente sanguínea (Ghosh & Bachhawat, 1995).

Entretanto, Liu et al. (1995), verificaram que o tempo de circulação de lipossomas contendo GM1 é função da espécie animal empregada para os testes *in vivo*. Para os camundongos foi verificado que o lipossoma-GM1 prolonga o tempo de circulação na corrente sanguínea, enquanto que para ratos e humanos o efeito verificado foi inverso. Estas conclusões foram fundamentadas em estudos da influência do soro sobre a captura dos lipossomas contendo GM1 pelo fígado através da técnica de perfusão do fígado de animais. Nos estudos de perfusão do

figado de rato, foi observado que os soros de ratos, humanos e bovinos contendo lipossomas-GM1 tiveram sua absorção pelo fígado aumentado até cinco vezes em relação ao nível basal. Entretanto, ainda abaixo do nível de crescimento, seis a nove vezes, de quando foi empregado o fígado de camundongo para estes mesmos soros. Estes experimentos sugeriram que a atividade do soro em aumentar a captura dos lipossomas varia com a espécie animal.

Adicional a estes experimentos, os mesmos verificaram que entre os diferentes níveis de anticorpos presentes em soros de diferentes espécies animais, incluindo a humana, bovina, camundongo e rato, a espécie dos camundongos, mostrou ser a única isenta de anticorpos anti-GM1, o que levou os autores inferirem que provavelmente a ocorrência natural de anticorpos anti-GM1 em sangue de ratos pode mediar a eliminação rápida dos lipossomas-GM1 da corrente sanguínea. Os lipossomas empregados nessas investigações foram os do tipo MLV, constituídos de fosfatidilcolina (PC), colesterol (Chol) e GM1.

Embora os anticorpos anti-GM1 contribuam na captura dos lipossomas contendo GM1 pelos organismos vivos, o seu possível mecanismo de atuação ainda não está totalmente elucidado, assim como suas implicações fisiológicas e imunológicas.

Massó et al. (1996), na continuidade dos trabalhos de Livingston et al. (1989), pesquisaram a imunogenicidade de GD3 (produção de anticorpos anti-GD3) associado com lipossomas em diferentes formulações, em animais sadios, visando aplicações na regressão de melanomas e tumores neuroblastomas em humanos. As diferentes formulações utilizadas para os lipossomas estudados pelos autores são apresentadas na Tabela 3.2.

Todos os lipossomas considerados nesses experimentos foram vesículas multilamelares (MLV's), com exceção do ensaio cujos componentes foram PC-Chol-GD3 nos quais foram testados dois tipos: as MLV's e as SUV's. Nesse trabalho foram avaliados a estabilidade dos lipossomas e a resposta sorológica. A estabilidade foi avaliada através de testes de liberação de carboxifluoresceína (CF) em soro de camundongo durante 24 horas e, também, em solução tampão

de HEPES a 4°C, por um período de 45 dias. A resposta sorológica foi analisada através de teste ELISA.

Tabela 3.2 – Composições lipídicas e razões molares usadas nos estudos de Massó et al. (1996).

Composição Lipídica	Razão Molar
PC : Chol: GD3 (SUV)	47,5 : 47,5 : 5
PC : Chol : GD3	47,5 : 47,5 : 5
PC : Chol: GD3	45 : 45 : 10
PC : Chol: GD3 + MDP ^a	45 : 45 : 10
PC : Chol: DHP : GD3	40 : 40 : 10 : 10
SM : Chol: DHP : GD3	40 : 40 : 10 : 10
SM : Chol: GD3 + Lipídio A ^b	45 : 45 : 10
SM : Chol: DHP : GD3 + Lipídio A	40 : 40 : 10 : 10

^a MDP foi utilizado em uma concentração de 50 mM

^b Lipídio A foi utilizado em uma concentração de 0,2%

Os resultados obtidos mostraram nos dois meios testados que os lipossomas com 5% de GD3 formados de PC ou SM, foram estáveis até 8 horas e, a partir deste período, os formados por SM, apresentaram maior estabilidade. Para as composições com 10% de GD3, em ambos os casos (período de 8 e 24 horas), a maior estabilidade observada foi para os lipossomas constituídos por SM, entretanto, menos estáveis que os constituídos por 5% de GD3.

A resposta sorológica foi também avaliada através de teste ELISA em relação à especificidade de produção de anticorpos anti-GD3. Os soros imunizados com lipossomas constituídos por PC-Chol-DHP-GD3 apresentaram tanto reatividade anti-GD3 como anti-GD2. A melhor especificidade foi obtida com essa última formulação, mas com a fosfatidilcolina substituída pela esfingomielina. Nessa última avaliação sorológica, analisada em 6 amostras, duas dentre elas apresentaram também anticorpos anti-GM1, anti-GM3 e anti-GD2 e as outras quatro amostras apresentaram baixa reatividade anti-GM1 ou GM3. Os resultados experimentais também mostraram respostas imunológicas de baixa intensidade, praticamente insignificantes, para as SUV's e baixa especificidade para as formulações que tinham como constituinte o Lipídio A.

3.6 - Potencial dos gangliosídeos como imunomoduladores

Os mecanismos de ação dos gangliosídeos nas células são bastante abrangentes e complexos dificultando, assim, o seu entendimento. Tettamanti & Riboni (1994), descrevem as várias atribuições dos gangliosídeos em um organismo vivo, sendo elas:

- Ferramentas moleculares para interações entre as membranas plasmáticas e substâncias extracelulares (ou outras células).
- Moduladores de ligações de membranas ou proteínas funcionais intracelulares (receptores, enzimas, canais de íons, carreadores de íons, etc.).
- Precursores de reguladores metabólicos intracelulares (esfingosina e derivados, ceramida e derivados)

Os efeitos dos gangliosídeos sobre o sistema imune têm sido estudados há mais de 25 anos e as pesquisas nesse campo têm sido crescentes. Esses estudos têm mostrado que os gangliosídeos exógenos atuam como supressores de muitas funções imunes, cuja ação está associada à estrutura e concentração dos gangliosídeos, à natureza das células alvo e efetora do organismo (Bergerlson, 1995).

Através de muitos estudos *in vitro* foi verificado que os gangliosídeos suprimem a geração de linfócitos T citotóxicos (CTLs), a ativação e crescimento das células auxiliares (Th), a citotoxicidade das células “killer” (NK) e ao mesmo tempo ativa as células T que apresentam atividades supressoras. Especificamente esse último efeito parece ser atribuído ao gangliosídeo GM3. Ao contrário desse efeito, os gangliosídeos exógenos com cadeias de oligossacarídeos mais complexos também inibem a maioria das células T. Por outro lado, concentrações mais baixas de gangliosídeos GD3 associados a células tumorais (0,2nmol/mL) estimulam a resposta humoral primária de células do baço depletado de linfócitos T, mas inibem a resposta em altas concentrações (Bergerlson, 1995).

O sistema nervoso central foi alvo de muitos experimentos, conforme apresentado em uma breve revisão de Pepeu et al. (1994). A maioria desses

trabalhos foi realizada com gangliosídios exógenos do tipo GM1 e, em alguns casos, com uma mistura de gangliosídios constituída de GM1(21%), GD1a (39,7%), GD1b (16%) e GT1(19%). O propósito desses trabalhos foi estudar a ação farmacológica dos gangliosídios em células e tecidos neurais *in vitro* e *in vivo* em animais sadios e, principalmente, em animais com lesões cerebrais de naturezas diferentes, mimetizando as lesões cerebrais humanas.

Os resultados mostraram que os compostos com GM1 em roedores sadios são ativos durante o desenvolvimento e envelhecimento. Esses compostos facilitam o desenvolvimento neuronal e, conseqüentemente, a aquisição de comportamentos aprendidos nas fases infantil e juvenil e melhoram o mecanismo colinérgico afetado pela idade. De modo controverso, nenhum efeito do GM1 em relação ao sistema colinérgico foi demonstrado em roedores sadios e em ratos em fase de senescência. Somente o sistema serotoninérgico foi afetado pela administração de GM1 em ratos sadios adultos.

Para os animais com lesões cerebrais foi possível verificar que a mistura de gangliosídios exógenos reduziu os danos no sistema nervoso e facilitou a recuperação em animais cujo sistema nervoso central foi destruído por lesões mecânicas, eletrolíticas, administração de neurotoxinas ou isquemia.

Em todos esses trabalhos descritos por Pepeu et al.(1994), os gangliosídios foram administrados via intramuscular, intraperitoneal, subcutânea e, em alguns casos, via injeções intraventriculares (i.c.v.), em pequenas doses. Entretanto, em nenhum dos casos a ação dos gangliosídios foi restrita somente à via i.c.v.

Pesquisas de Castro (1999), apresentaram os efeitos do tratamento com gangliosídios na evolução da encefalomielite experimental autoimune (EAE) em ratos da linhagem Lewis. Esse trabalho empregou o estudo da EAE como modelo da esclerose múltipla para fins de avaliação dos gangliosídios como agente terapêutico. Os resultados mostraram que a administração de gangliosídios na fase efetora leva à supressão parcial ou total dos sinais clínicos, refletindo-se na contagem de infiltrados, onde o número destes foi significativamente menor no cérebro. A avaliação imunológica demonstrou que os animais tratados com gangliosídios apresentam níveis menores do fator de necrose tumoral (TNF- α),

uma das principais citocinas envolvidas na gênese da EAE e a possibilidade de uso deste gangliosídeo em tratamento de esclerose múltipla.

Por muitos anos os gangliosídios, extraídos de cérebros bovinos, foram utilizados para fins terapêuticos na Europa e em outras partes do mundo. Acreditava-se que essas misturas de gangliosídios, purificados, livres de proteínas, não eram imunogênicas e que sua administração parenteral não elicitaria efeitos laterais mediado pelo sistema imune (Asbury, 1994). Entretanto, trabalhos mais recentes têm sido realizados com o objetivo de detectar o papel dos gangliosídios como causadores de algumas neuropatologias. Nesse contexto, anticorpos policlonais anti-gangliosídios têm sido detectados em várias condições neurológicas como a esclerose amiotrófica lateral, a esclerose múltipla e a síndrome de Guillain-Barré (Ponzin et al., 1991; Latov, 1994; Steck & Kuntzer, 1996).

Além dessas neuropatologias, muitos trabalhos têm sido direcionados para detectar os efeitos dos gangliosídios sobre o lúpus eritromatoso sistêmico, melanomas malignos e o diabetes tipo I (Kimata, 1995; Vilella, 2000).

Os autoanticorpos direcionados contra gangliosídios são frequentemente policlonais do isotipo IgM e são caracterizados pela ligação de baixa afinidade da porção de carboidratos da molécula de gangliosídios. Apesar da importância patogênica desses autoanticorpos não ser clara, eles são em muitos casos reativos contra o gangliosídeo GM1 (Bansal et al., 1994).

Tem sido crescente o interesse de se estudar o papel patológico dos anticorpos anti-gangliosídios. Embora já tenha sido demonstrada uma clara associação entre um alto título de anticorpos policlonais anti-gangliosídios IgM e doenças motoras neuronais ou neuropatias, ainda não foi estabelecida, de uma forma conclusiva, uma significância clínica para esses efeitos. Anticorpos de baixo título de anti-gangliosídeo tem sido detectados em testes sorológicos tanto nos controles como, também, em soros não sadios (com doenças neurológicas e não neurológicas), o que contribui para a complexidade de inferir sobre o papel preciso dos anticorpos anti-gangliosídios em doenças neuronais ou de outras origens (Endo et al., 1984; Mizutamari et al., 1998).

Mitzumari et al.(1998) diferenciaram os anticorpos anti-GM1 em indivíduos sadios quanto à sua baixa afinidade e descreveram o aparecimento de anticorpos anti-GM1 de alta afinidade em pacientes com polineuropatia sensorial. Esses trabalhos trouxeram novas perspectivas para a busca dos efeitos patológicos dos anticorpos anti-gangliosídios nas várias doenças.

3.7 - Gangliosídios como antígenos

Muitas pesquisas foram feitas para identificar possíveis antígenos para tumores com estrutura primária de carboidratos diferente das estruturas destes mesmos compostos presentes nas células normais e tecidos, já que mudanças na estrutura de carboidratos em células tumorais diferentes daquelas presentes nas células não transformadas eram definidas como antígenos associado a tumor.

Harada et al. (1989), demonstraram que o gangliosídio monosialico GM3 era um antígeno de melanoma com uma estrutura primária igual às presentes nas células normais ou tecidos, o que representou um novo conceito na área de antígenos tumorais. Os autores associaram diferentes concentrações de GM3 em lipossomas constituídos de DPPC, DHP e colesterol e observaram que, para concentrações na faixa de 6% - 16%mol, obtinha-se uma resposta imune ao melanoma com as moléculas de GM3.

A indução de anticorpos após vacinações com os gangliosídios GM1, GM2, GM3, GD2 e GD3 em camundongos foi estudada por Livingston et al. (1989) Eles detectaram que os gangliosídios que foram injetados isolados (em meio salino) não induziram nenhuma resposta imune. Porém, quando associados com *salmonella minnesota* R595, as intensidades de respostas foram maiores com as injeções de R595/GM1 e R595/GD3, ocasionais para R595/GM2 e R595/GD2 e nenhuma produção de anticorpos para R595/GM3.

Esses mesmos autores também realizaram comparações de imunogenicidade de gangliosídios administrados em camundongos e em seres humanos e foram detectadas diferenças: para os compostos com GM1, GM3 e GD2 as imunogenicidades foram semelhantes em ambas espécies e para os GM2

e GD3 as imunogenicidades se apresentaram diferentes nos dois organismos. O GD3 foi pouco imunogênico em humanos e bastante imunogênico em camundongos. Embora os gangliosídeos GD3 e GM3 sejam os mais encontrados em melanomas humanos, eles não são bons imunógenos e nenhum anticorpo contra estes compostos foi detectado em soros humanos.

Segundo Ragupathi (1996) os antígenos de carboidratos tais como GM2, GD2 e GD3 (gangliosídeos), Lewis^y e globo-H (glicolipídios neutros e glicoproteínas) e Tn, Tf e sTn (glicoproteínas) estão super expressos em várias neoplasias. Os antígenos de carboidratos estão presentes nas superfícies das células como glicolipídios ou glicoproteínas e estão inseridas nas bicamadas lipídicas das membranas através de ligações hidrofóbicas pela porção ceramida. Essa observação induziu à proposição de diferentes abordagens da indução de respostas imunes contra antígenos de carboidratos e diferentes formas de abordagem para induzir uma resposta imune contra os mesmos foram apresentadas, como: vacinação com as células do tumor lisada ou com células totais, carboidratos purificados ou sintéticos, derivativos de carboidratos imunogênicos ou conjugados de carboidratos com carreadores imunogênicos.

3.8 – Preparação de lipossomas com gangliosídeos

A co-mistura de fosfolipídios estruturais com moléculas anfifílicas compostas de cabeças polares especiais, tais como gangliosídeos, a baixas razões molares, produz a incorporação da sua porção hidrocarboneto na bicamada lipídica e a exposição das cadeias poliméricas hidrofílicas ao meio aquoso. Os lipossomas resultantes apresentam a sua superfície modificada, na qual a porção polissacarídica da molécula projeta-se no meio aquoso a partir da superfície, formando uma camada hidratada cuja espessura é função da conformação do polímero na superfície. Dependendo da concentração e das forças polímero-superfície e inter-cadeias, o polímero pode apresentar-se com somente um ponto de ligação com a superfície (conformação estendida “brush”) ou parcialmente enovelado, podendo apresentar domínios adsorvidos, com vários pontos de interação sobre a superfície (conformação enovelada ou “mushrooms”) (Hristova &

Needham, 1995). A Figura 3.10 apresenta esquematicamente essas duas conformações.

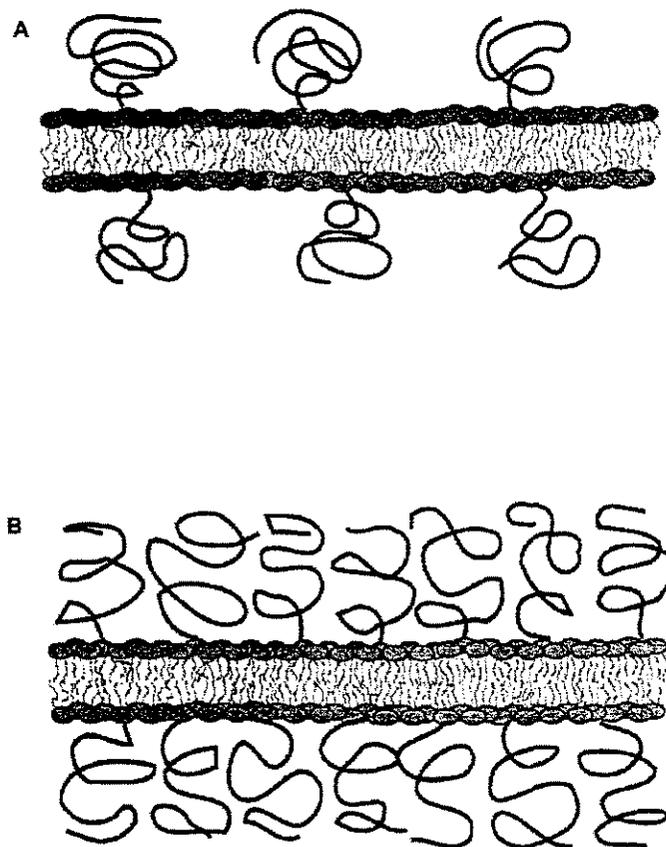


Figura 3.10 - Conformações de superfícies de bicamadas contendo anfifílicos poliméricos incorporados. A) Conformação enovelada "mushrooms". B) Conformação estendida "brush". (Adaptação de Hristova & Needham, 1995).

Medidas das forças entre as superfícies de bicamadas modificadas com o gangliosídeo GM1 mostram aumento da repulsão entre elas, quando comparadas às bicamadas convencionais (não modificadas), resultante da combinação de hidratação e repulsão estérica causadas pela presença do gangliosídeo sobre a superfície. Estimativas da espessura da camada de hidratação externa à superfície das bicamadas, ou inter partículas, induzem ao modelo de conformação não estendido das cadeias de polissacarídeos dos gangliosídios sobre a

superfície. A conformação é determinada pela mobilidade do polímero, a qual é função da fase em que o lipídio estrutural se encontra. Assim, bicamadas de DPPC na fase gel à temperatura ambiente, produzem bicamadas de maior espessura (8,3 e 9,3 nm) devido à restrição da mobilidade do polímero. A maior mobilidade do polímero em bicamadas de DPPC produz menores espessuras da camada de hidratação (4,5 nm) evidenciando a sua difusão lateral na região de contato entre bicamadas (Parker, 1990).

Portanto, a modificação da superfície das bicamadas por incorporação de anfífilos poliméricos, conhecida como “doping” da bicamada lipídica, causa uma expansão da área da superfície, devido às forças de repulsão das cadeias poliméricas, as quais se opõem às forças de coesão das cadeias hidrofóbicas presentes na bicamada. O equilíbrio entre essas forças determina a estrutura dos agregados, a sua estabilidade e os limites superiores de incorporação dos anfífilos poliméricos (Hristova & Needham, 1995).

Estudos de Sillerud et al. (1979) e de Beddu-Addo & Huang (1996), empregando técnicas de microcalorimetria diferencial de varredura (DSC), espalhamento dinâmico de luz (QLS) e microscopia eletrônica demonstraram que a mistura de fosfatidilcolina e GM1 pode existir em três diferentes estados físicos: estado lamelar com os componentes demonstrando miscibilidade, mistura de fase micelar e também de mesofase esmética (intermediário entre a fase lamelar e micelar). Especificamente os estudos de Beddu-Addo & Huang (1996) verificaram que a presença do colesterol nas vesículas de DPPC contribui para a inibição da formação de micelas permitindo maiores incorporações de GM1 nas vesículas. Desse modo, concentrações de GM1 até 25 mol% exibem boa miscibilidade nas bicamadas lipídicas. Esses resultados foram também verificados por Sillerud et al. (1979) para vesículas multilamelares constituídas de DPPC. Segundo os autores, acima dessas concentrações os gangliosídeos induzem a formação progressiva de micelas devido às interações repulsivas com grupos de cabeça polar dos fosfolípidos carregados negativamente.

Capítulo 4

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Materiais

- Preparação dos lipossomas

Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), colesterol (Chol) e dihexadecil fosfato (DHP), com grau de pureza 99%, foram adquiridos da Sigma Chemical Co. Os gangliosídios GM1 e a mistura de gangliosídios, Sinaxial[®] (GM1 21%, GD1a 40%, GD1b 16%, GT1b 19%), aqui referenciado como Mist, foram gentilmente cedidos pela empresa Trb Pharma. Tampão HEPES (N-[2-Hidroxietilpiperine-N-[ácido etanosulfônico]) foi fornecido pela Sigma Chemical Co.; Cloreto de sódio (NaCl) para preparação da solução salina foi fornecido pela Synth; metanol e clorofórmio para preparação das vesículas foram obtidos pela Merck. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

- Análises qualitativas dos fosfolipídios, gangliosídios e da bicamada lipídica

Ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido clorídrico (HCl), peróxido de hidrogênio livre de fosfato (H_2O_2) e ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) fornecidos pela Merck; molibdato de amônio ($(NH_4)_6MoO_{24} \cdot 4H_2O$) e fosfato de sódio dibásico heptahidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) obtidos da Ecibra (Brasil).

Resorcinol (1,3-benzenodiol $C_6H_6O_2$), sulfato de cobre ($CuSO_4$), acetato de n-butanol ($C_6H_{12}O_2$) fornecidos da Sigma Chemical Co.; n-butanol ($C_4H_{10}O$) obtido da Synth. Polioxietileno 5 lauril éter ($C_{12}E_5$) obtido da Sigma Chemical Co.

- Análises microbiológicas dos lipossomas

Peptona fornecida pela Oxoid e extrato de "beef" pela Merck.

- Enzimaimunoensaio (ELISA) para detecção de anticorpos anti-GM1

Placa de poliestireno de fundo chato (96 poços) fornecida pela Sigma Chemical Co.; polioxietileno sorbitan monolaurato (Tween-20) obtido da Aldrich; gelatina (Merck), soro fetal bovino (SBF), (Sigma Chemical Co); anticorpos conjugados com peroxidase de camundongo anti-IgM e anti-IgG (Sigma Chemical Co.); O-phenylenodiamina, OPD, (Abbott Laboratories) e tampão fosfato salino, PBS, (Immco Diagnostics).

- Animais

Foram empregados 40 camundongos da linhagem Balb/c, fêmeas, com sete semanas de idade, adquiridas do Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB) e mantidos no biotério do Laboratório de Imunologia Clínica (LICA), Depto da Clínica Médica da FCM da Unicamp, sob condições sanitárias livres de patógenos conhecidos, controle de luz e temperatura, recebendo água e ração *ad libitum*.

Em todos os experimentos foi utilizada água deionizada de grau analítico.

4.2 – Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados foram:

Espectrofotômetro HITACHI, modelo 2001; evaporador rotatório ART LAB; banho térmico Yamato, modelo RE52; ultracentrífuga L8-80M Beckman; leitora de placas do tipo ELISA Elx808 da Bio-Tek Instruments, INC; equipamento de detecção de espectro Malvern Autosizer, modelo 4700; microcalorímetro VP-DSC, MicroCal INC. (Instituto de Química); espectrofotômetro Spectra Max Plus e programa computacional Soft max[®] PRO2.6, Linha de espalhamento de raios X a baixos ângulos (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – Campinas), microscópio eletrônico Carl Zeiss, LEO 906 (Instituto de Biologia).

4.3 – Métodos

4.3.1 - Preparação dos lipossomas MLV's

Os lipossomas foram preparados pelo método da hidratação do filme seco dos lipídios (New, 1990). Os lipídios foram pesados e solubilizados em uma mistura de clorofórmio-metanol (1:1 v/v) em balão de fundo redondo. Inicialmente, em um evaporador rotatório, a mistura foi homogenizada por 5 minutos e submetida à evaporação sob vácuo em um banho aquoso em uma temperatura superior à maior temperatura de transição de fase dos componentes até a formação de um filme lipídico. A seguir o filme foi hidratado com solução salina (0,9%) em banho térmico, na mesma temperatura usada na etapa de evaporação.

Para o estudo das condições de processo foi empregado inicialmente para a matriz lipídica, constituída de DPPC e colesterol, um planejamento fatorial de dois níveis, segundo Barros Neto (1996). Os fatores adotados foram a velocidade de rotação nas etapas de evaporação do solvente para a preparação do filme de lipídio e da hidratação do mesmo, com níveis inferiores e superiores de 42 r.p.m. e 160 r.p.m., respectivamente, e tempo de processamento de uma hora. Foi empregada uma matriz com seis ensaios, sendo dois referentes ao ponto médio, cuja velocidade em ambos os processos foi 91 r.p.m. A variável resposta foi a distribuição de tamanhos das vesículas, considerando as diferentes populações e a porcentagem de cada população.

Para a avaliação da incorporação total dos gangliosídios foram empregadas as técnicas de cromatografia de permeação em gel e ultracentrifugação. Para a cromatografia de permeação em gel foi utilizada uma coluna cromatográfica com gel do tipo agarose com ligações cruzadas, Sepharose CL-4B (Amersham Pharmacia Biotech) e coluna com 20 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro interno (Sigma Chemical Co). A eluição foi feita com a solução tampão HEPES de concentração 10 mM e pH 7,4. Após a separação dos lipossomas as frações coletadas foram analisadas quanto ao teor de fosfato (para quantificação de fosfolipídios) e teor de ácido siálico para quantificação dos gangliosídios, como descrito a seguir. Os mesmos ensaios foram realizados com o sobrenadante após a separação dos lipossomas via ultracentrifugação.

4.3.2 - Caracterização dos lipossomas

4.3.2.1- Determinação do teor total de fosfato

A quantificação dos lipídios DPPC e DHP foi feita através do teor total de fosfato (PO_4^{3-}) nas amostras, através do método de Chen et al. (1956) com modificações introduzidas por Ribas (1997). O ensaio consiste na oxidação dos compostos de carbono (região lipídica do fosfolípido) a carbono elementar, que é transformado a CO_2 pelo peróxido de hidrogênio na presença de ácido sulfúrico. O fósforo é transformado em ortofosfato, o qual forma um complexo com molibdato de amônio e é reduzido pelo ácido ascórbico, dando origem ao aparecimento da cor azul. A intensidade da cor é diretamente proporcional ao teor de fosfolípido na amostra, o qual é determinado através de curvas de calibração de absorbância x concentração de fósforo, em um comprimento de onda de 830 nm.

4.3.2.2 - Quantificação dos gangliosídios

A quantificação dos gangliosídios fundamentou-se na análise de ácidos siálicos, ácido N-acetil neuramínico (NANA) e utilizou o método colorimétrico de cloridrato de resorcinol. A quantificação é executada em uma única etapa, na qual o ácido siálico é hidrolizado na presença de um ácido forte (HCl) e o composto é rapidamente convertido em outro com cor azul, através da presença do reagente resorcinol, o qual contém cobre (Sverneholm, 1957; Ledeen et al., 1982). Este método é recomendado para ácidos siálicos ligados glicosidicamente.

Quantidades equivalentes de amostras e do reagente resorcinol (10 mL de uma solução 2% de resorcinol em 80 mL de HCl contendo 0,25 mL de solução de sulfato de cobre 0,1M e completado o volume para 100 mL com água deionizada) foram misturadas em 2 tubos de ensaio e uma terceira amostra foi misturada com quantidades equivalentes (v/v) do reagente branco (contendo os mesmos compostos do reagente resorcinol, à exceção desse último). Desta mesma forma foram preparadas as soluções padrão. Os tubos foram aquecidos em um banho aquoso na temperatura de 100 C^0 por 25 min e, posteriormente, resfriados em

água corrente. A seguir, foi adicionado a cada tubo (volume referente a duas vezes o volume do conteúdo já existentes nos tubos) uma mistura de N-butanol e acetato de n-butanol (85:15 v/v) para evitar turbidez excessiva nas amostras devido à presença de lipídios no meio, a qual poderia interferir na leitura das absorvâncias. Os tubos foram agitados e submetidos ao vórtex e, finalmente, as amostras e padrões foram depositados em banho de gelo por 15 min. Posteriormente, a fase sobrenadante foi transferida para cubetas de poliestireno com auxílio de pipetas. As leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 580 nm contra a mistura de N-butanol e acetato de n-butanol. A absorvância dos padrões contendo o reagente branco foi subtraída dos padrões que continham o reagente resorcinol e construída a curva de calibração (massa de gangliosídeo x Absorvância) para a quantificação dos compostos de gangliosídios através da quantificação das moléculas de ácido siálico. A mesma diferença foi considerada para as amostras antes de se calcular as concentrações dos gangliosídios através da equação gerada pela curva de calibração.

4.3.2.3 - Determinação do raio hidrodinâmico e distribuição de tamanhos das vesículas

O raio hidrodinâmico e a distribuição de tamanhos das vesículas foram determinadas por espalhamento quase elástico da luz (“quasi-elastic light scattering”, QLS) em equipamento Malvern Autosizer 4700. O princípio desta técnica baseia-se na análise das flutuações das intensidades do espalhamento de luz em função do tempo devido ao movimento browniano das partículas em solução ou suspensão. A taxa de flutuação da intensidade do espalhamento de luz varia com o tamanho das partículas, isto é, as partículas menores se difundem mais rapidamente, apresentando uma flutuação de intensidade de luz mais rápida, enquanto que as partículas maiores, que se difundem mais lentamente, apresentam uma flutuação de intensidade de luz mais lenta.

Baseado nestas características das partículas, o coeficiente de difusão médio translacional (D) das partículas em solução pode ser medido e utilizado para o cálculo do raio hidrodinâmico médio das partículas, R_h , através da equação de Stokes-Einstein (New, 1990).

$$R_h = kT / (6 \pi \eta D) \quad (4.1)$$

onde k - Constante de Boltzmann ($1,3806 \times 10^{-23}$ J/K)

T - Temperatura absoluta (K)

η - Viscosidade do solvente (Pas)

D - Coeficiente de difusão das partículas (m^2/s)

R_h - Raio hidrodinâmico médio das partículas (m)

As medidas foram realizadas a um ângulo de 90° em relação ao feixe de raio laser incidente, conforme esquema da Figura 4.1.

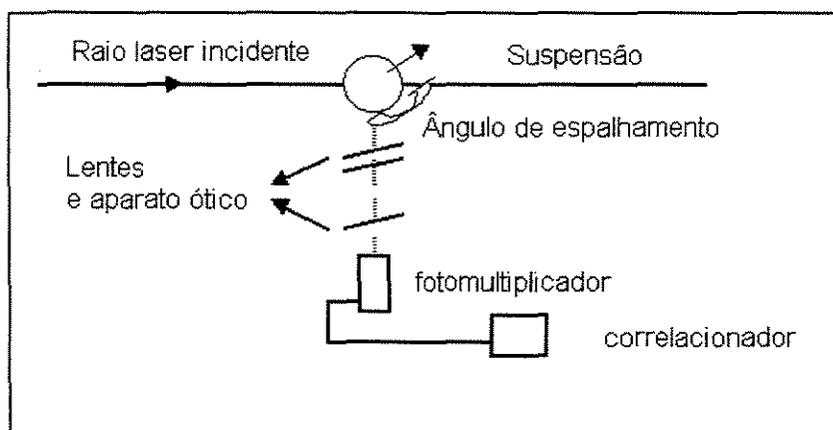


Figura 4.1 – Esquema do equipamento para determinação de medidas de tamanho de partículas (adaptado de Ostrowsky, 1993).

4.3.2.4 - Análise da estabilidade dos lipossomas

A estabilidade dos lipossomas, com relação à integridade da bicamada nas preparações, foi avaliada pelo monitoramento das medidas de turbidez total das soluções expressas em termos de absorvância na presença do tensoativo não iônico $C_{12}E_5$.

Quando as vesículas lipídicas interagem com tensoativos em diferentes concentrações, as soluções sofrem variações na sua turbidez. Essa turbidez é o reflexo de mudanças nas formas e tamanho das vesículas devido ao crescimento, fusão, lise e formação de micelas mistas pela ação dos tensoativos (Ribas, 1997).

As medidas de turbidez total das soluções foram feitas em placas de microtitulação de poliestireno, com 96 poços (200 μ L) de fundo redondo, a 340nm, empregando uma leitora de placas do tipo ELISA – “Microtiter plate reader”.

Em cada um dos poços da placa foram adicionados 120 μ L de solução estoque de tensoativo com diferentes concentrações (variando de 3 a 96%), diluído em solução salina (0,9% v/v) e 80 μ L de lipossomas de 2,5 mM. As amostras foram preparadas em duplicata e distribuídas conforme a Figura 4.2. Os valores médios das absorbâncias foram subtraídos das soluções de mesma concentração de tensoativo, mas isenta de lipossomas. Os poços contendo os brancos (br) são constituídos por 120 μ L de solução de tensoativo na concentração desejada e 80 μ L de solução tampão.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0%	5%	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	96%
B	0%	5%	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	96%
C	0%	5%	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	96%
D	br0	br5	br10	br20	br30	br40	br50	br60	br70	br80	br90	br96
E	3%	7%	15%	25%	35%	45%	55%	65%	75%	85%	93%	100%
F	3%	7%	15%	25%	35%	45%	55%	65%	75%	85%	93%	100%
G	3%	7%	15%	25%	35%	45%	55%	65%	75%	85%	93%	100%
H	br3	br7	br15	br25	br35	br45	br55	br65	br75	br85	br93	br100

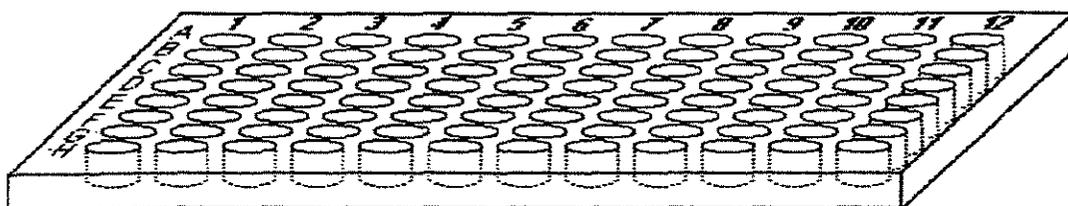


Figura 4.2 – Esquema da distribuição das amostras em placa de poliestireno do tipo ELISA.

4.3.2.5 – Determinação da temperatura de transição de fase

A temperatura de transição de fase foi determinada por microcalorimetria diferencial de varredura (DSC). O princípio desta técnica baseia-se no aquecimento simultâneo da amostra e referência (solução que não passa por transição de fase na faixa de temperatura de interesse) em celas com volumes iguais de 0,5 mL aproximadamente. Ambas as celas são submetidas a uma mesma temperatura e, inicialmente, a diferença de temperatura é nula. Entretanto, quando a amostra sofre uma transição endotérmica ou exotérmica, o sistema detecta esse gradiente de temperatura na amostra e fornece ou retira uma quantidade de energia necessária (calor de excesso ou calor diferencial) para manter ambas as temperaturas, amostra e referência, iguais. Se a amostra não passar por um evento térmico, obtém-se uma linha base horizontal denotando um diferencial de energia ou excesso de calor nulo. Na região de transição de fase, quando os lipídios em suspensão passam de uma fase gel, fortemente ordenados, para uma fase cristal líquida, quando a liberdade de movimento das moléculas é maior, o excesso de calor atinge o seu valor máximo, caracterizando a temperatura de transição de fase, T_m (McElhaney, 1982; New, 1990).

Nos ensaios realizados com os lipossomas foram feitas várias varreduras de 10-70 °C a uma taxa de 30 °C/h, utilizando solução salina como referência.

Os ensaios foram realizados com os lipídios DPPC, gangliosídeo, DHP e os lipossomas constituídos de gangliosídeos e DHP, tanto na presença como na ausência de colesterol.

4.3.2.6 – Caracterização estrutural dos lipossomas

Neste trabalho, o espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) foi usado para a caracterização estrutural dos lipossomas. Os estudos foram realizados com amostras de DPPC:Chol, DPPC:Chol:GM1, DPPC:Chol:GM1:DHP, DPPC:Chol:Mist e DPPC:Chol:Mist:DHP. Nessas amostras a razão molar DPPC:Chol nas estruturas foi de 1,5:1 e 1:1.

As medidas foram realizadas nas temperaturas de 22°C (abaixo da temperatura de transição da matriz lipídica), 45°C e 50°C (acima da temperatura de transição da matriz lipídica).

A Tabela 4.1 apresenta as composições dos lipossomas empregados.

Tabela 4.1– Lipossomas submetidos a estudos em SAXS

Proporção	Composição dos lipossomas
DPPC:Chol (1,5:1)	DPPC:Chol (60:40)*
	DPPC:Chol:GM1 (48:32:20)
	DPPC:Chol:GM1:DHP (45:30:20:5)
	DPPC:Chol:GM1:DHP (42:28:20:10)
	DPPC:Chol:Mist (48:32:20)
	DPPC:Chol:Mist:DHP(45:30:20:5)
	DPPC:Chol:Mist:DHP(42:28:20:10)
(DPPC:Chol) (1:1)	DPPC:Chol (50:50)
	DPPC:Chol:GM1(40:40:20)*
	DPPC:Chol GM1:DHP(40:35:20:5)*
	DPPC:Chol GM1:DHP(35:35:20:10)*
	DPPC:Chol:Mist(40:40:20)*
	DPPC:Chol:Mist:DHP(45:30:20:5)*
	DPPC:Chol:Mist:DHP(35:35:20:10)*

* Lipossomas MLVs administrados *in vivo*

O espalhamento de raios X a baixo ângulo é uma das técnicas utilizadas para o estudo das estruturas das vesículas. Todo processo de espalhamento é caracterizado pela lei de reciprocidade que fornece uma relação inversa entre o tamanho da partícula e o ângulo de espalhamento 2θ , conforme figura 4.3.

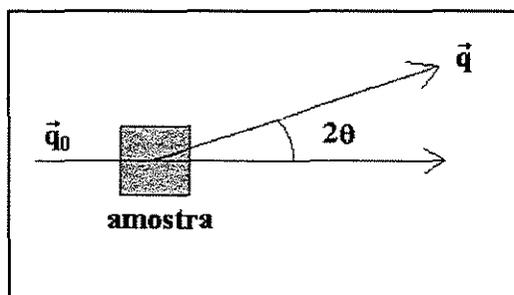


Figura 4.3 – Esquema da geometria para o espalhamento de raios X a baixo ângulo, sendo 2θ o ângulo de espalhamento, \vec{q}_0 o vetor da onda incidente, \vec{q} o vetor de espalhamento ($\vec{q} = 4\pi \sin \theta / \lambda$) (Cavalcanti, 2001).

Segundo Glatter (1991) e Cavalcanti (2001) o espalhamento de raios X a baixo ângulo é um processo de espalhamento elástico que ocorre quando o feixe de raios X atravessa a amostra e interage com os elétrons do material. A radiação espalhada pelos elétrons de cada átomo é distribuída isotropicamente e as ondas espalhadas interferem umas com as outras cancelando-se totalmente em algumas direções. Caso os centros espalhadores estejam no vácuo, a amplitude de espalhamento é proporcional ao número de moles de elétrons por unidade de volume, ou seja, à densidade eletrônica. Entretanto, se os centros espalhadores estão imersos em outro meio, apenas a diferença de densidade eletrônica será relevante no espalhamento de raios X. Neste caso, os centros espalhadores são vistos como inhomogeneidades, ou seja, flutuações na densidade eletrônica da amostra.

A técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo fornece informações estruturais sobre inhomogeneidades de densidade, podendo ser empregada para o estudo de poros de um sólido, nanocristais de uma matriz amorfa, micelas e vesículas em suspensão.

No caso de partículas em suspensão em um solvente, o espalhamento surge do contraste de densidade entre a partícula e o solvente, o qual pode ser muito fraco, necessitando a utilização de radiação síncrotron para os experimentos de raios X a baixo ângulo. A radiação síncrotron torna possível o registro dos dados de contrastes fracos com maior eficiência devido ao alto fluxo do feixe que incide sobre a amostra.

A amplitude $A(\mathbf{q})$ de um onda espalhada elasticamente na direção do vetor de espalhamento $\bar{\mathbf{q}}$ por um átomo localizado na direção $\bar{\mathbf{r}}$ pode ser expressa por:

$$A(\bar{\mathbf{q}}) = \rho(\bar{\mathbf{r}})e^{-i\bar{\mathbf{q}} \cdot \bar{\mathbf{r}}} \quad (4.2)$$

sendo: $\mathbf{q} = |\bar{\mathbf{q}}| = \left(\frac{4\pi}{\lambda}\right)\text{sen}\theta$

$\rho(\bar{\mathbf{r}})$: densidade eletrônica média do sistema

$e^{-i\bar{\mathbf{q}} \cdot \bar{\mathbf{r}}}$: fator de fase

A amplitude total espalhada $F(\bar{q})$ é a integral das ondas espalhadas por todos os átomos da amostra, ou seja, a amplitude total espalhada, ou fator de forma, $F(\bar{q})$, o qual é a transformada de Fourier da distribuição eletrônica da amostra.

$$F(\bar{q}) = \int \rho(\bar{r}) e^{-i\bar{q} \cdot \bar{r}} d\bar{r} \quad (4.3)$$

Na prática os experimentos de SAXS fornecem a intensidade da onda, ou seja, o módulo ao quadrado de $F(\bar{q})$:

$$I(\bar{q}) = |F(\bar{q})|^2 = FF^* \quad (4.4)$$

onde F^* é o complexo conjugado de F

$$I(\bar{q}) = \iint \rho(\bar{r}_1) \rho(\bar{r}_2) e^{-i\bar{q} \cdot (\bar{r}_1 - \bar{r}_2)} d\bar{r}_1 d\bar{r}_2 \quad (4.5)$$

Introduzindo a função $\Delta\bar{\rho}^2(\bar{r})$ como sendo a seguinte integral de convolução:

$$\Delta\bar{\rho}^2(\bar{r}) = \int \rho(\bar{r}_1) \rho(\bar{r}_1 - \bar{r}) d\bar{r}_1 \quad (4.6)$$

e substituindo na equação 4.5, fica:

$$I(\bar{q}) = \int \Delta\bar{\rho}^2(\bar{r}) e^{-i\bar{q} \cdot \bar{r}} d\bar{r} \quad (4.7)$$

e Calculando a média do fator de fase para um sistema com simetria esférica obtém-se a equação:

$$I(q) = \int 4\pi r^2 \Delta\bar{\rho}^2(r) \frac{\text{sen}qr}{qr} dr \quad (4.8)$$

a qual pode ser escrita como:

$$I(q) = \int 4\pi p(r) \frac{\text{sen}qr}{qr} dr \quad (4.9)$$

Sendo $p(r) = r^2 \Delta\bar{\rho}^2(r)$ a função de autocorrelação ou PDDF (“pair distance distribution function”) que expressa a probabilidade de encontrar um par de elétrons separados pela distância r .

Quando se introduz a integral de convolução, $\Delta\bar{\rho}^2(r)$, embute-se no cálculo uma diferença de densidade eletrônica que expressa exatamente as inhomogeneidades comentadas anteriormente. O espalhamento vai ser mais intenso quanto maior for o contraste entre as inhomogeneidades e o meio.

O tratamento dos dados de SAXS consiste em determinar $p(r)$ a partir da transformada de Fourier da intensidade $I(q)$ medida e, através da convolução de $\Delta\bar{\rho}^2(r)$, inferir sobre a distribuição de densidade eletrônica do sistema.

As medidas foram realizadas na linha de Espalhamento de Raios X a baixos ângulos (SAXS) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, SP e as amostras foram condicionadas em um porta amostras de mica (Cavalcanti/1999 – LNLS programa PCI/DTI) utilizando um comprimento de onda do raios-X de 1,608 Å e distância amostra-detector de 90,7 cm. Os espectros foram coletados usando um detector linear sensível à posição (PSD).

As curvas de SAXS foram normalizadas pelo tempo de aquisição de 15 a 30 minutos através da contagem integrada acumulada ao longo de todo o experimento e foram subtraídas das curvas de espalhamento da solução salina (espalhamento parasita). Também se fez a correção pela homogeneidade do detector (resposta do detector a cada canal) e atenuação da amostra. Todo este tratamento foi feito utilizando o software TRAT1D (Oliveira, 1998 – “LNLS internal Report”) e, para os ajustes dos dados corrigidos e cálculo da $p(r)$, foi empregado o software Gnom (Svergun, 1992).

Das curvas de espalhamento e da distribuição de distância pode-se obter informações sobre dimensões, forma e densidade eletrônica dos centros espalhadores.

4.3.2.7 – Morfologia dos lipossomas

A morfologia dos lipossomas constituídos de DPPC:Chol (60:40), DPPC:Chol:GM1 (40:40:20) e DPPC:Chol:Mist (40:40:20) foi avaliada pela microscopia eletrônica de transmissão (TEM).

Baseado na metodologia descrita por NEW (1990) e KOJIMA et al. (1987) foi utilizada a técnica de “negative staining”. Inicialmente telas de cobre (d=3mm; 200 mesh) foram cobertas com filmes de parlódio e carbono e as amostras de lipossomas depositadas na forma de gota. O excesso de amostra foi removido com papel de filtro (Whatman nº 1). Após aproximadamente 15 minutos, foi adicionado sobre a tela uma gota de corante negativo, acetato de uranila 2% (solubilizado em água deionizada) e seu excesso removido com papel de filtro como na remoção do excesso da amostra. Após esta etapa as telas ficaram em repouso até a secagem total das mesmas, antes da realização da microscopia.

A microscopia foi realizada no microscópio eletrônico Carl Zeiss, LEO 906, do Instituto de Biologia, no departamento de Biologia Celular da UNICAMP.

4.3.2.8 – Análise microbiológica dos lipossomas

Para avaliação microbiológica dos lipossomas, em termos de crescimento de bactérias, foram preparados meios de cultura para bactérias e semeados os lipossomas. A metodologia adotada foi baseada na de Cappuccino & Sherman (1992) onde o meio de ágar-nutriente foi colocado em placas de Petri previamente lavadas e autoclavadas. O meio ágar-nutriente para crescimento das bactérias nas placas de Petri foi constituído de peptona (5 g) e extrato de “beef” (3 g) para 1000 mL de água.

Com uma alça de platina os lipossomas foram transferidos para as placas de Petri em duplicata e, a seguir, flambadas e depositadas em estufa a 30^o C por pelo menos 24 horas. Após 24 horas não foi detectado crescimento de bactérias, o que descartou a necessidade de se fazer a coloração de Gram.

4.3.3 – Administração dos lipossomas

Para a administração dos lipossomas foram seguidos dois protocolos, o primeiro referente à administração do gangliosídeo GM1 e o segundo referente à

administração da mistura de gangliosídios Sinaxial[®]. Para cada protocolo foram considerados quatro grupos de animais, constituídos de quatro animais (n=4) por grupo. A Tabela 4.2 ilustra os protocolos e grupos experimentais.

Tabela 4.2 - Protocolos e grupos experimentais.

Protocolo	Grupo	Composição dos lipossomas
1	1	DPPC:Chol (60:40)
	2	DPPC:Chol:GM1 (40:40:20)
	3	DPPC:Chol:GM1:DHP (40:35:20:5)
	4	DPPC:Chol:GM1:DHP (35:35:20:10)
2	1	DPPC:Chol (60:40)
	2	DPPC:Chol:Mist (40:40:20)
	3	DPPC:Chol:Mist:DHP(40:35:20:5)
	4	DPPC:Chol:Mist:DHP(35:35:20:10)

Os camundongos Balb/c sem tratamento foram adotados como controle em todo o experimento.

Os animais foram pesados e imunizados a cada duas semanas com administração intra peritoneal (i.p.) de lipossomas num total de seis doses, sendo cada dose de 50 µg de gangliosídio por animal. Após duas semanas da última imunização, os animais foram anestesiados com Pentobarbital e uma punção no coração foi feita para coletar o sangue. O sangue foi coletado sem anticoagulante e deixado à temperatura ambiente para retração do coágulo e, posteriormente, centrifugado a uma velocidade de 3000 rpm / 15 min para separação do soro. Após esses procedimentos, os soros foram identificados e estocados à -20°C .

Segundo Johnstone & Thorpe (1987) camundongos respondem, geralmente, com boa produção de anticorpos administrando 50 µg ou até quantidades menores de antígeno.

4.3.4 - Avaliação dos efeitos imunomoduladores dos gangliosídeos via teste ELISA

Os efeitos imunomoduladores dos lipossomas associados aos gangliosídeos foram avaliados através de imunoensaio (ELISA) para a quantificação dos anticorpos anti-gangliosídeo de isotipos IgG e IgM presentes nos soros extraídos dos animais previamente imunizados (lipossomas contendo gangliosídeos) e sacrificados.

Os ensaios foram realizados com os soros descongelados uma única vez e pré tratados através de aquecimento à temperatura de 56 °C por 30 min com objetivo de inativar o sistema complemento (Johnstone & Thorpe, 1987)

Os experimentos foram realizados segundo metodologias descritas por Fernandes et al. (1990), Ponzin et al. (1991) e adaptados no Laboratório de Imunologia Clínica (LICA). Placas de poliestireno de fundo chato (96 poços) foram recobertas com 100µL de gangliosídeos solubilizados em metanol nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL e mantidos em repouso a 4 °C durante uma noite para a evaporação do solvente. Após secagem, as placas foram lavadas três vezes com 100µL de PBS-Tween 20 (0,05%), bloqueadas com solução salina fosfatada tamponada pH 7,4 (PBS)-soro fetal bovino(10%)-gelatina (0,1%) para evitar ligação não específica de proteínas. A seguir as placas foram incubadas por duas horas à temperatura ambiente e lavadas três vezes com PBS-Tween20 (0,05%). Em cada poço foram adicionados 100 µL de soro previamente diluído em solução de PBS nas proporções de 1:50 ou 1:100 e mantido à temperatura ambiente durante uma noite (16 horas).

Novamente as placas foram lavadas três vezes com PBS-Tween20 (0,05%) e nelas adicionadas 100µL dos anticorpos conjugados com peroxidase anti IgM e IgG de camundongo diluídos de 1:5000 em PBS e incubados por 90 min e, a seguir, lavados três vezes com PBS-Tween 20 (0,05%). Para a revelação da reação antígeno-anticorpo foram adicionados nos poços 100µL de substrato O-phenylenodiamina (OPD) e incubados por 30 min à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com a adição de 100 µL de ácido sulfúrico 1 N. Finalmente as placas foram submetidas à leitura de densidade óptica em espectrofotômetro

no comprimento de onda de 490 nm. A Figura 4.4 ilustra as etapas desse ensaio ELISA.

Os dados obtidos foram tratados estatisticamente pelo método da análise da variância (ANOVA), segundo Zar (1984), utilizando o software INSTAT para WINDOWS.

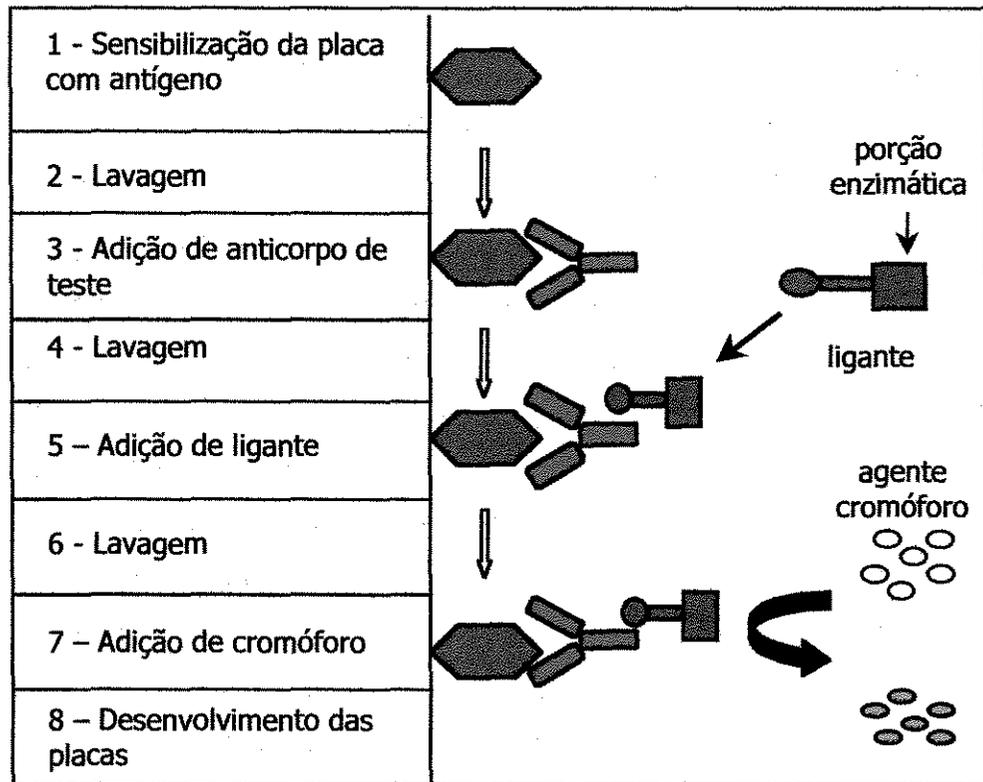


Figura 4.4 – Esquema do imunoenensaio (ELISA) adaptado de Roitt et al. (1996).

Capítulo 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Condições de processo para a preparação dos lipossomas

Com o objetivo de preparar lipossomas projetados para rápida eliminação da corrente sanguínea e direcionamento para o MPS em aplicações *in vivo*, foram estudadas condições operacionais para a preparação de vesículas grandes do tipo multilamelares (MLV), pois segundo Allen (1993), a taxa de eliminação dos lipossomas é diretamente proporcional ao diâmetro das vesículas, ou seja, as menores partículas são eliminadas mais lentamente da circulação e capturadas pelo MPS, quando comparada às partículas maiores.

Os resultados experimentais do planejamento fatorial descrito no item 4.3.1, mostraram que as velocidades de rotação na etapa de evaporação e hidratação dos lipossomas não apresentaram efeito significativo no crescimento da porcentagem de vesículas para as populações que apresentaram diâmetros médios maiores que 1000 nm. Na Tabela 5.1 são apresentados os valores dos efeitos para as variáveis em questão. Nestes experimentos buscou-se preparar lipossomas com tamanhos em uma faixa estreita de distribuição, ou seja, mais homogêneos, com uma maior porcentagem de partículas com diâmetros maiores que 1000 nm.

Tabela 5.1 – Efeito do tempo de processamento sobre o diâmetro médio (nm) e distribuição de tamanho das vesículas de DPPC-Chol, concentração de 2,5 mM de lipídio total. Velocidades de rotação e evaporação de 42 r.p.m.

Tempo de processamento (min)	Tamanho médio (nm)
Hidratação: 60 min	População 1: 76 (50%)
	População 2: 218 (37%)
	População 3: 1804 (13%)
Evaporação: 30 min Hidratação: 30 min	População 1: 1354 (54%)
	População 2: 5014 (46%)

Os números entre parênteses indicam a porcentagem de cada população.

Em uma segunda etapa, investigaram-se os efeitos do processo de congelamento e descongelamento nas preparações (Tabela 5.2). Essa técnica reduziu a porcentagem de partículas para as populações cujo tamanho de partículas era superior a 1000 nm, contrário ao que se buscava, aumentar a porcentagem de partículas com tamanho maiores que 1000 nm.

Tabela 5.2 – Tamanho médio e distribuição de tamanho dos lipossomas preparados usando a técnica de congelamento e descongelamento.

Número de ciclos Temperatura: 26°C	Tamanho médio (nm)
6	População 1: 157,1 (91,6%)
	População 2: 1535,6 (2,3%)
	População 3: 5648 (6,1%)
9	População 1: 141,6 (89%)
	População 2: 1821,1 (5%)
	População 3: 8560 (6%)
12	População 1: 140,5 (89,1)
	População 2: 1996,6 (5,3%)
	População 3: 7238 (6,15%)

Os números entre parênteses indicam a porcentagem de cada população.

De posse destes resultados, eliminou-se a necessidade do uso da técnica de congelamento e descongelamento e adotou-se a velocidade de rotação de 42 r.p.m. para as etapas de evaporação e hidratação e investigou-se a interferência do tempo de processo, em ambas as etapas. Os resultados apresentados na Tabela 5.1 mostram que o tempo de processamento de 30 minutos em ambas as etapas, evaporação e hidratação, produz uma distribuição de tamanhos mais estreita, com somente duas populações. As condições de processo: velocidades de rotação de 42 r.p.m. e tempo de processo de 30 minutos, para cada etapa foram, então, adotadas para a preparação das diferentes formulações de lipossomas em todo o trabalho, apesar da elevada polidispersidade característica de lipossomas do tipo MLV.

Devido à alta polidispersidade, aproximadamente igual a um, das dispersões com vesículas multilamelares, os diâmetros médios e a distribuição de tamanhos não devem ser consideradas em valores absolutos, mas dentro de uma faixa.

A incorporação dos gangliosídios (GM1 e Mist) nos lipossomas foi total, verificada através da cromatografia de permeação em gel Sephadex CL4B, bem como por centrifugação através da análise dos sobrenadantes das preparações.

Neste trabalho foram estudadas sete formulações cujas composições são especificadas na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Formulações e concentrações em porcentagem molar (mol%) dos lipossomas estudados.

Composição Lipídica	Razão Molar
DPPC:Chol	60:40
DPPC:Chol:GM1	40:40:20
DPPC:Chol:GM1:DHP	40:35:20:5
DPPC:Chol:GM1:DHP	35:35:20:10
DPPC:Chol:Mist	40:40:20
DPPC:Chol:Mist:DHP	40:35:20:5
DPPC:Chol:Mist:DHP	35:35:20:10

A concentração dos gangliosídios em todas as formulações foi de 20 mol%, a qual foi baseada em trabalhos anteriores de Sillerud et al. (1979) e Bedu-Addo & Huang (1996), os quais verificaram que o gangliosídio GM1 poderia ser incorporado nas estruturas multilamelares de DPPC até uma concentração máxima de 25 mol% sem a formação de micelas.

5.2 – Caracterização dos lipossomas

5.2.1 - Medidas da distribuição de tamanho das vesículas MLV's

Na Tabela 5.4 são apresentadas, para as diferentes formulações de lipossomas, as distribuições de tamanho das populações de vesículas MLV's e a porcentagem de cada população.

Tabela 5.4 – Distribuição de tamanho dos lipossomas MLV's. Concentração total de lipídios: 2,5 mM.

Composição dos Lipossomas	Distribuição de tamanho (nm)
DPPC:Chol (60:40 mol%)	População 1: 430 (18%) População 2: 1560 (82%)
DPPC:Chol :GM1 (40:40:20)	População 1: 362 (71%) População 2: 3320 (29%)
DPPC:Chol :GM1:DHP (40:35:20:5)	População 1: 581 (44%) População 2: 4714 (56%)
DPPC:Chol :GM1:DHP (35:35:20:10)	População 1: 518 (18%) População 2: 3398 (82%)
DPPC:Chol :Mist (40:40:20:)	População 1: 336 (58%) População 2: 2854(42%)
DPPC:Chol :Mist:DHP (40:35:20:5)	População 1: 306 (36%) População 2: 4000(64%)
DPPC:Chol :Mist:DHP (35:35:20:10)	População 1: 326 (60%) População 2: 3341(40%)

Os números entre parênteses indicam a porcentagem de cada população.

Observa-se a presença de duas populações bem definidas para as diferentes composições de lipossomas, cuja faixa de tamanho médio das vesículas varia de 306 a 581 nm para a população contendo as menores vesículas e 1560 a 4714 nm para a população contendo as maiores vesículas.

5.2.2 - Avaliação da estabilidade dos lipossomas na presença de tensoativo não iônico (C₁₂E₅)

A avaliação da estabilidade dos lipossomas em presença de tensoativo tem a finalidade de verificar a integridade da bicamada lipídica e o seu grau de empacotamento. A penetração dos tensoativos na bicamada lipídica tende a desestruturá-la, desestabilizando as vesículas. As bicamadas que apresentam maior grau de empacotamento são mais resistentes ao ataque do tensoativo.

As variações da turbidez das soluções em função das concentrações de tensoativo refletem as mudanças estruturais e morfológicas das vesículas. Deste modo, o comportamento típico prevê uma fase inicial, a baixas concentrações de tensoativo, onde ocorre o intumescimento das estruturas, sem aumentos significativos do tamanho das vesículas. Esta fase é seguida pelo aumento de tamanho das vesículas, com a penetração do tensoativo a níveis médios de concentração, e conseqüente aumento expressivo da intensidade de espalhamento das soluções, devido à agregação das vesículas. À elevadas concentrações de tensoativo as vesículas são desestabilizadas, formando micelas, com conseqüente redução da intensidade de espalhamento das soluções.

Os perfis de intensidade de espalhamento versus concentração de tensoativo obtidos para as vesículas multilamelares constituídas de DPPC:Chol (60:40), DPPC:Chol:GM1(40:40:20), DPPC:Chol:GM1:DHP(40:35:20:5) e DPPC:Chol:GM1:DHP(35:35:20:10), na presença de tensoativo não iônico, C₁₂E₅, são apresentados na Figura 5.1.

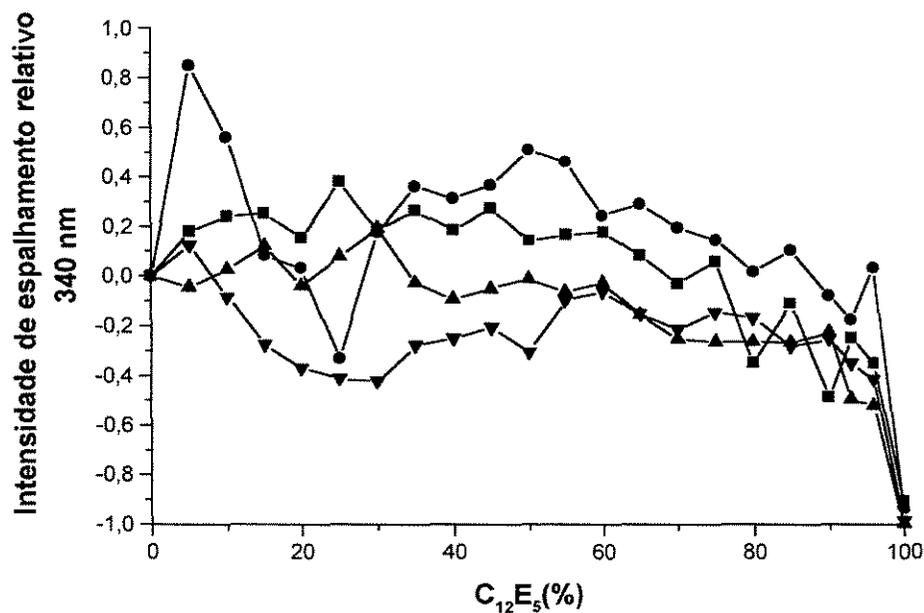


Figura 5.1 – Curvas de intensidade de espalhamento para lipossomas com diferentes composições em %molar para (■)DPPC:Chol(60:40), (●)DPPC:Chol:GM1(40:40:20), (▲)DPPC:Chol:GM1:DHP(40:35:20:5), (▼)DPPC:Chol:GM1:DHP(35:35:20:10) na presença de tensoativo não iônico C₁₂E₅ na temperatura ambiente.

Os resultados mostram que, para a matriz lipídica DPPC:Chol, não houve crescimento expressivo do tamanho das vesículas em níveis médios de concentração de tensoativo, indicando boa estabilidade e bom empacotamento das bicamadas lipídicas, provavelmente pela elevada concentração de colesterol usada na preparação. A estabilidade dos lipossomas com o gangliosídeo GM1 foi ainda maior, com pouco desvio dos perfis em relação ao ponto inicial, o que já era previsto, devido à barreira de hidratação na superfície das vesículas imposta pela presença dos gangliosídeos, a qual dificulta a penetração do tensoativo. No perfil correspondente à preparação com 10% de DHP, observa-se queda expressiva nos valores das absorbâncias, indicando desestabilização das estruturas, mesmo a baixas concentrações de tensoativo.

A Figura 5.2 apresenta os perfis de estabilidade para os lipossomas constituídos de DPPC:Chol (60:40), DPPC:Chol:Mist (40:40:20),

DPPC:Chol:Mist:DHP(40:35:20:5) e DPPC:Chol:Mist:DHP (35:35:20:10), na presença de tensoativo não iônico, $C_{12}E_5$.

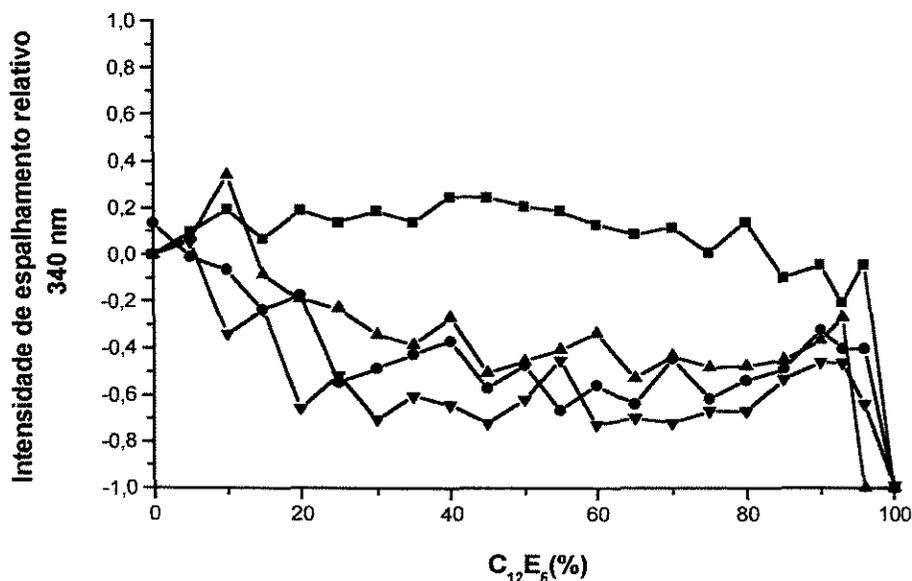


Figura 5.2 – Curvas de intensidade de espalhamento para os lipossomas com diferentes composições em %molar para (■) DPPC:Chol(60:40), (●)DPPC:Chol:Mist (40:40:20), (▲) DPPC:Chol:Mist:DHP (40:35:20:5), (▼)DPPC:Chol:Mist:DHP (35:35:20:10) na presença de tensoativo não iônico $C_{12}E_5$ na temperatura ambiente.

Para as vesículas constituídas da Mistura de gangliosídeos, Mist, é notória a queda da densidade óptica em praticamente todas as concentrações de tensoativo estudados, indicando redução da estabilidade em relação à matriz lipídica DPPC:Chol, desde os lipossomas constituídos de DPPC:Chol:Mist (40:40:20) até os constituídos de DPPC:Chol:Mist:DHP(40:35:20:5) e DPPC:Chol:Mist:DHP (35:35:20:10). Estes perfis sugerem que os tensoativos penetram com maior facilidade nas vesículas que contém a mistura de gangliosídeos que a constituída com GM1, devido às maiores interações eletrostáticas na mistura (presença de mais resíduos de ácido siálico). Esse efeito

deve-se, provavelmente, às maiores forças de repulsão das cadeias de polissacarídeos na superfície dos lipossomas as quais, não sendo bem contrabalançadas pelas forças coesivas da bicamada, tornam as vesículas mais susceptíveis à desestabilização pela penetração do tensoativo.

5.2.3 – Temperatura de transição de fase

A compreensão da transição de fase e fluidez das bicamadas de fosfolípidios é importante tanto para a preparação como para a investigação dos lipossomas, pois a transição de fase das bicamadas dos lipossomas determina propriedades tais como permeabilidade, fusão, agregação, afetando em geral a estabilidade das vesículas e seu comportamento em sistemas biológicos. O comprimento da cadeia acila, a presença de insaturações e as cabeças polares são alguns dos fatores que mais influenciam na temperatura de transição de fases.

Com o aumento da temperatura as cadeias de ácido graxo mudam suas conformações de trans para gauche, expandindo a área ocupada pelas cadeias e conseqüentemente, das bicamadas. Ao mesmo tempo há redução do comprimento total das cadeias de hidrocarboneto, levando à redução da rigidez da bicamada até a transição da fase gel para a líquida cristalina. Esta transição envolve duas transições, a pré-transição e a transição de fase principal. Na pré transição as bicamadas adotam uma aparência ondulada, na qual ela é transformada de uma superfície planar a uma superfície ondulada com periodicidade regular e a entalpia desta transição é bem inferior a entalpia da transição principal, New(1990).

O termograma para o DPPC puro (Figura 5.3), apresenta a temperatura de pré-transição de fase (T_{pt}) de $32,39^{\circ}\text{C}$ e a temperatura de transição de fase principal (T_m) de $41,25^{\circ}\text{C}$. Esses resultados estão de acordo com trabalhos anteriores de Beddu-Addo & Huang (1996) cujas temperaturas relativas à pré transição e transição principal foram de $32,6^{\circ}\text{C}$ e $41,6^{\circ}\text{C}$ respectivamente.

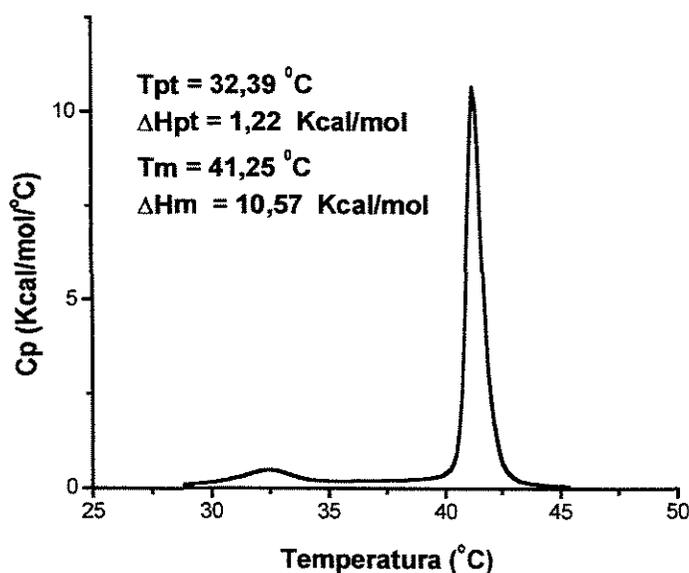


Figura 5.3 – Termograma de DSC de vesículas multilamelares de DPPC.

Para as vesículas constituídas de DPPC:Chol, cuja concentração de colesterol era superior a 35 % molar, não foi detectada transição de fases nos termogramas de DSC o que está de acordo com trabalho anterior de Mabrey et al. (1978) os quais observaram que a transição de fase de gel – líquido desaparecia a partir de concentrações de 33 mol% de colesterol, quando a bicamada apresentava uma molécula de colesterol para duas de DPPC.

Entretanto, para as vesículas constituídas de DPPC:Chol (80:20) % molar (Figura 5.4), detectou-se relativamente pouquíssimo efeito sobre a T_m , em relação à obtida para DPPC na sua forma pura, o qual variou de $41,25\text{ °C}$ para $41,04\text{ °C}$ na presença do colesterol, o que demonstrou que o colesterol nesta concentração tem muito pouco efeito na temperatura da transição de fase, mas grande sobre a entalpia de transição, ΔH_m , reduzindo-a de $10,57\text{ Kcal/mol}$ para $1,402\text{ Kcal/mol}$ o que já foi extensamente discutido por New (1990) sobre o efeito do colesterol em membranas de fosfolípidios.

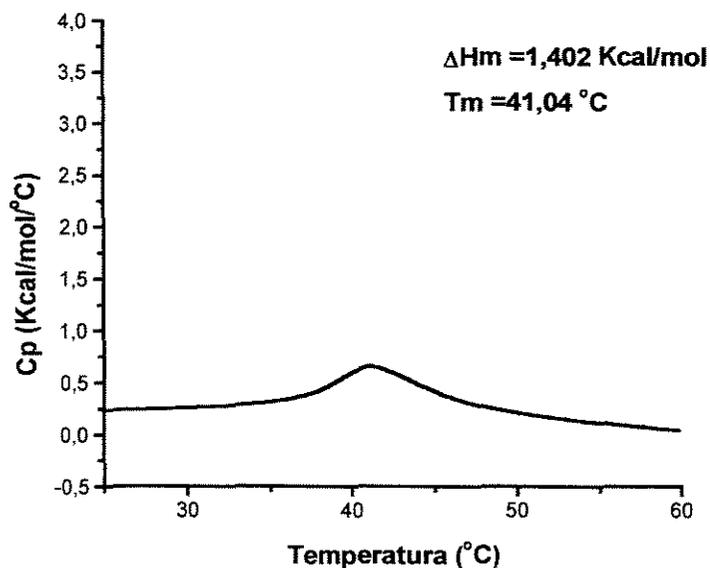


Figura 5.4 – Termograma de DSC de vesículas constituídas de DPPC:Chol (80:20 mol %).

Na ausência do colesterol a transição de fases representa uma mudança de uma bicamada condensada com as cadeias dos hidrocarbonetos dos lipídios bem ordenados para uma bicamada com um empacotamento menos rígido e cadeias de hidrocarbonetos menos ordenadas (Figura 5.5(a)). Entretanto a presença do colesterol induz a uma desordem das cadeias de hidrocarbonetos na fase gel em baixas temperaturas e uma parcial ordenação na fase líquida em temperaturas maiores. Assim, é atingido um estado intermediário, o qual mantém um grau moderado de mobilidade interna ao longo de uma faixa de temperatura (Figura 5.5(b)).

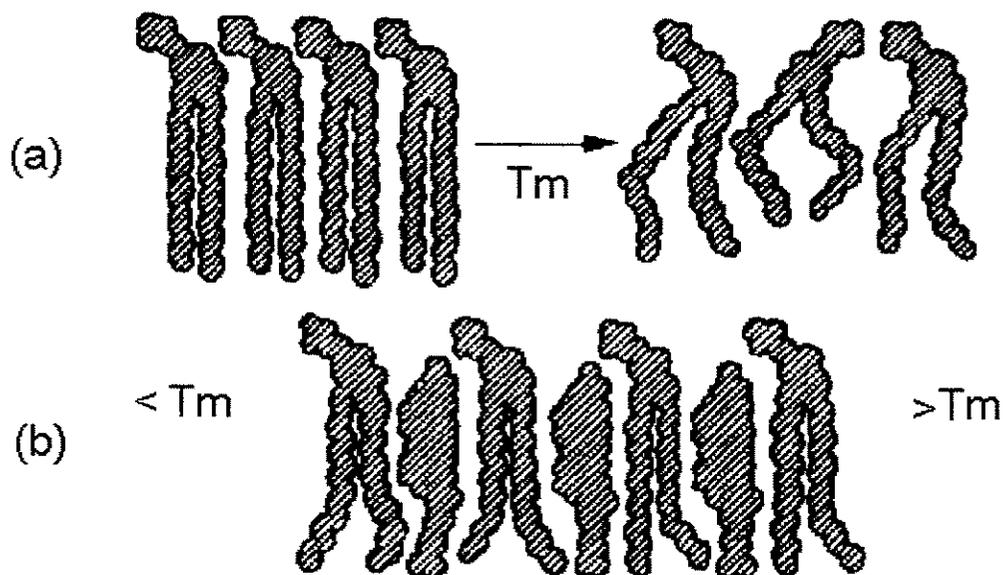


Figura 5.5 – Diagramas moleculares para: (a) fosfolípido puro na fase gel, abaixo da temperatura de transição T_m e fase líquida, acima da T_m . (b) mistura de fosfolípido/colesterol no estado intermediário. Colesterol induz ordenação parcial das cadeias de hidrocarbonetos, os quais retêm um grau limitado de mobilidade sobre uma larga faixa de temperatura. Figura adaptada de Warren, 1987.

Para o lipídio DHP, Figura 5.6, a transição de fases foi detectada na temperatura de $67,61^{\circ}\text{C}$, a qual foi também observada em trabalho prévio de Carmona-Ribeiro e Hix (1991).

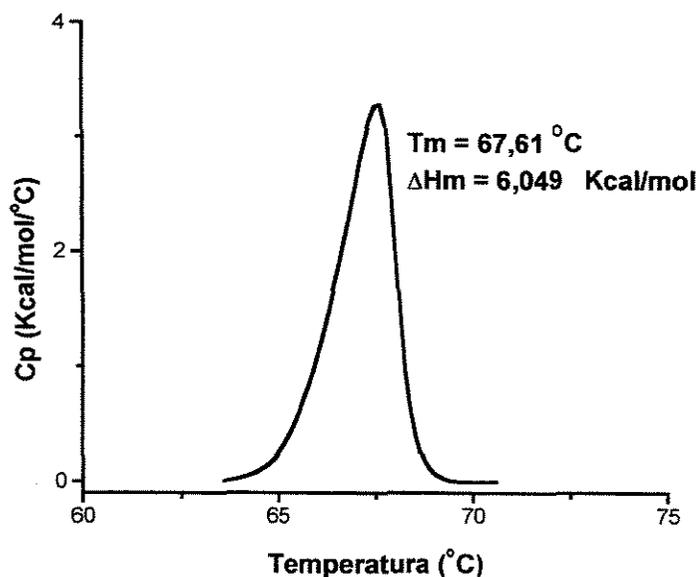


Figura 5.6 – Termograma de DSC de vesículas de DHP.

Para os gangliosídeos GM1 e Mist dispersos em água não foram detectadas as temperaturas de transição de fase em experimentos realizados entre $10\text{ }^\circ\text{C}$ a $80\text{ }^\circ\text{C}$. Tentativas anteriores de detecção de transição de fases para gangliosídeos foram também realizadas por Sillerud et al. (1979) para GM1 e por Kojima et al. (1988) para detecção da transição de fase de GM1, GD1a e GD1b. Em ambos os trabalhos não se detectou a temperatura de transição de fase.

O estudo com microcalorimetria diferencial de varredura (DSC) dos efeitos isolados do GM1 e Mist sobre as vesículas de DPPC são ilustrados na Figura 5.7.

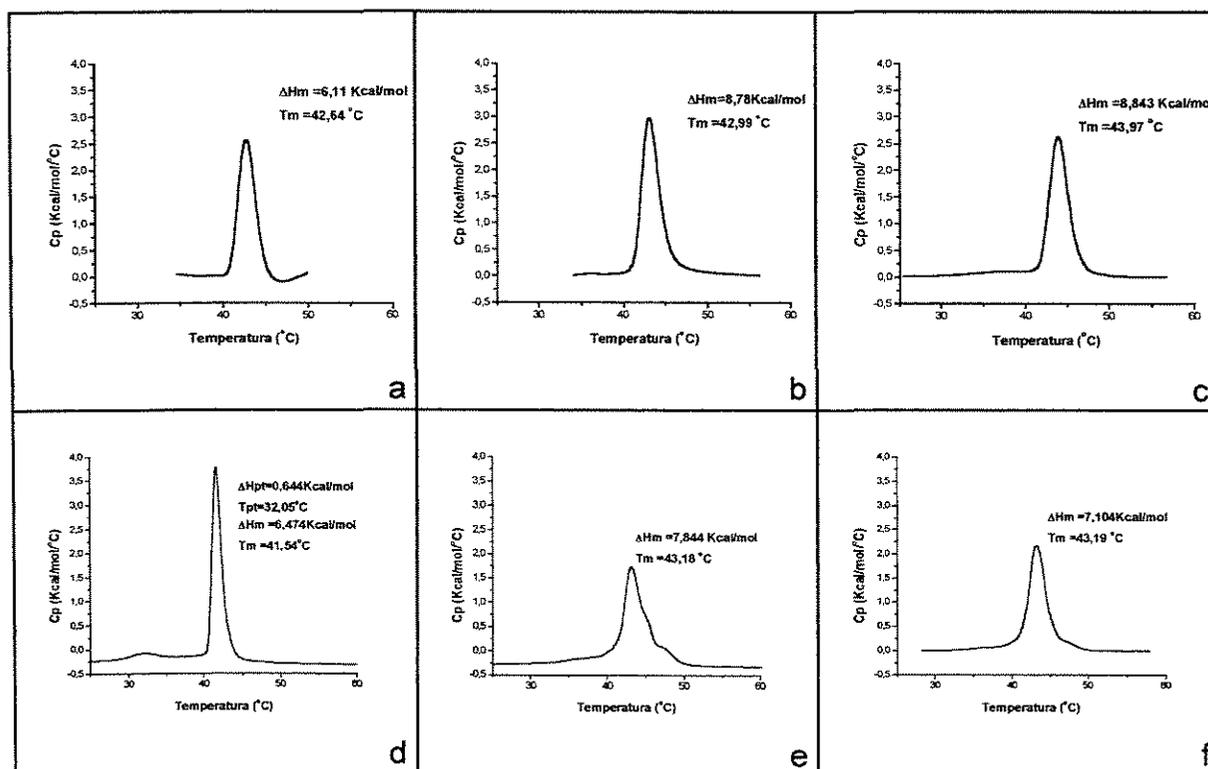


Figura 5.7 – Termogramas de vesículas de DPPC contendo (a)8, (b)10, (c)20 % molar de GM1 e (d) 6, (e) 10, (f)20 % molar de Mist.

Os termogramas de DSC obtidos para DPPC como função do aumento das concentrações de GM1 são apresentados nas Figuras 5.7 a, b, c. Esses resultados estão de acordo com trabalhos anteriores de Sillerud et al. (1979) e Beddu-Addo & Huang (1996) para a mistura de DPPC:GM1. Observa-se uma redução da altura do pico da transição de fase e um pequeno acréscimo da largura da transição de fases, de 41,25 °C do DPPC puro para 42,64 °C, 42,99 °C e 43,97 °C para adições de 8, 10 e 20 % molar de GM1.

Para a entalpia de transição detectou-se uma redução da mesma de 42%, 17% e 16% em relação ao DPPC puro.

Esses dados nos mostram que GM1, até 20% molar, considerado neste estudo, causa uma perturbação nas transições características de DPPC das estruturas lamelares, mas não introduz uma nova transição, sugerindo assim a coexistência de uma única fase lamelar, com todo o gangliosídeo incorporado na

superfície dos lipossomas, sem a formação de micelas de ambos lipídios, o que foi detectado por estudos anteriores de Sillerud et al. (1979).

O efeito de redução da altura do pico de transição de fase e um pequeno acréscimo da temperatura de transição de fase, observado nos termogramas constituídos de DPPC:GM1, foi observado também para DPPC:Mist. Para a T_m verifica-se uma variação de 41,25 °C (DPPC puro) para 43,18 °C e 43,19 °C com a adição respectiva 10 e 20 %molar de GM1. A temperatura de pré transição não foi abolida com a concentração de 6 %molar de Mist, prevalecendo as características físicas do lipídio DPPC. A incorporação do gangliosídeo Mist na superfície dos lipossomas influenciou mais fortemente na redução da altura do pico da transição de fase das vesículas de que o GM1, sugerindo que a concentração maior das cargas negativas pela mistura de gangliosídios demandou uma energia maior para tornar mais fluidas as bicamadas lipídicas.

Esses resultados sugerem um aumento da rigidez da bicamada lipídica na presença de gangliosídios, tanto GM1 como Mist, inferindo uma redução da fluidez da bicamada, pelo incremento de temperatura principal de transição de fase.

Após avaliação do efeito dos gangliosídios sobre o DPPC, foram preparadas vesículas de DPPC com concentrações fixas de 20 % molar dos gangliosídios e concentrações variadas de 5 e 10 % molar de DHP para estudo de seus efeitos, os quais são apresentados nas Figuras 5.8 a, b, c, d.

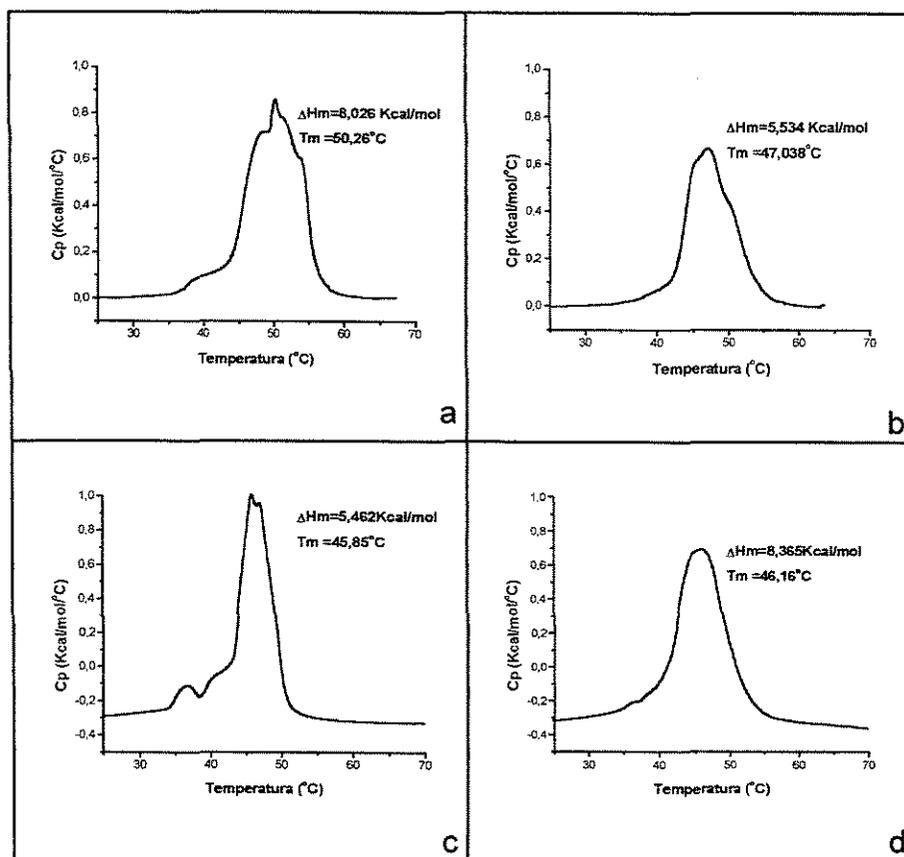


Figura 5.8 – Termogramas de vesículas constituídas de (a) DPPC:GM1:DHP (75:20:5), (b) DPPC:GM1:DHP(70:20:10), (c)DPPC:Mist:DHP(75:20:5), (d) DPPC:Mist:DHP (70:20:10) em % molar.

Para ambas as vesículas, tanto as constituídas de GM1 como as com Mist, o DHP influenciou na transição de fase aumentando a temperatura na qual as bicamadas passam da fase gel para a fase líquida, sugerindo que estas vesículas absorvem mais calor para passar por essa transição o que claramente pode ser atribuído ao aumento das cargas polares negativas inferidas pelo DHP.

5.2.4 – Morfologia dos lipossomas

Na técnica de “negative staining” a imagem dos lipossomas aparece na micrografia em contraste negativo devido ao filme de corante formado na superfície dos lipossomas. A probabilidade de espalhamento elástico de luz é

diretamente relacionada com o número atômico e, portanto, as bicamadas, constituídas de fosfolípidios, as quais são compostas principalmente de carbono e hidrogênio, espalham relativamente poucos elétrons. Portanto, a produção do contraste é devido à presença do metal pesado no corante, responsável pelo forte espalhamento de elétrons e produção da imagem negativa.

As micrografias, obtidas através da microscopia eletrônica de transmissão usando a técnica de “negative staining” para avaliação da morfologia dos lipossomas, são apresentadas nas Figuras 5.9, 5.10 e 5.11.

As Figuras 5.9, ambas a e b, apresentam as estruturas das vesículas constituídas de DPPC:Chol (60:40 mol%), onde se pode observar nos campos escuros a heterogeneidade de tamanhos devido à natureza multilamelar dos lipossomas e/ou a presença de agregados na amostra.

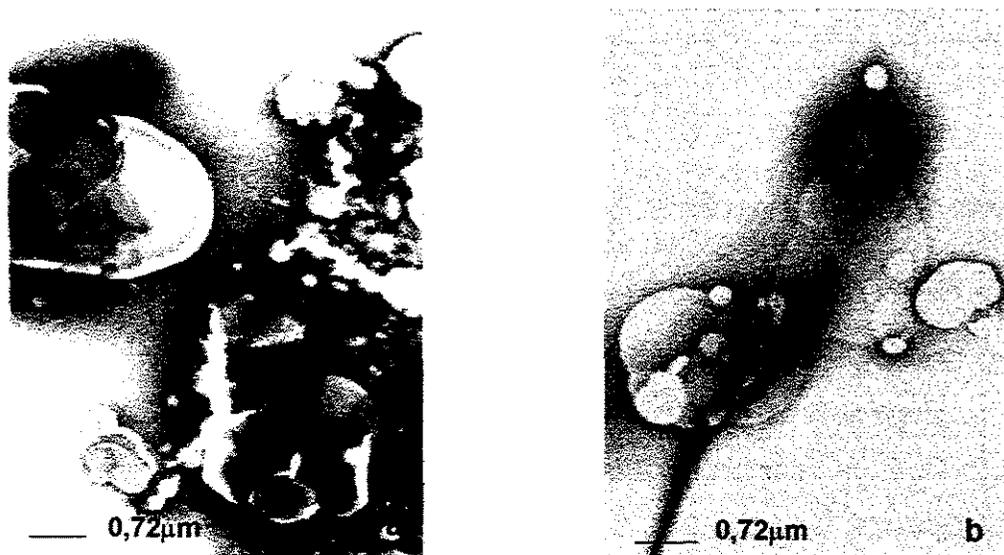


Figura 5.9 – Microscopia eletrônica de transmissão de vesículas multilamelares constituídas de DPPC:Chol (60:40 mol%). a)16700 X, b) 16700X.

Nas Figuras 5.10 a e b pode observar melhor definição do delineamento da superfície dos lipossomas, comparada às Figuras 5.9 a e b, apesar da sobreposição de vesículas visualizada pelos campos mais escuros nas imagens,

decorrente da maior densidade eletrônica nestas regiões. Esta melhor definição deve ser provavelmente à presença dos gangliosídeos na superfície dos lipossomas dificultando a formação de agregados. Pode se observar também a presença nítida de duas regiões com contornos mais escuros separadas por uma faixa clara, delineando as imagens. Estas regiões tornam-se mais evidentes nas imagens da Figura 5.10a, quando foi usada maior ampliação.

Esses efeitos provavelmente são decorrentes da presença dos gangliosídeos, tanto GM1 como Mist, nas superfícies dos lipossomas. Assim o contorno escuro mais interno representa a superfície da bicamada lipídica, a região clara denota a presença das cadeias de polissacarídeos dos gangliosídeos presas às superfícies numa configuração “brush”. O contorno escuro mais externo sugere a presença do filme de corante, delineando a superfície dos lipossomas modificada pelos gangliosídeos. Efeitos semelhantes foram observados em micrografias de lipossomas com as superfícies modificadas com PEG, cuja evidência da localização do polímero nas imagens foi confirmada por espalhamento de raios X, nêutrons e síncrotron (Lasic, 1993).

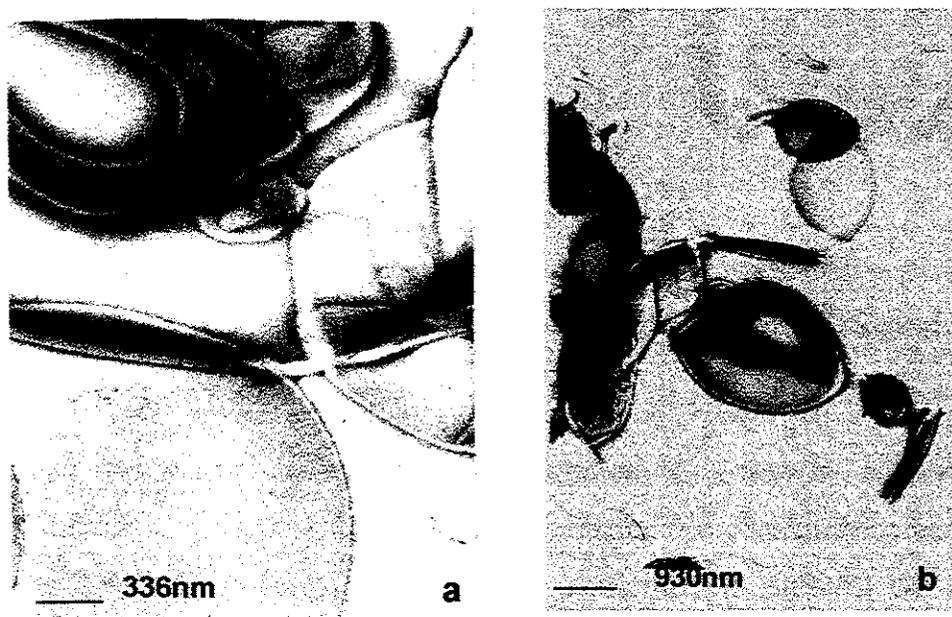


Figura 5.10 – Microscopia eletrônica de transmissão de vesículas multilamelares constituídas de DPPC:Chol:GM1 (40:40:20 mol%). a) 35970 X, b) 12930 X.

Esses resultados também confirmam a tendência de distribuição de tamanhos detectados pela técnica de espalhamento de luz (QLS), onde as medidas mostraram que os lipossomas eram polidispersos com tamanhos de vesículas variando de 300 a 500 nm para a população contendo as menores vesículas e 1000 a 4000 nm para a população contendo as maiores vesículas. O diâmetro da partícula apresentada na Figura 5.11a é de, aproximadamente, 1417 nm.

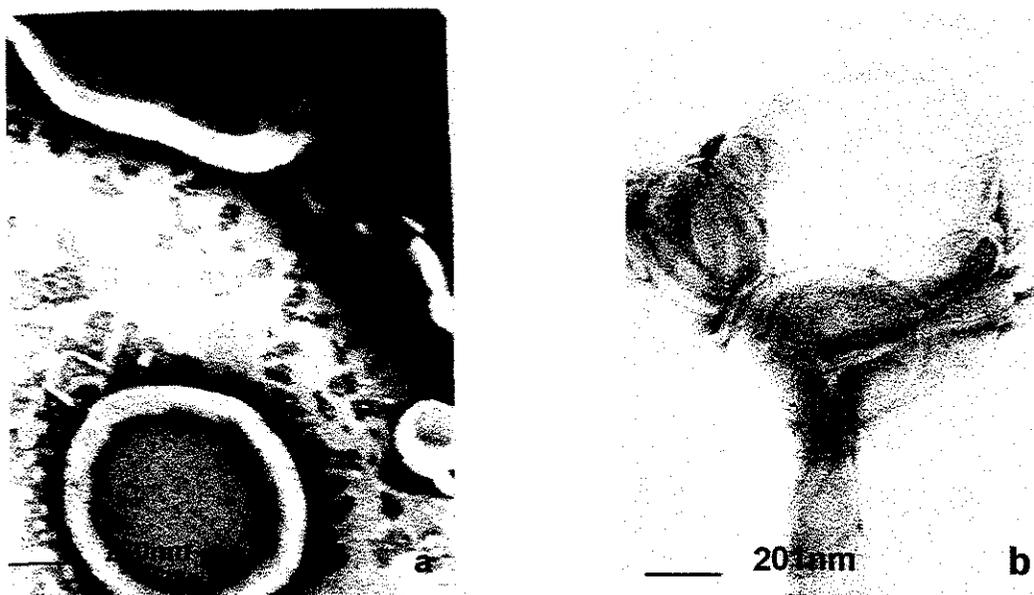


Figura 5.11 – Microscopia eletrônica de transmissão de vesículas multilamelares constituídas de DPPC:Chol:Mist (40:40:20 mol%). a) 46460 X, b) 60000 X.

Nestas imagens é notória a forma aproximadamente esférica dos lipossomas confirmando a incorporação dos gangliosídeos na bicamada lipídica e ausência de micelas. Micrografias obtidas por Kojima et al. (1988), usando a mesma técnica para vesículas multilamelares de DPPC contendo GM1, evidenciaram que o aumento da concentração de GM1 de 20 para 31 mol% levava ao desaparecimento da forma lamelar e aparecimento de micelas cilíndricas e esféricas (com dimensões muito menores que as dos lipossomas).

5.2.5 - Caracterização estrutural dos lipossomas

As curvas de espalhamento de raios X a baixo ângulo obtidas com as amostras descritas no item 4.3.2.6, apresentados na Figura 5.12, mostram espectros de intensidade $I(q)$ em função do vetor de espalhamento q , os quais fornecem informações sobre o tamanho e a estrutura dos lipossomas.

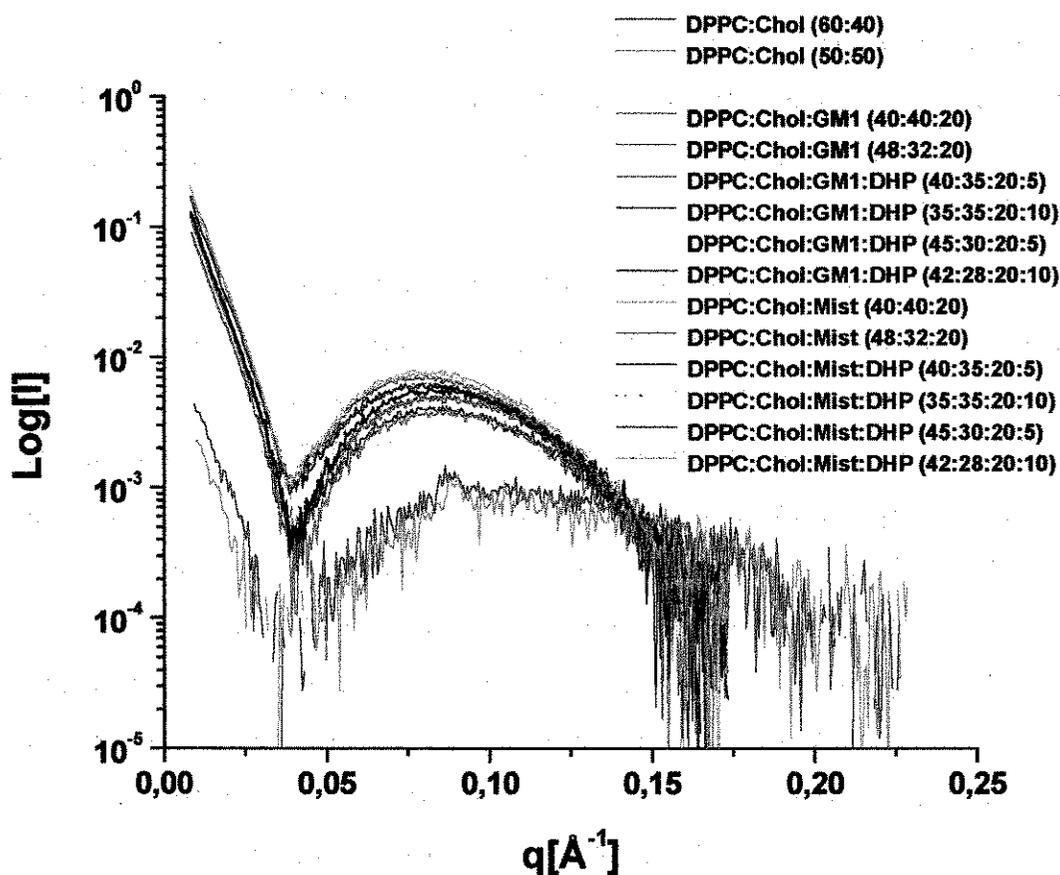


Figura 5.12 – Curvas de espalhamento de SAXS, a 22 °C, para lipossomas do tipo MLV em solução salina 0,9%.

O trecho inicial das curvas (para $q \rightarrow 0$), que poderia dar informação direta sobre o tamanho dos lipossomas, mostra um crescimento muito pronunciado, o que indica que o sistema é polidisperso e contém vesículas muito grandes, cujas dimensões estão fora do limite de detecção da técnica de SAXS ($\cong 1000 \text{ \AA}$).

Entretanto, os máximos e mínimos das curvas de espalhamento estão relacionados com a estrutura lamelar dos lipossomas e permitem comparar as estruturas e dimensões dos lipossomas que dão origem ao espalhamento. Estas curvas podem ser agrupadas em dois conjuntos, o das matrizes DPPC:Chol, nas duas composições (60:40) e (50:50) e o dos lipossomas contendo o gangliosídeo GM1 ou a mistura de gangliosídios (Mist) e DHP. Para as matrizes, a semelhança entre as curvas de espalhamento indica que não há diferença significativa entre as estruturas lamelares dos lipossomas (bicamada única com praticamente a mesma espessura) quando a razão DPPC:Chol varia de 1,5:1 a 1:1. A modificação da superfície dos lipossomas com GM1, Mist e DHP produz estruturas lamelares semelhantes entre elas, mas diferentes das correspondentes a DPPC:Chol.

O primeiro mínimo das curvas de espalhamento, correspondente às matrizes, ocorre para valores maiores de q , indicando que essas estruturas são menores e menos organizadas (baixa definição dos dados experimentais) quando comparadas àquelas contendo os gangliosídios e DHP. Esses resultados mostram que a organização das estruturas está diretamente ligada ao empacotamento da bicamada lipídica. No caso dos lipossomas contendo gangliosídeo, o balanço entre as forças coesivas da bicamada contendo colesterol e a parte hidrofóbica (ceramida) dos gangliosídios, contrabalançado pelas forças repulsivas das cadeias de polissacarídeos presentes na superfície das vesículas produz estruturas mais organizadas que as das matrizes lipídicas. A posição do mínimo dos perfis, relativos aos lipossomas com gangliosídios (deslocado valores menores de q), corresponde a estruturas lamelares maiores, devido à presença das cadeias de polissacarídeos na superfície das vesículas.

O aumento da intensidade relativa do espalhamento nas vesículas contendo gangliosídeo pode ser atribuído a um maior contraste no perfil de densidade eletrônica das bicamadas. Esse efeito provavelmente deve-se ao aumento das cargas negativas na superfície devido à presença de ácido siálico nas moléculas de gangliosídios e do DHP. Por outro lado, a diferença da posição dos pontos de máxima intensidade entre as curvas dos dois conjuntos, indica

diferenças entre as espessuras das bicamadas, com maior espessura atribuída aos lipossomas com gangliosídeos. Provavelmente a indicação de maior espessura seja atribuída não só às bicamadas lipídicas, mas também à camada de hidratação que se forma na superfície das vesículas devido à presença das cadeias de polissacarídeos presentes nos gangliosídeos.

As funções de distribuição de distâncias $p(r)$, calculadas a partir das curvas de intensidade, apresentadas na Figura 5.13, expressam a probabilidade de encontrar um par de elétrons separados pela distância r .

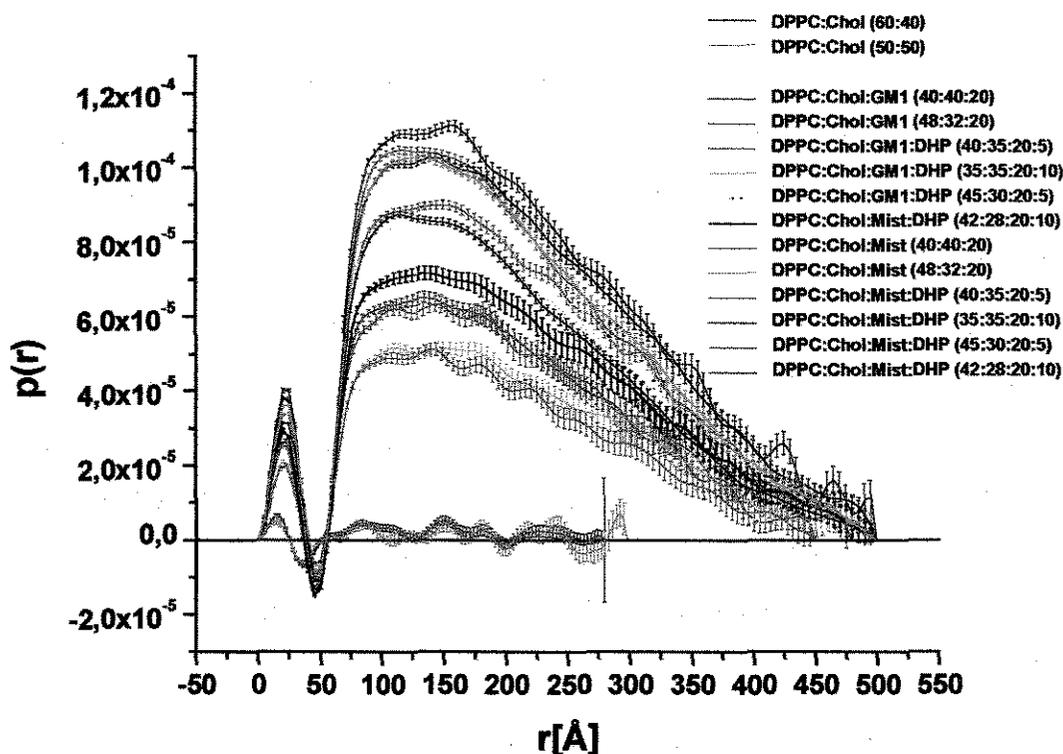


Figura 5.13 – Funções de $p(r)$ para lipossomas do tipo MLV, a 22 °C, em solução salina 0,9%.

Esses perfis apresentam comportamento típico de vesículas lamelares, de acordo com Glatter (1991). Do mesmo modo, os perfis dessas figuras podem ser agrupados em dois conjuntos: o das matrizes lipídicas e o dos lipossomas contendo gangliosídeos. Nessas funções, as duas primeiras oscilações correspondem a uma bicamada (indicação de que os lipossomas estudados são

em sua maioria LUVs). Nota-se que as curvas dos dois conjuntos interceptam o eixo r em pontos muito próximos. Esse efeito indica que as espessuras das bicamadas não são muito diferentes. Nas estruturas das matrizes a espessura é dominada provavelmente pelo efeito desorganizador do colesterol, e nos lipossomas com gangliosídeos, pelo volume das cadeias de polissacarídeos. Os pontos de máximo das curvas, os quais fornecem o diâmetro médio dos lipossomas, estão bem definidos para os perfis correspondentes aos lipossomas com gangliosídeos, enquanto que para as matrizes DPPC:Chol, não há um máximo definido, o que se atribui a uma grande polidispersidade neste sistema.

O ponto em que a função $p(r)$ tende a zero indica o valor D_{\max} , maior distância intra-partícula, que se apresenta maior para os lipossomas com gangliosídeos e não fica bem definida para o caso das matrizes. A relação entre o raio médio e a distância máxima mostra que as vesículas são esferóides deformados.

O diâmetro máximo das vesículas (D_{\max}) varia entre 260 Å e 300Å para DPPC:Chol, 450 Å aproximadamente para DPPC:Chol:GM1:DHP e 500Å no caso de DPPC:Chol:Mist:DHP. Vale lembrar novamente neste ponto que a informação dimensional obtida se refere às vesículas com dimensões menores que 1000 Å, que produziram o espalhamento detectado nas experiências de SAXS, sem descartar a possível existência de partículas maiores, com características diferentes.

Resultados semelhantes aos aqui apresentados, à temperatura de 22 °C, foram obtidos às temperaturas de 45 e 50 °C (acima da temperatura de transição de fase da matriz lipídica). Isso sugere que o colesterol, em concentrações acima de 30 mol%, modifica a transição de fase das vesículas, não permitindo sua determinação precisa, conforme evidenciado pelos estudos da transição de fase dos lipossomas (item 5.2.3), fazendo com que as estruturas apresentem-se semelhantes em larga faixa de temperaturas.

A caracterização morfológica dos lipossomas e seus tamanhos mostraram que a vesículas têm aproximadamente a forma esférica. Esta constatação foi

confirmada principalmente pelas técnicas de microscopia eletrônica e SAXS. A polidispersidade do sistema (característica de vesículas multilamelares) foi evidenciada por todas as técnicas, TEM, SAXS e QLS. O tamanho das vesículas detectados pelas técnicas de QLS e TEM mostraram-se concordantes, embora o diâmetro máximo calculado pela distribuição $p(r)$ da técnica de SAXS apresentou valores muito pequenos, o que é decorrente da limitação desta técnica para predição de tamanhos de vesículas maiores que 100 nm.

Uma única lamela ou um número reduzido de lamelas pôde ser detectado para os lipossomas com gangliosídios pelas técnicas de TEM e SAXS, o que pode ser atribuído aos efeitos das cadeias do “brush” de polissacarídeos dificultando a formação de multilamelas.

5.3 – Avaliação dos lipossomas após injeção em camundongos Balb/c

5.3.1 – Peso corporal dos animais

Os animais foram pesados a cada duas semanas, durante o período de administração dos lipossomas (12 semanas), para ajuste da dose de 50 μ g gangliosídeo/animal. Durante esse período foram encontrados somente dois animais mortos, um após a sexta injeção com DPPC:Chol:GM1(35:35:20:10% molar) e o outro após a quarta injeção com DPPC:Chol:MIST:DHP (35:35:20:10% molar). Entretanto, não foi detectada nenhuma relação entre estas mortes e a administração dos lipossomas. No que se refere ao crescimento corporal, não foram observadas diferenças entre os animais tratados com lipossoma-GM1 e lipossoma-Mist.

5.3.2 – Efeitos dos lipossomas sobre o sistema imunológico

Os efeitos dos lipossomas sobre o sistema imunológico foram avaliados através da resposta imune humoral, pela produção de anticorpos classes IgM e IgG, usando como controle soro de animais sadios sem tratamento. Para a detecção de anticorpos antigangliosídios, através do imunoensaio ELISA, descrito

em métodos, placas foram recobertas com os gangliosídios GM1 e Mist, solubilizados em metanol nas concentrações de 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$.

5.3.2.1 – Detecção de anticorpos antigangliosídios GM1

A Figura 5.14 apresenta os ensaios realizados em placas recobertas com 5 $\mu\text{g/mL}$ de GM1

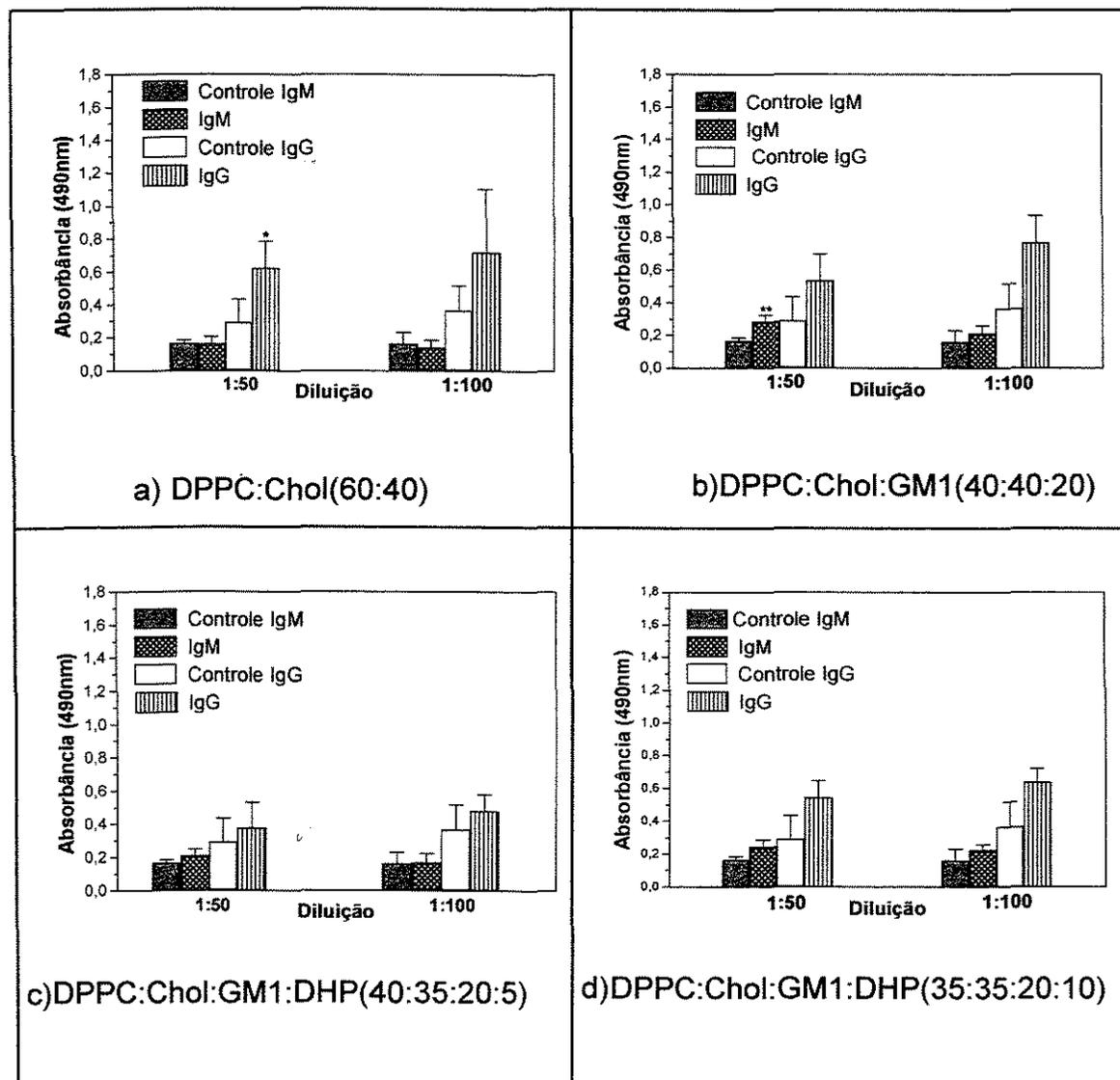


Figura 5.14 – Detecção de anticorpos antigangliosídios das classes IgM e IgG em placas de poliestireno de fundo chato recobertas com 5 $\mu\text{g/mL}$ de GM1. Os soros utilizados foram diluídos em soluções de PBS, nas proporções de 1:50 e 1:100 e os soros controles foram obtidos de animais saudáveis não tratados com lipossomas. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle.

Na Figura 5.14a observa-se produção significativa ($p < 0,05$) de anticorpos antigangliosídios da classe IgG na diluição de 1:50 para o soro teste o qual é proveniente dos animais submetidos a tratamento com lipossomas sem gangliosídios.

Para o soro teste, proveniente dos animais submetidos a tratamento com lipossomas constituídos de DPPC:Chol:GM1 (40:40:20), Figura 5.14b, foi detectado anticorpos antigangliosídios classe IgM, diluição 1:50, com significância $p < 0,01$ em relação ao controle. Para os outros soros testes, em ambas diluições 1:50 e 1:100 e classes IgG e IgM, não foi detectada produção significativa de anticorpos, conforme testes estatísticos em relação ao controle.

Para os testes sorológicos realizados com os soros testes provenientes dos animais submetidos a tratamento com lipossomas constituídos de DPPC:Chol:GM1 (40:40:20), nas placas recobertas com $10\mu\text{g/mL}$ de GM1, ilustrados na Figura 5.15, observa-se uma produção significativa ($p < 0,01$) de anticorpos antigangliosídios da classe IgG para ambas as diluições, 1:50 e 1:100 (Figura 5.15b). Nessas mesmas placas foram detectados anticorpos antigangliosídios IgM para ambas as diluições ($p < 0,01$) e IgG para a diluição 1:100 ($p < 0,05$) dos soros testes provenientes dos animais tratados com lipossomas constituídos de DPPC:Chol:GM1:DHP (35:35:20:5), Figura 5.15c.

A matriz lipídica, DPPC:Chol, não mostrou imunogenicidade nos imunoensaios realizados com as placas recobertas com $10\mu\text{g/mL}$ de GM1.

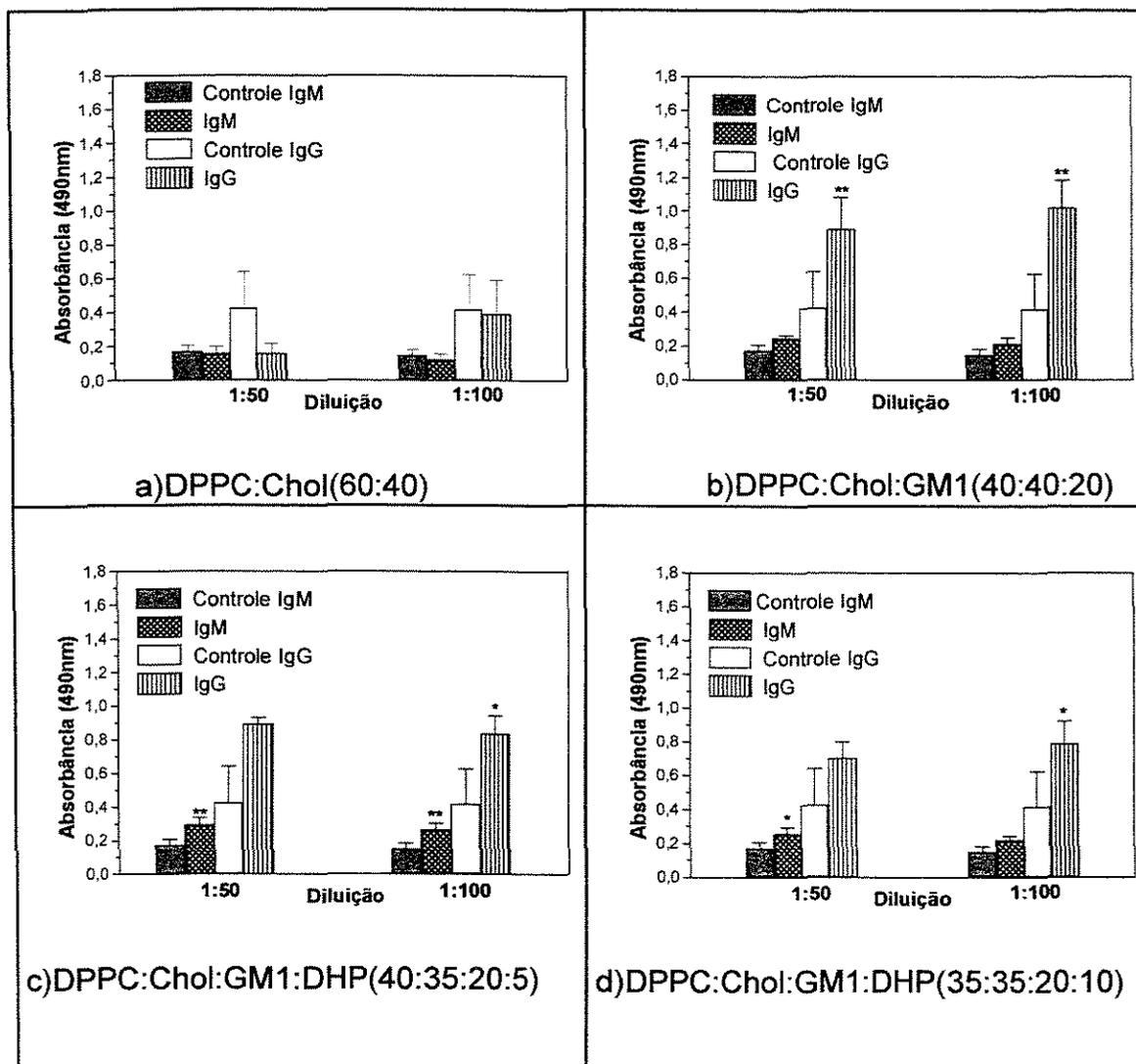


Figura 5.15 – Detecção de anticorpos antigangliosídios das classes IgM e IgG em placas de poliestireno de fundo chato recobertas com 10 µg/mL de GM1. Os soros foram diluídos em soluções de PBS, nas proporções de 1:50 e 1:100 e os soros controles foram obtidos de animais saudáveis não tratados com lipossomas. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle.

Os imunoenaios realizados nas placas recobertas com 20 µg/mL de GM1 são apresentados na Figura 5.16. Observa-se que para os soros coletados dos animais que previamente foram tratados com lipossomas sem gangliosídios, Figura 5.16a, não há produção de anticorpos antigangliosídios IgM e IgG em ambas as diluições. Para os soros provenientes de animais submetidos ao tratamento com lipossomas constituídos de DPPC:Chol:GM1 (40:40:20), Figura

5.16b, observa-se a produção de anti-GM1, classes IgM ($p < 0,05$), diluição 1:50 e IgG, tanto para a diluição 1:50, com significância $p < 0,01$, como para a diluição 1:100, com significância $p < 0,05$.

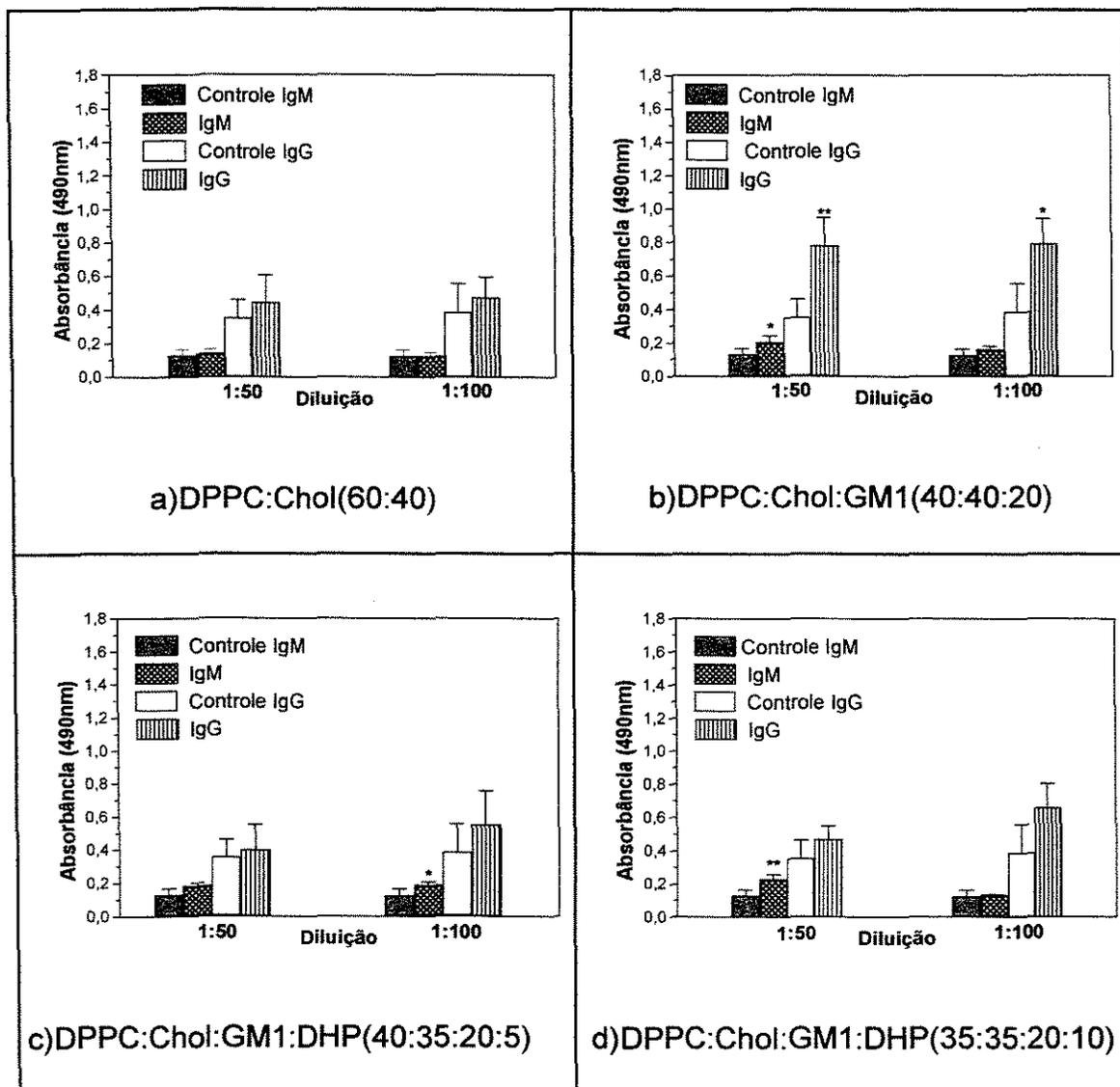


Figura 5.16 – Detecção de anticorpos antigangliosídeos das classes IgM e IgG em placas de poliestireno de fundo chato recobertas com 20 $\mu\text{g/mL}$ de GM1. Os soros foram diluídos em soluções de PBS, nas proporções de 1:50 e 1:100 e os soros controles foram obtidos de animais saudáveis não tratados com lipossomas. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle.

Para os soros testes de animais submetidos a tratamento prévio com lipossomas constituídos de DPPC:Chol:GM1:DHP (40:35:20:5), Figura 5.16.c, observa-se a produção de IgM para o soro diluído na proporção de 1:100 ($p < 0,05$). Ainda na Figura 5.16d, referente ao teste sorológico de camundongos previamente tratados com lipossomas, cuja composição é de DPPC:Chol:GM1:DHP (35:35:20:10), observa-se a produção de IgM, para os soros diluídos em 1:50 e significância $p < 0,01$ em relação ao grupo controle.

5.3.2.2 – Detecção de anticorpos antigangliosídios Mist (GM1 21%, GD1a 40%, GD1b 16%, GT1b 19%)

Os mesmos ensaios de detecção de anticorpos realizados com as vesículas contendo GM1 foram realizados com a mistura de gangliosídios, Mist. Nas Figuras 5.17, 5.18, 5.19 são apresentadas as produções dos anticorpos antigangliosídios, classes IgG e IgM, diluições 1:50 e 1:100, para a mistura de gangliosídios (Mist), associada aos lipossomas com as seguintes composições: DPPC:Chol (60:40), DPPC:Chol:Mist (40:40:20), DPPC:Chol:Mist:DHP (40:35:20:5) e DPPC:Chol:Mist:DHP (35:35:20:10). A Figura 5.17 ilustra a produção de anticorpos gangliosídios em placas recobertas com 5 $\mu\text{g/mL}$ de Mist.

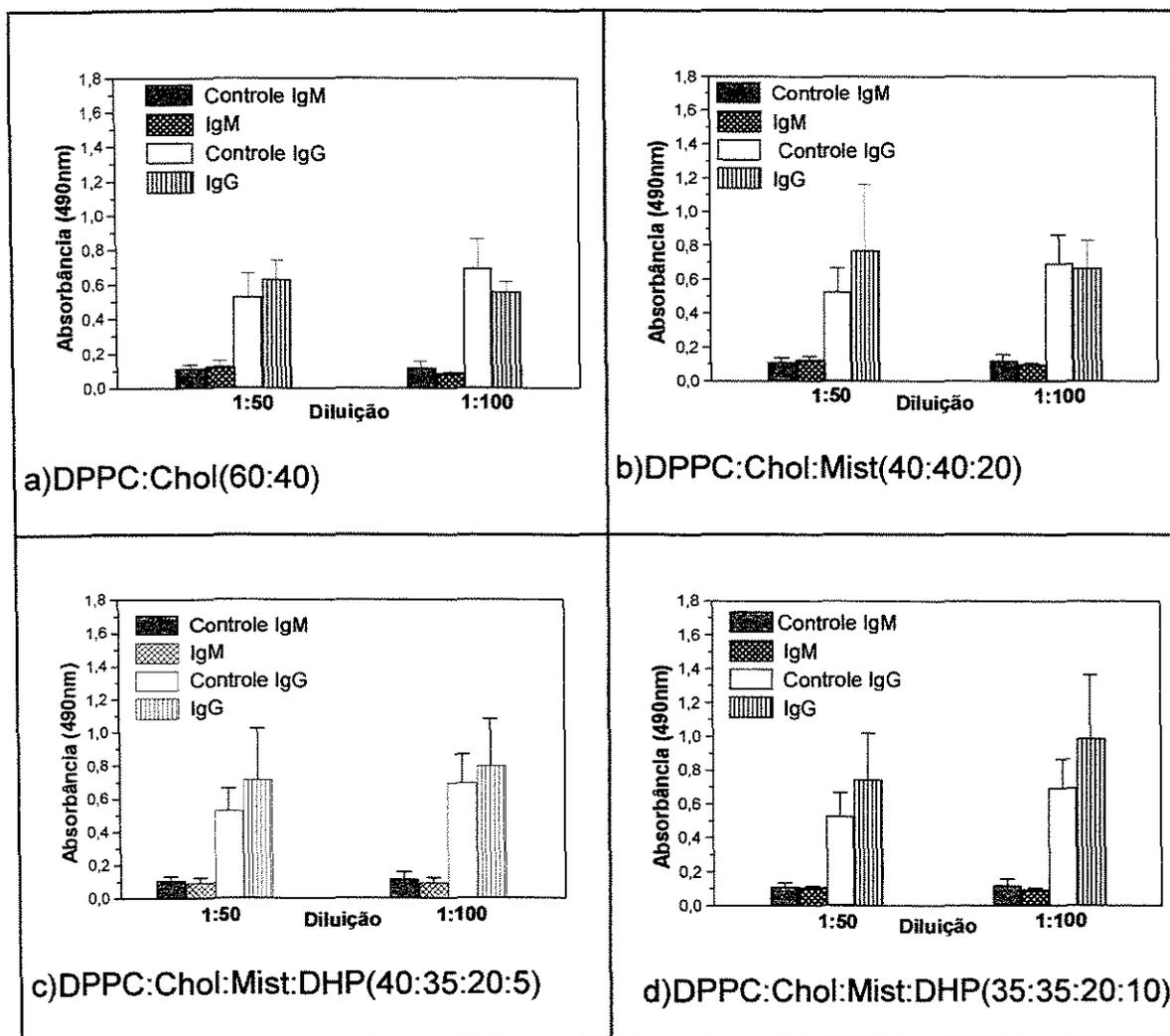


Figura 5.17 – Detecção de anticorpos antigangliosídeos das classes IgM e IgG em placas de poliestireno de fundo chato recobertas com 5 µg/mL de Mist. Os soros foram diluídos em soluções de PBS, nas proporções de 1:50 e 1:100 e os soros controles foram obtidos de animais saudáveis não tratados com lipossomas

Na Figura 5.18 são ilustrados os resultados referentes às análises realizadas nas placas contendo 10 µg/mL.

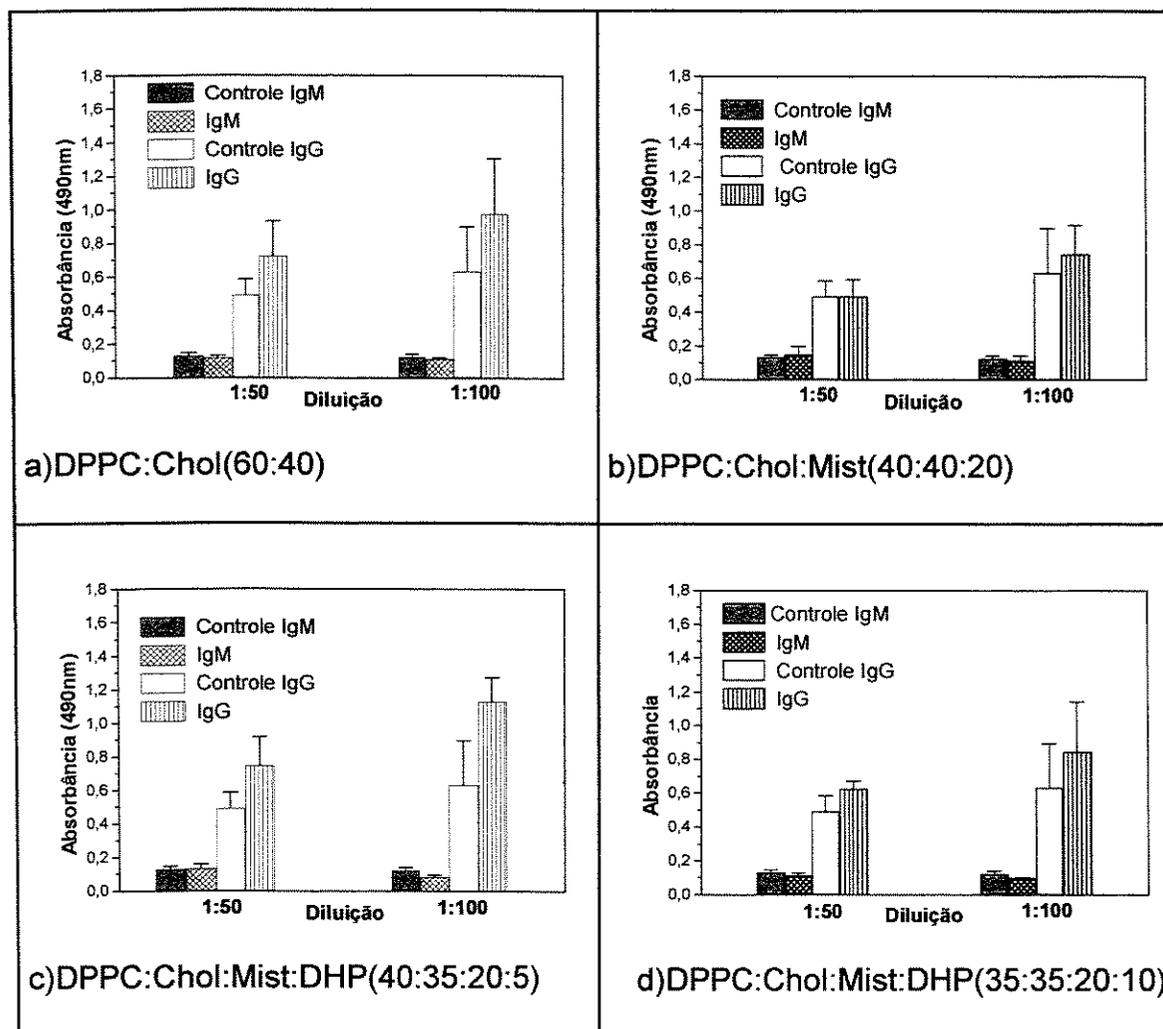


Figura 5.18 – Detecção de anticorpos antigangliosídeos das classes IgM e IgG em placas de poliestireno de fundo chato recobertas com 10 µg/mL de Mist. Os soros foram diluídos em soluções de PBS, nas proporções de 1:50 e 1:100 e os soros controles foram obtidos de animais saudáveis não tratados com lipossomas.

Para as análises realizadas em placas recobertas com 20 µg/mL de Mist, segue a Figura 5.19.

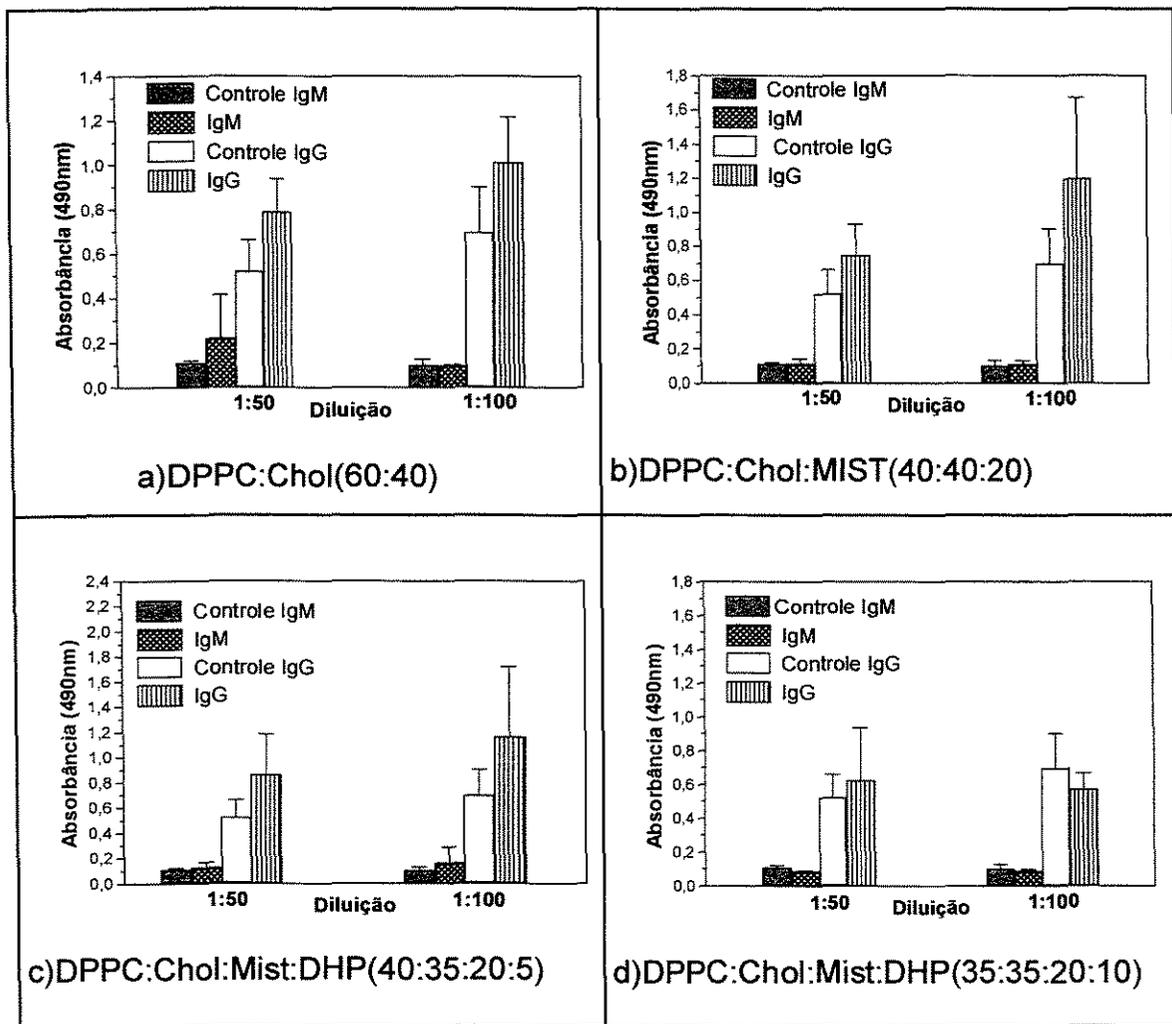


Figura 5.19 – Detecção de anticorpos antigangliosídios das classes IgM e IgG em placas de poliestireno de fundo chato recobertas com 20 µg/mL de Mist. Os soros foram diluídos em soluções de PBS, nas proporções de 1:50 e 1:100 e os soros controles foram obtidos de animais saudáveis não tratados com lipossomas.

Para todos os imunoesaios realizados com os soros testes provenientes de animais submetidos a tratamento com lipossomas, constituídos de 20 mol% da mistura de gangliosídios, Mist, não foram detectadas produções significativas de anticorpos antigangliosídios.

5.3.2.3 – Classificação dos anticorpos através de unidades arbitrárias

A classificação dos anticorpos antigangliosídios, em relação aos controles, foi baseada no cálculo da unidade arbitrária de densidade óptica, sendo considerada a presença de IgM e IgG positiva quando a absorbância do soro teste excedia o valor médio do soro controle, mais duas vezes o seu desvio padrão.

Para o cálculo de unidades arbitrárias de densidade óptica (DO) para os soros testes foi utilizado o valor médio da DO_{corte} do controle como valor arbitrário, conforme equação 5.1.

$$DO_{\text{corte}} = (DO_{\text{cont}} + 2 \times DP) \quad (5.1)$$

DO_{corte} : Densidade óptica de corte

DO_{cont} : Densidade óptica do soro controle

DP : Desvio padrão da DO do soro controle

A Tabela 5.5 apresenta as unidades arbitrárias de densidade óptica dos testes sorológicos de animais previamente tratados com lipossomas-GM1 (diluição 1:50). São consideradas as três diferentes concentrações de GM1 na cobertura das placas (5, 10 e 20. $\mu\text{g/mL}$) e as duas classes de anticorpos antigangliosídios, IgM e IgG.

Tabela 5.5 – Produção de anticorpos antigangliosídios, classes IgM e IgG, em amostras séricas de Balb/c (diluição 1:50 em PBS) tratados com quatro diferentes composições de lipossomas e imunoenensaio realizado em placas de poliestireno recoberta com GM1 nas concentrações 5, 10 e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; n=4.

Composição dos lipossomas injetados	Unidades arbitrárias de densidade óptica para soros testes (1:50)					
	Placa com 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GM1		Placa com 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GM1		Placa com 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GM1	
	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
DPPC:Chol (60:40 mol%)	<1	1	<1	<1	<1	<1
DPPC:Chol:GM1 (40:40:20 mol%)	1	<1	1	1	1	1,2
DPPC:Chol:GM1:DHP (40:35:20 :5mol%)	1	<1	1	1	<1	<1
DPPC:Chol:GM1:DHP (35:35:20 :10mol%)	1	<1	1	<1	1	<1
DO_{corte}	0,207	0,576	0,242	0,86	0,199	0,567

Em termos de diagnóstico, para detecção de anticorpos antigangliosídios e baseados nas DO_{corte} , os lipossomas não apresentaram imunogenicidade, o que foi verificado pelos valores próximos da faixa de corte.

A Tabela 5.6 apresenta as unidades arbitrárias de densidade óptica dos testes sorológicos de animais tratados com lipossomas-GM1 (diluição 1:100). São consideradas as três diferentes concentrações de GM1 na cobertura das placas (5, 10 e 20. $\mu\text{g}/\text{mL}$) e as duas classes de anticorpos antigangliosídeo, IgM e IgG.

Tabela 5.6 – Produção de anticorpos antigangliosídios, classes IgM e IgG, em amostras séricas de Balb/c (diluição 1:100 em PBS) tratados com quatro diferentes composições de lipossomas e imunoenensaio realizado em placas de poliestireno recoberta com GM1 nas concentrações 5, 10 e 20 µg/ mL; n=4.

Composição dos lipossomas injetados	Unidades arbitrárias de densidade óptica para soros testes (1:100)					
	Placa com 5µg/ mL GM1		Placa com 10µg/ mL GM1		Placa com 20µg/ mL GM1	
	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
DPPC:Chol (60:40 mol%)	<1	1	<1	<1	<1	<1
DPPC:Chol:GM1 (40:40:20 mol%)	<1	1,1	<1	<1	<1	1
DPPC:Chol:GM1:DHP (40:35:20 :5mol%)	<1	<1	1	1	<1	<1
DPPC:Chol:GM1:DHP (35:35:20 :10mol%)	<1	<1	1	<1	<1	<1
DO_{corte}	0,298	0,666	0,218	0,832	0,198	0,727

Em termos de diagnóstico, para detecção de anticorpos antigangliosídios e baseados nas DO_{corte}, nessa diluição, estes lipossomas também não apresentaram imunogenicidade pois os valores da DO estavam próximos da faixa de corte.

Para as Tabelas 5.7 e 5.8, as quais apresentam unidades arbitrárias de densidade óptica dos testes sorológicos de animais tratados com lipossomas-Mist, são consideradas as três diferentes concentrações de Mist na cobertura das placas (5, 10 e 20. µg/mL) e as duas classes de anticorpos antigangliosídeo, IgM e IgG. Através desses dados observa-se que esses quatro tipos de vesículas não apresentam imunogenicidade quando administrados nos animais.

Tabela 5.7 – Produção de anticorpos antigangliosídeo, classes IgM e IgG, em amostras séricas de Balb/c (diluição 1:50 em PBS) tratados com quatro diferentes composições de lipossomas e imunoensaio realizado em placas de poliestireno recoberta com MIST nas concentrações 5, 10 e 20 µg/ mL; n=4.

Composição dos lipossomas injetados	Unidades arbitrárias de densidade óptica para soro teste (1:50)					
	Placa com 5µg/ mL Mist		Placa com 10µg/ mL Mist		Placa com 20µg/ mL Mist	
	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
DPPC:Chol (60:40 mol%)	<1	<1	<1	1	1	<1
DPPC:Chol:MIST (40:40:20 mol%)	<1	<1	<1	<1	<1	<1
DPPC:Chol:Mist:DHP (40:35:20 :5mol%)	<1	<1	<1	1	<1	1
DPPC:Chol:Mist:DHP (35:35:20 :10mol%)	<1	<1	<1	<1	<1	<1
DO_{corte}	0,162	0,804	0,162	0,679	0,131	0,801

Tabela 5.8 – Produção de anticorpos antigangliosídeo, classes IgM e IgG, em amostras séricas de Balb/c (diluição 1:100 em PBS) tratados com quatro diferentes composições de lipossomas e imunoensaio realizado em placas de poliestireno recoberta com Mist nas concentrações 5, 10 e 20 µg/ mL; n=4.

Composição dos lipossomas injetados	Unidades arbitrárias de densidade óptica para soro teste (1:100)					
	Placa com 5µg/ mL Mist		Placa com 10µg/ mL Mist		Placa com 20µg/ mL Mist	
	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
DPPC:Chol (60:40 mol%)	<1	<1	<1	<1	<1	<1
DPPC:Chol:Mist (40:40:20 mol%)	<1	<1	<1	<1	<1	1,1
DPPC:Chol:Mist:DHP (40:35:20 :5mol%)	<1	<1	<1	<1	1	1
DPPC:Chol:Mist:DHP (35:35:20 :10mol%)	<1	<1	<1	<1	<1	<1
DO_{corte}	0,196	1,035	0,160	1,16	0,156	1,104

Em termos de diagnóstico, para detecção de anticorpos antigangliosídeos e baseados nas DO_{corte} , pode-se concluir que nenhuma das preparações dos lipossomas foi imunogênica nos camundongos Balb/c em termos de diagnóstico de detecção de anticorpos IgM e IgG pois os valores da DO estavam próximos da faixa de corte.

Capítulo 6

CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

Através dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- É factível a preparação de lipossomas MLV's, com 20 mol% de GM1 e Mist e com distribuição de tamanhos em duas populações, uma menor na faixa de 300 a 500 nm e a outra na faixa de 1000 a 4000 nm
- Os gangliosídios GM1 e Mist na concentração de 20 mol% foram incorporados totalmente nas bicamadas lipídicas dos lipossomas
- As condições de processo adotadas, velocidades de rotação de 42 r.p.m. e tempo de processo de 30 min em ambas etapas, foram suficientes para produzir vesículas grandes com duas populações;
- Os gangliosídios e o lipídio DHP influenciam nas temperaturas de transição de fases do DPPC, aumentando a temperatura de transição de fases;
- A caracterização dos lipossomas através das técnicas de espalhamento quase elástico de luz (QLS), microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e raios X a baixo ângulo (SAXS) apresentaram resultados coerentes;
- A matriz lipídica (DPPC:Chol) e os lipossomas associados à mistura de gangliosídios, Mist, não apresentaram imunogenicidade, tanto em termos de significância estatística como em termos de diagnóstico nos testes sorológicos realizados com soro dos camundongos Balb/c;
- Em termos de significância estatística, foram detectados anticorpos antigangliosídeo das classes IgM e IgG em alguns dos soros testes previamente tratados com gangliosídeo GM1 associado a lipossomas. Entretanto, em termos de diagnóstico, essa imunogenicidade não é representativa;

-
- Os lipossomas testados neste trabalho podem ser empregados como veículos para aplicações imunoterápicas pois, em termos de diagnóstico, não apresentaram imunogenicidade.

Para a seqüência desta linha de pesquisa são sugeridos os seguintes temas para próximos trabalhos:

- Caracterização das superfícies dos lipossomas através de medidas do potencial zeta para estudo da distribuição de cargas em suas superfícies
- Aprofundamento dos estudos de SAXS para determinação dos perfis eletrônicos das lamelas
- Estudar a influência da concentração de gangliosídios na preparação e estabilidade de lipossomas multilamelares
- Estudar a preparação de lipossomas do tipo unilamelares (LUV) com a superfície modificada com GM1 e Mist a fim de obter uma distribuição homogênea, monodispersa de partículas.
- Realização de estudos *in vivo* com animais sadios para avaliação da fagocitose dos lipossomas
- Estudos *in vivo* em animais com neuropatias tratados com gangliosídios na forma lipossomal

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, T.M. Stealth[®] liposome as a drug sustained-release system for 1- β -D Arabinosylfuranosylcytosine (Cytosine Arabinoside). In: Lasic, D.D., Martin F. **Stealth Liposomes**, CRC Press, Inc., Boca Raton, p.187-195, 1995.
- ALLEN, T.M. Toxicity and systemic effects of phospholipids. In: Cevc, G. **Phospholipids Handbook**, Marcel Dekker, Inc., New York, p.803-816, 1993.
- ALVING, C. R. Immunologic aspects of liposomes: presentation and processing of liposomal protein and phospholipid antigens. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1113, p.307-322, 1992.
- AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, Gel Filtration – Principles and Methods.7th edition, ISBN 91-97-0490-2-6.
- ASBURY, A.K. Gangliosides and peripheral neuropathies: an overview. **Progress in Brain Research**, v.101, p.279-287, 1994.
- BANSAL, A.S., ABDUL-KARIM, B., MALIK, R.A., GOULDING, P., PUMPHREY, R.S.H., BOULTON, A.J.M., HOLT, P.L.J., WILSON, P.B. IgM gangliosides GM1 antibodies in patients with autoimmune disease or neuropathy, and controls. **Journal of Clinical. Pathology**, v.47, p.300-302, 1994.
- BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. Planejamento e otimização de experimentos. 2.ed., Editora da UNICAMP, Campinas, 1996.
- BEDU-ADDO, F.K., HUANG, L. Effect of matrix lipid chain length on liposomes containing cholesterol and ganglioside GM1: Implications in drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.85, p.714-719, 1996.
- BERGELSON, L.D. Serum gangliosides as endogenous immunomodulators. **Immunology Today** v.16, p.483-486, 1995.

- CAPPUCCINO, J.G., SHERMAN, N. **Microbiology – A laboratory manual**. 3rd Edition, 1992.
- CARMONA-RIBEIRO, A.M., HIX, S. pH effects on properties of dihexadecyl phosphate vesicles. **Journal of Physical Chemistry**, v. 95, p. 1812-1817, 1991.
- CASTRO, G.M. Estudo da ação imunomoduladora de gangliosídios sobre a evolução da encefalomielite experimental autoimune (EAE) em ratos Lewis. **Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas**, 1999.
- CAVALCANTI, L.P. Estudo estrutural de membranas modelo utilizando radiação síncrotron. **Tese (Doutorado) - Instituto de Física Gleb Wataghin, Universidade Estadual de Campinas**, 2001.
- CHEN, P.S., TORIBARA, J.T.Y., WARNER, H. Microdetermination of phosphorus. **Analytical Chemistry**, v. 28, p.1756-1758, 1956.
- CROMMELIN, D.J.A., SCHREIER, H. Liposomes In: Kreuter, J. **Colloid Drug Delivery**, Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, p.73-190, 1994.
- ENDO, T., SCOTT, D.D., STEWART, S.S., KUNDU, S.K., MARCUS, D.M. Antibodies to glycosphingolipids in patients with multiple sclerosis and SLE. **The Journal of Immunology**, v. 132, p.1793-1797, 1984.
- FERNANDES, S.R.M., COSTALLAT, L.T., ZOLLNER, R.L. Detecção de anticorpos anticomponentes lipídicos (cardiolipina, gangliosídios e galactocerebrosídios) em pacientes com doença de Behçet. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.30, p.173-177,1990.
- FOGLER, W.E. Immunologic properties and activities of phospholipids. In: Cevc, G. **Phospholipids Handbook**, Marcel Dekker, Inc., New York, p.817-832, 1993.

- GHOSH, P.C., BACHHAWAT, B.K. Effect of surface modification with glycolipids and polysaccharides on *in vivo* fate of liposomes In: Lasic, D., Martin, F. **Stealth Liposomes**, CRC Press, Inc., Boca Raton, p.13-24, 1995.
- GLATTER, O. Scattering studies on colloids of biological interest (amphiphilic systems), **Progress in Colloid and Polymer Science**, v.84, p.46-54, 1991.
- HAKOMORI, S. Role of gangliosides in tumor progression. **Progress in Brain Research**, v.101, p.241-250, 1994.
- HARADA, Y., SAKATSUME, M., NORES, G.A., HAKOMORI S, TANIGUCHI, M. Density of GM3 with normal primary structure determines mouse melanoma antigenicity, a new concept of tumor antigen. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 80, p.988-992, 1989.
- HARDING, C.V., COLLINS, D., UNANUE, E.R. Processing of liposome-encapsulated antigens targeted to specific subcellular compartments. **Research in Immunology**, v.143, p. 188-191, 1992.
- HARLOW, E., LANE, D. **Antibodies: A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, U.S.A., 1988.
- HINZ, H.J., KÖRNER, O., NICOLAU, C. Influence of gangliosides G_{M1} and G_{D1a} on structural and thermotropic properties of sonicated small 1,2-Dipalmitoyl-L- α -Phosphatidylcholine vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.643, p. 557-571, 1981.
- HRISTOVA, K., NEEDHAM, D. Physical properties of polymer-grafted bilayers. In: Lasic, D., Martin, F. **Stealth Liposomes**, CRC Press Inc., Boca Raton, p.35-49, 1995.
- HUANG L., REDDY, R., NAIR, S.K., ZHOU, F., ROUSE, B.T. Liposomal delivery of soluble protein antigens for class I MHC - mediated antigen presentation. **Research in Immunology**, v.143, p. 192-196, 1992.

- JOHNSTONE A., THORPE R. **Immunochemistry in practice**. Blackwell Scientific publications, 1987.
- KIMATA, H. Differential effects of gangliosides on human IgE and IgG4 production. **European Journal of Immunology**, v.25, p.302-305, 1995.
- KOJIMA, H., HANADA-YOSHIKAWA, K., KATAGIRI, A., TAMAI, Y. Thermotropic behaviour and electronmicroscopic structures of mixtures of gangliosides and dipalmitoylphosphatidylcholine. **Journal of Biochemistry** v.103, p.126-131, 1988.
- LASIC, D.D. **Liposomes: From physics to applications**, Elsevier, Amsterdam, p.575, 1993.
- LATOV, N. Antibodies to glycoconjugates in neuropathy and motor disease. **Progress in Brain Research**, v.101, p.295-303, 1994.
- LEDEEN , R.W., YU, R., Gangliosides: Structure, Isolation, and Analysis. **Methods in Enzymology** , v.83, p.139-191, 1982.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M. **Principles of Biochemistry**. 2. ed., Worth Publishers, New York, 1993.
- LIU, D., SONG, Y.K., LIU, F. Antibody dependent, completed mediated liver: uptake of liposomes containing GM1. **Pharmaceutical Research**, v.12, p.1175-1179, 1995.
- LIVINGSTON, P.O., RITTER, G., CALVES, M.J. Antibody response after immunization with the gangliosides GM1, GM2, GM3, GD2, and GD3 in the mouse. **Cancer Immunology and Immunotherapy**. v. 29, p.179-184, 1989.
- MABREY, S., MATEO, P.L., STURTEVANT, J.M. High-sensitivity scanning calorimetric study of mixtures of cholesterol with dimyristoyl- and dipalmitoylphosphatidylcholines. **Biochemistry**, v.17, p.2464-2468, 1978.
- MARJAN, J.M.J., ALLEN, T.M. Long circulating liposomes: past, present and future. **Biotechnology Advances**, v.14, p.151-175, 1996.

- MASSÓ, O., ALIÑO, S.F., LEJARRETA, M., BLASCO, F., PIULATS, J. Specific serological response by active immunization with GD3-bearing liposomes. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 278, p.1114-1120, 1996.
- McELHANEY, R.N. The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 30, p. 229-259, 1982.
- MIZUTAMARI, R.K., KREMER, L.J., BASILE, E.A., NORES, G.A. Anti-GM1 ganglioside IgM-antibodies present in human plasma: Affinity and biological activity changes in a patient with neuropathy. **Journal of Neuroscience Research**, v. 51, p.237-242, 1998.
- NEW, R.R.C. **Liposomes, a Practical Approach**. 2.ed., IRL Press, Oxford 1990.
- OSTROWSKY, N. Liposome size measurements by photon correlation spectroscopy. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 64, p. 45-64, 1993.
- PARKER, J.L. Forces between bilayers containing charged liposomes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 137, p. 571-576, 1990.
- PEPEU, G., ODERFELD-NOWAK, B., CASAMENTI, F. CNS pharmacology of gangliosides. **Progress in Brain Research**, v.101, p.327-335, 1994.
- PONZIN, D., MENEGUS, A.M., KIRSCHNER, G., NUNZI, M.G., FIORI, M.G., RAINE, C.S. Effects of gangliosides on the expression of autoimmune demyelination in the peripheral nervous system. **Annals of Neurology**, vol.30, p.678-685, 1991.
- RAGUPATHI, G. Carbohydrate antigens as targets for active specific immunotherapy. **Cancer Immunology and Immunotherapy**, v.43, p.152-157, 1996.

- RIBAS, A.M. Estudo da estabilidade de bicamadas lipídicas em presença de tensoativos. **Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1997.**
- ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. **Immunology**, 4. ed., London: Mosby, 1996.
- SCARPA, M.V., OLIVEIRA, A.G., CUCCOVIA, I.M. Estruturas e propriedade físico-químicas de lipossomas. **Infarma**, v.27, p. 4-7, 1998.
- SILLERUD, L.O, SCHAFFER, D.E., YU, R.K., KONIGSBERG, W.H. Calorimetric properties of mixtures of ganglioside GM1 and dipalmitoylphosphatidylcholine. **The Journal of Biological Chemistry**. v.254, p. 10876-10880, 1979.
- STECK, A.J., KUNTZER, T. Anticorps anti-glycoconjugués et neuropathies périphériques dysglobulinémiques ou dysimmunitaires. **Revue Neurologique**, v.152, p. 400-404, 1996.
- STORM, G., CROMMELIN, D.J.A. Liposomes: quo vadis? **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v.1, p. 19-31, 1998.
- SVENNERHOLM, L. Quantitative estimation of sialic acids. II. A colorimetric resorcinol-hydrochloride acid method. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 24, p. 604-611, 1957.
- SVENNERHOLM, L. Designation and schematic structure of gangliosides and allied glycosphingolipids. **Progress in Brain Research**, v. 101, p.XI-XIV, 1994.
- SVERGUN, D.I. Determination of the regularization parameter in indirect transform methods using perceptual criteria. **Journal of Applied Crystallography**, v.25, p.495-503, 1992.
- TETTAMANTI, G., RIBONI, L. Gangliosides turnover and neural cell function: a new perspective. **Progress in Brain Research**, v.101, p.77-100, 1994.
- USTER, P.S. Therapeutic application of vincristine in conventional and sterically stabilized liposomes. In: Lasic, D., Martin, F. **Stealth Liposomes**, CRC Press Inc., Boca Raton, p.173-184, 1995.

VAAGE, J., BARBERA, E. Tissue uptake and therapeutic effects of Stealth[®] doxorubicin. In: Lasic, D., Martin, F. **Stealth Liposomes**, CRC Press Inc., Boca Raton, p.149-171, 1995.

VILELLA, C.A. Estudo do efeito de gangliosídeos sobre a incidência e morbidade do diabetes Mellitus em camundongos NOD (Non-Obese Diabetic). **Dissertação (Mestrado)**– Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2000.

WARREN, R.C. **Physics and the architecture of cell membranes**. IOP Publishing Ltd., Bristol, 1987.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 2. ed, Englewood Cliffs Prentice-Hall, 1984.