

**Universidade Estadual de Campinas**  
**Faculdade de Engenharia Química**  
**Área de Concentração de Desenvolvimento de Processos Químicos**

**Preparação, Caracterização e Avaliação da Citotoxicidade  
de Lipossomas Contendo o-Carboranilpropilamina,  
L-p-Boronofenilalanina e Doxorubicina**

**Ângela Maria Moraes**

*Autora*

**Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Helena Andrade Santana**

*Orientadora*

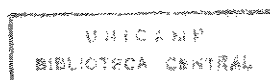
**Prof. Dr. Ruben G. Carbonell**

*Co-Orientador*


Tese submetida à Comissão de Pós Graduação da Faculdade de  
Engenharia Química da UNICAMP como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química

**Campinas/SP**

**Março, 1996**

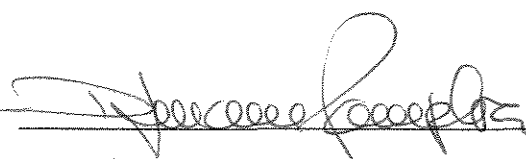


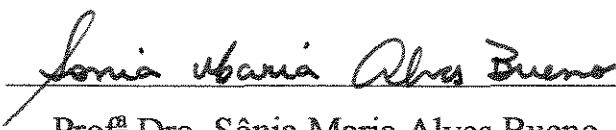
Tese defendida e aprovada em 13 de março de 1996 pela banca  
examinadora constituída pelos professores:

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>ª</sup> Dra. Maria Helena Andrade Santana

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>ª</sup> Dra. Gisella Maria Zanin

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>ª</sup> Dra. Elba Pinto da Silva Bon

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>ª</sup> Dra. Djenane Cordeiro Pamplona

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>ª</sup> Dra. Sônia Maria Alves Bueno

Esta versão corresponde à redação final da tese de doutorado defendida pela Eng<sup>a</sup> Ângela Maria Moraes e aprovada pela banca examinadora em 13 de março de 1996.

  
Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Helena Andrade Santana

*Em 1608, o holandês Johann Lippershey descobriu acidentalmente que, colocando duas lentes de vidro nas extremidades de um tubo e olhando através dele, poderia ver as coisas do mundo mais de perto. Ele chamou o seu invento de "olhador" e imaginou sua grande utilidade nas guerras... Galileu Galilei, no mesmo ano, aperfeiçoou um daqueles "olhadores". E, usou o seu "telescópio" para desafiar as teorias existentes sobre o sistema solar...*

*Esta tese é dedicada a todos com o espírito de Galileu.*

*Com carinho, a meus pais  
Clementina,  
Tarcílio,  
Coló,  
Estêvão*

*Com amor, ao meu melhor amigo  
Paulo*

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>ª</sup> Dra. Maria Helena A. Santana e ao Prof. Dr. Ruben G. Carbonell, pela orientação segura, pelo encorajamento e, sobretudo, pela amizade. Minha estadia no Department of Chemical Engineering da North Carolina State University, em Raleigh, NC, EUA foi a melhor possível graças ao apoio de vocês. Suas sugestões foram e sempre serão indispensáveis para o meu crescimento profissional.

A Michelle D. Miller, pela amizade, pelas freqüentes aulas de inglês e pelo apoio inestimável prestado durante a execução do trabalho experimental, principalmente no tocante aos ensaios envolvendo a encapsulação da doxorubicina e o acoplamento dos anticorpos nos lipossomas .

À Prof<sup>ª</sup> Dra. Claramae H. Miller, ao Prof. Dr. Keith B. Quattrocchi e a Yawei Chang, pela realização de testes *in vitro* e *in vivo* na Division of Neurosurgery da University of North Carolina, em Chapel Hill, NC, EUA, e pelo auxílio na avaliação dos resultados.

À Dra. Christine S. Hughes, pelo auxílio inestimável no planejamento e na análise dos experimentos *in vitro* realizados no College of Veterinary Medicine, na North Carolina State University, em Raleigh, NC, EUA

À equipe de Susan A. Autry e James E. Boggan, do Department of Neurological Surgery da University of California, Davis, CA, EUA, pela realização e interpretação dos testes de deposição *in vivo* da CPA.

Aos companheiros de jornada do Bioseparation Laboratory, na North Carolina State University, Li Ang, Dan, Anup, Ping, Marc, Flory, Toru, Kristine, Xyno e Nancy, pela amizade, pelas sugestões e por toda a ajuda recebida. Vocês jamais serão esquecidos.

Aos amigos novos e antigos, pelo carinho.

Aos meus familiares, pelo amor, pelo apoio e pela compreensão em todos os momentos.

A Paulo de Tarso Vieira e Rosa, pelo apoio incansável, pela paciência, pela disposição e por toda a ajuda recebida em mais quatro anos de deliciosa convivência.

Ao William R. Kenan, Jr. Institute for Engineering, Technology and Science, na North Carolina State University, Raleigh, NC, EUA, pelo suporte financeiro concedido para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

# ÍNDICE

<i>Assunto</i>	<i>Página</i>
<b>Lista de Figuras</b>	vii
<b>Lista de Tabelas</b>	xiii
<b>Lista de Abreviações</b>	xv
<b>Nomenclatura</b>	xvi
<b>Resumo</b>	xviii
<b>1. Introdução</b>	1
<b>2. Revisão da Literatura</b>	5
2.1. Considerações Gerais sobre Lipossomas	5
2.2. Classificação dos Lipossomas	9
2.3. Mecanismos de Formação de Lipossomas	11
2.4. Preparação de Lipossomas	15
2.4.1. <i>Matérias-Primas Utilizadas no Preparo de Lipossomas</i>	15
2.4.2. <i>Métodos de Obtenção de Lipossomas</i>	17
2.5. Incorporação de Compostos Terapêuticos em Lipossomas	20
2.5.1. <i>Técnicas de Encapsulamento de Compostos Terapêuticos em Lipossomas</i>	22
2.6. Utilização de Lipossomas na Liberação Controlada de Compostos Terapêuticos	23

<i>Assunto</i>	<i>Página</i>
2.6.1. <i>Comportamento dos Lipossomas em Sistemas Biológicos</i>	25
2.7. <i>Lipossomas Estericamente Estabilizados</i>	26
2.8. <i>Estabilidade de Lipossomas</i>	31
2.9. <i>Aplicação de Lipossomas na Terapia de Tumores Cerebrais Malignos</i>	35
2.9.1. <i>Terapia de Captura de Nêutrons por Boro</i>	38
2.9.2. <i>Terapia com Imunolipossomas Contendo Doxorubicina Encapsulada</i>	44
<b>3. Materiais e Métodos</b>	50
3.1. <i>Materiais</i>	50
3.2. <i>Métodos</i>	52
3.2.1. <i>Preparação dos Lipossomas</i>	52
3.2.2. <i>Geração de Gradientes de pH nos Lipossomas</i>	54
3.2.3. <i>Encapsulamento dos Compostos Terapêuticos</i>	55
3.2.4. <i>Purificação do Anticorpo Controle IgM-C</i>	56
3.2.5. <i>Determinação da Concentração de Anticorpos por Marcação com <sup>14</sup>C</i>	57
3.2.6. <i>Acoplamento de Anticorpos do Tipo IgG a Lipossomas</i>	58
3.2.7. <i>Acoplamento de Anticorpos do Tipo IgM a Lipossomas Contendo DOX Encapsulada</i>	61
3.2.8. <i>Caracterização dos Lipossomas</i>	63



<i>Assunto</i>	<i>Página</i>
<i>3.2.9. Monitoramento de Gradientes de pH nos Lipossomas</i>	71
<i>3.2.10. Avaliação da Estabilidade dos Lipossomas em Soluções do Tensoativo Não-Iônico C<sub>12</sub>E<sub>5</sub></i>	72
<i>3.2.11. Avaliação dos Coeficientes de Partição Aparentes dos Compostos BPA e CPA em Sistemas Octanol-Soluções Aquosas</i>	73
<i>3.2.12. Determinação dos Parâmetros de Crescimento das Células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1</i>	75
<i>3.2.13. Avaliação da Citotoxicidade in Vitro de Compostos Terapêuticos Livres e Encapsulados em Lipossomas</i>	76
<i>3.2.14. Avaliação da Sobrevivência das Células SK-MG-1 Submetidas à Presença de CPA Livre</i>	79
<i>3.2.15. Avaliação da Especificidade de Interação dos Anticorpos do Tipo IgM Livres e Acoplados a Lipossomas com Células SK-MG-1</i>	81
<i>3.2.16. Avaliação da Toxicidade in Vivo de Doxorubicina Livre e Encapsulada em Lipossomas</i>	82
<i>3.2.17. Avaliação da Distribuição Ultraestrutural in Vivo de Boro Proveniente de CPA Livre e Encapsulada em Lipossomas</i>	84

<i>Assunto</i>	<i>Página</i>
<b>4. Resultados e Discussão</b>	86
4.1. Preparação e Caracterização de Lipossomas com os Compostos de Boro BPA e CPA Encapsulados	86
4.1.1. <i>Caracterização Preliminar dos Compostos de Boro Utilizados</i>	86
4.1.2. <i>Encapsulamento de BPA em Lipossomas</i>	91
4.1.3. <i>Encapsulamento de CPA em Lipossomas</i>	97
4.1.4. <i>Estabilidade de Lipossomas Sonicados Contendo CPA em Soluções de C<sub>12</sub>E<sub>5</sub></i>	107
4.1.5. <i>Estabilidade de Lipossomas Convencionais Estocados a 5 °C</i>	111
4.1.6. <i>Encapsulamento Ativo de CPA em Lipossomas Convencionais Extrudados</i>	115
4.1.7. <i>Estabilidade de Lipossomas Extrudados Contendo CPA</i>	119
4.2. Preparação e Caracterização de Lipossomas Encapsulando Doxorrubicina	122
4.2.1. <i>Encapsulamento de Doxorrubicina em Lipossomas Sonicados Compostos por DSPC/DMPE/Col</i>	122
4.2.2. <i>Estabilidade à Estocagem de Lipossomas Sonicados Compostos por DSPC/DMPE/Col Encapsulando Doxorrubicina</i>	130
4.2.3. <i>Encapsulamento de Doxorrubicina em Lipossomas Sonicados Compostos por DPPC/Col/MPB-PE</i>	132

<i>Assunto</i>	<i>Página</i>
4.2.4. <i>Encapsulamento de Doxorrubicina em Lipossomas Extrudados Compostos por DPPC/Col/MPB-PE</i>	134
4.2.5. <i>Acoplamento de Anticorpos do Tipo IgG a Lipossomas</i>	135
4.2.6. <i>Acoplamento de Anticorpos do Tipo IgM a Lipossomas</i>	140
4.3. <i>Especificidade de Interação dos Anticorpos do Tipo IgM Livres e Acoplados a Lipossomas com Células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1</i>	146
4.4. <i>Citotoxicidade in Vitro dos Compostos Terapêuticos Livres e Encapsulados em Lipossomas</i>	151
4.4.1. <i>Sobrevivência de Linfócitos Humanos Expostos a Diversos Agentes</i>	152
4.4.2. <i>Caracterização Preliminar das Células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1</i>	155
4.4.3. <i>Sobrevivência das Células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1 Submetidas à Presença de CPA Livre</i>	156
4.4.4. <i>Inibição da Proliferação de Células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1 pela Exposição a CPA Livre e Encapsulada em Lipossomas Convencionais e “Stealth”</i>	163

<i>Assunto</i>	<i>Página</i>
<i>4.4.5. Inibição da Proliferação de Células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1 pela Exposição a Doxorrubicina Livre e Encapsulada em Lipossomas Convencionais e em Imunolipossomas</i>	170
4.5. Distribuição Ultraestrutural <i>in Vivo</i> de Boro Proveniente de CPA Livre e Encapsulada em Lipossomas	179
4.6. Citotoxicidade de Doxorrubicina Livre e Encapsulada em Lipossomas Injetados no Cérebro de Ratos	182
<b>5. Conclusões e Sugestões</b>	185
<i>5.1. Conclusões</i>	185
<i>5.2. Sugestões</i>	188
<b>6. Referências Bibliográficas</b>	189
<b>Abstract</b>	203

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>	<i>Página</i>
1. Estruturas ordenadas formadas por moléculas de lipídios em soluções aquosas	7
2. Classificação de lipossomas quanto à morfologia	10
3. Representação esquemática da formação de uma vesícula multilamelar através da hidratação do filme fosfolipídico seco	12
4. Formação de vesículas de acordo com a “teoria do brotamento”	14
5. Comparação entre as estruturas dos lipossomas do tipo convencional e estericamente estabilizado com cadeias de polietileno glicol	30
6. Comportamento do raio hidrodinâmico de vesículas unilamelares sonicadas de lecitina, após a adição do tensoativo não iônico Triton X-100	34
7. Reações paralelas de fissão que ocorrem após a captura de um nêutron de baixa energia por um átomo de $^{10}\text{B}$	38
8. Estrutura química da BPA HCl	41
9. Estrutura química da CPA HCl	42
10. Estrutura química da DOX HCl	44
11. Esquema da ligação de moléculas de IgG ativadas com periodato a lipossomas contendo DMPE em sua composição	59

<i>Figura</i>	<i>Página</i>
12. Esquema da ligação de moléculas de IgM após redução com cisteína a lipossomas contendo o lipídio MPB-PE em sua composição	62
13. Partição aparente da BPA entre 1-octanol e soluções aquosas com composições distintas.	88
14. Partição aparente da CPA entre 1-octanol e soluções aquosas com composições distintas.	89
15. Efeito da variação do tempo e da temperatura de incubação BPA/lipossomas sonicados na razão molar final BPA/ lipídio	94
16. Efeito da variação do tempo e da temperatura de incubação BPA/lipossomas sonicados no diâmetro final das vesículas	95
17. Formas iônicas predominantes durante a titulação teórica da BPA	97
18. Efeito da variação do tempo e da temperatura de incubação CPA/lipossomas sonicados na razão molar final CPA/lipídio	99
19. Efeito da variação do tempo e da temperatura de incubação CPA/lipossomas sonicados no diâmetro final das vesículas	100
20. Efeito da razão molar inicial CPA/lipídio na razão molar final CPA/lipídio para vesículas convencionais e “stealth” sonicadas	102

<i>Figura</i>	<i>Página</i>
21. Efeito da razão molar inicial CPA/lipídio na eficiência de encapsulação de CPA em vesículas convencionais e “stealth” sonicadas	103
22. Efeito da razão molar inicial CPA/lipídio no diâmetro de vesículas convencionais e “stealth” sonicadas	104
23. Efeito da razão molar inicial CPA/lipídio no número de átomos de boro encapsulados em vesículas convencionais e “stealth” sonicadas	106
24. Estabilidade de lipossomas convencionais e “stealth” sonicados em soluções do tensoativo não-iônico C <sub>12</sub> E <sub>5</sub>	109
25. Variações no diâmetro de lipossomas convencionais sonicados contendo CPA com o tempo de estocagem a 5°C	113
26. Variações na razão molar final CPA/lipídio após a remoção da CPA liberada de lipossomas sonicados com o tempo de estocagem a 5°C	114
27. Efeito da razão molar inicial CPA/lipídio na razão molar final CPA/lipídio para vesículas convencionais extrudadas	116
28. Efeito da razão molar inicial CPA/lipídio no diâmetro de vesículas convencionais extrudadas	117
29. Efeito da razão molar inicial CPA/lipídio no gradiente de pH de vesículas convencionais extrudadas	118
30. Variações na razão molar final CPA/lipídio após a remoção da CPA liberada de lipossomas extrudados com o tempo de estocagem a 5°C	120

<i>Figura</i>	<i>Página</i>
31. Variações no diâmetro de lipossomas convencionais extrudados contendo CPA com o tempo de estocagem a 5°C	121
32. Estabilidade de lipossomas convencionais extrudados em soluções do tensoativo não-iônico C <sub>12</sub> E <sub>5</sub>	123
33. Efeito da razão molar inicial DOX/lipídio na razão molar final DOX/lipídio para vesículas sonicadas compostas por DSPC/DMPE/Col	127
34. Efeito da razão molar inicial DOX/lipídio na eficiência de encapsulação de DOX em vesículas sonicadas compostas por DSPC/DMPE/Col	128
35. Efeito da razão molar inicial DOX/lipídio no número de moléculas de DOX encapsuladas por vesícula sonicada composta por DSPC/DMPE/Col	129
36. Efeito da temperatura e do tempo de estocagem na estabilidade de vesículas sonicadas contendo DOX.	131
37. Efeito da razão molar inicial DOX/lipídio na razão molar final DOX/lipídio para vesículas extrudadas compostas por DPPC/Col/MPB-PE	136
38. Efeito da razão molar inicial DOX/lipídio na eficiência de encapsulação de DOX em vesículas extrudadas compostas por DPPC/Col/MPB-PE	137
39. Efeito da razão molar inicial DOX/lipídio no número de moléculas de DOX encapsuladas por vesícula extrudada composta por DPPC/Col/MPB-PE	138



<i>Figura</i>	<i>Página</i>
40. Efeito da variação da razão molar inicial IgM/lipídio no número de moléculas de anticorpo ligados por vesícula extrudada composta por DPPC/Col/MPB-PE	144
41. Associação das proteínas IgM-H11 e IgM-C com as células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1	147
42. Ligação de imunolipossomas a células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1	149
43. Curva de crescimento das células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1	157
44. Inibição da proliferação de células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1 incubadas por 48 horas na presença dos agentes terapêuticos BPA, CPA, DOX e bleomicina	161
45. Inibição das células SK-MG-1 por exposição aguda a amostras concentradas de CPA livre e encapsulada em lipossomas convencionais e “stealth”	165
46. Inibição das células SK-MG-1 por exposição aguda a amostras diluídas em meio de cultura completo contendo CPA livre e encapsulada em lipossomas convencionais e “stealth”	166
47. Inibição das células SK-MG-1 por exposição aguda a amostras diluídas em meio de cultura incompleto contendo CPA livre e encapsulada em lipossomas convencionais e “stealth”	169

<i>Figura</i>	<i>Página</i>
48. Inibição das células SK-MG-1 por exposição aguda a amostras concentradas de DOX livre e encapsulada em lipossomas convencionais e acoplados a anticorpos do tipo IgM	172
49. Inibição das células SK-MG-1 por exposição aguda a amostras diluídas em meio de cultura completo contendo DOX livre e encapsulada em lipossomas convencionais e acoplados a anticorpos de tipo IgM	174
50. Inibição das células SK-MG-1 por exposição aguda a amostras diluídas em meio de cultura incompleto contendo DOX livre e encapsulada em lipossomas convencionais e acoplados a anticorpos de tipo IgM	176

## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela</i>	<i>Página</i>
1. Classificação de lipossomas baseada em parâmetros estruturais	10
2. Métodos de preparação de lipossomas e tipos de vesículas produzidas	19
3. Incorporação ativa de BPA em lipossomas	92
4. Efeito das condições de incubação no encapsulamento ativo de DOX em lipossomas sonicados compostos por DSPC/DMPE/Col	125
5. Resultados do acoplamento de IgG2a de camundongo a lipossomas compostos por DSPC/DMPE/Col através do método do periodato	139
6. Resultados do acoplamento de IgG caprina a lipossomas com diferentes composições pelo método do periodato	141
7. Estimativa do número de moléculas de anticorpo livre não reduzido ou de imunolipossomas associados às das células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1	150
8. Avaliação da sobrevivência de linfócitos humanos normais tratados com soluções de CPA	153
9. Avaliação da sobrevivência de linfócitos humanos normais tratados com soluções de DOX e com lipossomas contendo ou não DOX encapsulada	155
10. Avaliação da sobrevivência de células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1 tratadas com soluções de CPA	159

<i>Tabela</i>	<i>Página</i>
11. Caracterização das amostras não diluídas utilizadas nos ensaios de citotoxicidade resultante da exposição das células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1 à CPA	163
12. Inibição da proliferação das células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1 por exposição a CPA livre e encapsulada em lipossomas convencionais e “stealth” por 48 horas	168
13. Caracterização das amostras não diluídas utilizadas nos ensaios de citotoxicidade resultante da exposição das células SK-MG-1 à DOX	171
14. Inibição da proliferação das células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1 por exposição a DOX livre e encapsulada em lipossomas convencionais e acoplados a anticorpos do tipo IgM por 48 horas	177
15. Alterações histológicas decorrentes da injeção intracerebral de diversas amostras em ratos saudáveis	183

## ABREVIACÕES

BPA: L-p-boronofenilalanina HCl

C<sub>12</sub>E<sub>5</sub>: pentaetilenoglicol n-dodecil monoéter

Col: colesterol

CPA: o-carboranilpropilamina HCl

DMPA: ácido dimiristoil-fosfatídico

DMPE: dimiristoil-fosfatidiletanolamina

DMPE-CAP: dimiristoil-fosfatidiletanolamina-N-caproilamina

DMPE-PEG: 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N[poli(etileno glicol) 2000]

DOX: hidrocloreto de doxorrubicina

DPPC: dipalmitoil-fosfatidilcolina

DPPE-FITC: sal de triamônio N-5-(fluoresceínatiocarbamoil)-1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina

DSPC: distearoil-fosfatidilcolina

HEPES: N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-ácido etanossulfônico]

HRP: peroxidase de raiz-forte (“horseradish peroxidase”)

IgG2a : proteína purificada de mieloma de camundongo

IgG-C: imunoglobulina caprina

IgM-C: IgM humana (anticorpo controle)

IgM-H11: anticorpo específico contra as células SK-MG-1

MPB-PE: 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[4-(p-maleimido fenil) butirato]

PEG: polietileno glicol

SFB: soro de feto bovino

SRE: sistema reticuloendotelial

SSBH: solução salina balanceada de Hank

TCNB: terapia de captura de nêutrons por boro

TNBS: ácido trinitrobenzenossulfônico

## NOMENCLATURA

$a_0$ : área ocupada pela porção hidrofílica do fosfolipídio

$D$ : coeficiente de difusão médio

$\epsilon$ : eficiência de encapsulação percentual

$\Gamma$ : número de cadeias presentes por unidade de área

$[H^+]$ : concentração de prótons

$[HA^+]$ : concentração do composto terapêutico protonado

$k$ : constante de Boltzmann

$\ell$ : comprimento dos monômeros que constituem o polímero

$L$ : comprimento da cadeia polimérica

$l_c$ : comprimento crítico da cadeia ou cadeias de hidrocarboneto

$L_e$ : comprimento da cadeia polimérica completamente esticada

$\mu$ : viscosidade do solvente

$M$ : peso molecular do polímero

[Metilamina]: concentração de metilamina radioativa

$M_0$ : peso molecular dos monômeros que constituem o polímero

$n$ : número de monômeros que constituem o polímero

$p$ : parâmetro de empacotamento

$P$ : coeficiente de partição aparente

$R_f$ : raio de Flory (tamanho efetivo da cadeia polimérica)

$R_g$ : raio de giração do polímero

$R_h$ : raio hidrodinâmico médio do lipossoma

$s$ : distância entre cadeias poliméricas distribuídas na superfície de um lipossoma

T: temperatura absoluta

T<sub>m</sub>: temperatura de transição

v: volume molecular da porção hidrofóbica do fosfolípido



## RESUMO

Neste estudo, descreve-se a preparação e caracterização de vesículas lipídicas (lipossomas) projetadas para o transporte e deposição específica de três compostos terapêuticos, o-carboranilpropilamina (CPA), L-p-borono-fenilalanina (BPA) e doxorubicina (DOX) em tumores cerebrais malignos. Estudou-se os efeitos das condições de encapsulamento na incorporação ativa e passiva dos referidos compostos em lipossomas unilamelares de composição e tamanhos variados. A influência de variáveis como temperatura, tempo de incubação composto terapêutico/lipossomas e razão molar inicial composto terapêutico/lipídio na estabilidade dos sistemas foi estudada. O acoplamento de anticorpos das classes IgG e IgM em lipossomas encapsulando DOX foi também avaliado, com a finalidade de aumentar a especificidade de interação das vesículas com células de tumor cerebral maligno. A toxicidade dos lipossomas preparados foi avaliada tanto *in vitro*, com células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1, como *in vivo*, pela injeção das amostras em ratos.

Os resultados mostram que a razão molar final composto terapêutico/lipídio, o número de anticorpos ligados por vesícula e a estabilidade dos lipossomas podem ser controlados pelas condições operacionais utilizadas. Para lipossomas com diâmetro médio de 100 nm, encapsulou-se cerca de 10.000, 13.000 e 66.000 moléculas de BPA, CPA e DOX por vesícula, respectivamente. Estas vesículas apresentaram boa estabilidade de estocagem em temperaturas de 4 a 5°C no período de um mês. Acoplou-se covalentemente até 6 anticorpos do tipo IgG e 40 subunidades monoméricas de IgM por vesícula. Demonstrou-se que lipossomas recobertos com um anticorpo específico contra células SK-MG-1 ligam-se 17 vezes mais a estas

células que vesículas acopladas a um anticorpo controle não específico. Os estudos de toxicidade *in vitro* indicaram que a proliferação das células SK-MG-1 foi reduzida em até 45 % pelo uso de imunolipossomas específicos contendo DOX. A injeção dos lipossomas em ratos mostrou-se relativamente segura e a deposição específica *in vivo* de CPA por intermédio de lipossomas em tumores implantados no cérebro de ratos foi demonstrada.

## CAPÍTULO I

# INTRODUÇÃO

A perspectiva de vida de pacientes que tenham desenvolvido tumores malignos no cérebro é bastante limitada, mesmo depois de tratamento segundo as terapias correntemente utilizadas. O tempo médio de sobrevivência após o diagnóstico está em torno de apenas 5 a 13 meses (Bergevin, 1979). Este fato tem estimulado a pesquisa de novos agentes terapêuticos e de métodos de tratamento alternativos, tanto com a finalidade de melhorar o prognóstico como a qualidade de vida de pacientes com este tipo de enfermidade.

No último século, houve um grande desenvolvimento na tecnologia de obtenção de novos medicamentos, mas o modo de administração destas drogas para a terapia de diversas doenças não se desenvolveu significativamente. Desta forma, os compostos terapêuticos ainda são administrados ao paciente de maneira arcaica e pouco eficiente, o que geralmente conduz à manifestação de efeitos colaterais indesejáveis.

Lipossomas (vesículas lipídicas) constituem-se em uma opção relevante em aplicações onde o encapsulamento e a proteção de substâncias são requeridos, principalmente para a liberação controlada de compostos terapêuticos *in vivo*. Estas vesículas têm sido testadas com sucesso como transportadores de drogas, material genético, enzimas e outras macromoléculas para o interior de células vivas (Lasic, 1988; Lasic, 1992). Na pesquisa básica, estas vesículas podem também ser utilizadas como modelos de membranas celulares.

Embora os lipossomas tenham sido descobertos no ano de 1961 pelo cientista inglês Alec D. Bangham, o potencial de sua aplicação nas áreas

médicas e farmacêuticas só foi observado cerca de 15 anos depois. Desde o final da década de 70, os lipossomas passaram a despertar interesse dos pontos de vista científico e comercial.

Vários grupos de pesquisa demonstraram em estudos pré-clínicos a potencialidade do uso de diferentes drogas encapsuladas em lipossomas na terapia de diversas doenças, entre elas a leishmaniose, a artrite e especialmente o câncer (Ostro, 1987a; Ostro, 1987b; Lasic, 1992; Crommelin e Schreier, 1994; Lasic e Martin, 1995). O projeto racional de vesículas contendo drogas ou vacinas encapsuladas aliado ao avanço recente na tecnologia de lipossomas culminou no desenvolvimento de diversas formulações injetáveis com uso já licenciado em humanos (Gregoriadis, 1995; Lasic e Martin, 1995).

O uso destas vesículas como veículos para a liberação controlada de drogas e outras substâncias para células é baseado em diversas características de importância farmacológica (Barenholz e Crommelin, 1994). Primeiramente, os lipossomas podem ser bem caracterizados química e fisicamente, sendo adequados para o carregamento de compostos hidrofílicos, hidrofóbicos e anfipáticos, pois apresentam um ambiente lipofílico (composto pela membrana fosfolipídica) e um meio interno aquoso. Estas vesículas lipídicas são biocompatíveis devido à sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e imunogenicidade reduzida ou inexistente, podendo ser administradas através de diversas rotas, incluindo as vias ocular, pulmonar, nasal, oral, intramuscular, subcutânea, tópica e intravenosa. Os lipossomas podem ser utilizados para a liberação controlada de drogas tanto em fluidos corpóreos (agindo como micro-reservatórios) quanto no interior de células (após a endocitose), reduzindo a exposição de tecidos sensíveis à ação de drogas tóxicas. Finalmente, a farmacocinética e a biodistribuição *in vivo* de lipossomas podem ser controladas pela seleção adequada da via de administração, da composição em lipídios e do tamanho da vesícula.

O desenvolvimento bem sucedido de lipossomas para aplicações médicas depende da metodologia de preparação das vesículas. A seleção da composição em lipídios, do tamanho da vesícula e do método utilizado para a incorporação do agente terapêutico nos lipossomas são elementos fundamentais no projeto destes sistemas, determinando as características físico-químicas e o impacto biológico final associado à sua administração. A versatilidade e a disponibilidade de um grande número de métodos proporciona a seleção racional de protocolos que se adequem a necessidades específicas. Alguns aspectos, como a disponibilidade e custo da matéria-prima, são decisivos na seleção dos protocolos, assim como considerações no campo farmacológico envolvendo a rota de administração e a dosagem necessária. Uma vez estabelecidas as metodologias, é essencial o uso de estratégias de otimização de maneira a garantir, entre outros fatores, a incorporação eficiente e econômica do composto terapêutico, bem como a estabilidade química e física do sistema obtido.

Neste estudo, descreve-se em detalhes a preparação e caracterização de lipossomas projetados para o transporte e deposição específica de três compostos terapêuticos, o-carboranilpropilamina (CPA), L-p-boronofenilalanina (BPA) e doxorubicina (DOX) em células de tumores cerebrais malignos. O uso dos dois primeiros compostos seria indicado na Terapia de Captura de Nêutrons por Boro (TCNB), que envolve princípios da radioterapia, enquanto o terceiro composto seria utilizado em um tratamento combinando princípios da quimioterapia e da imunoterapia. Avaliou-se os efeitos das condições de encapsulamento na incorporação dos referidos compostos em lipossomas unilamelares apresentando composição e tamanhos variados. A influência de variáveis como temperatura, tempo de incubação composto terapêutico/lipossomas e razão molar inicial composto terapêutico/lipídio na estabilidade dos sistemas foi estudada. O acoplamento de anticorpos

das classes IgG e IgM em lipossomas encapsulando DOX foi avaliado, com a finalidade de aumentar a especificidade de interação das vesículas com células de tumor cerebral maligno. A toxicidade dos sistemas obtidos foi avaliada *in vitro*, com células de tumor cerebral do tipo Glioblastoma Multiforme SK-MG-1, e *in vivo*, pela injeção intracraniana das amostras em ratos.

## CAPÍTULO II

# REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo, serão abordados vários aspectos relevantes no estudo de lipossomas convencionais, de lipossomas estericamente estabilizados com polietileno glicol e de imunolipossomas contendo compostos terapêuticos encapsulados para a aplicação na terapia de tumores cerebrais malignos.

### **2.1. Considerações Gerais sobre Lipossomas**

Lipossomas, ou vesículas lipídicas, são estruturas ocas nas quais o volume aquoso central é completamente circundado por uma membrana composta de lipídios (normalmente, fosfolipídios e colesterol), podendo apresentar diâmetros da ordem de dezenas de nanômetros a dezenas de micra. Os lipossomas são formados a partir da hidratação de um filme lipídico seco e, durante o processo de sua formação, estas vesículas podem seqüestrar substâncias da solução, as quais podem se alojar em várias partes da estrutura do lipossoma de acordo com suas características hidrofílicas ou hidrofóbicas (Ostro, 1987a; Lasic, 1992). Este fato torna possível o uso de lipossomas para o encapsulamento de diversos tipos de compostos, como substâncias terapêuticas.

Por consistirem de uma parte polar ou cabeça hidrofílica (grupo fosfato), ligada a uma cauda hidrofóbica apolar (geralmente formada por duas cadeias longas de ácidos graxos), os fosfolipídios exibem propriedades anfífilas (Lasic, 1992). Assim, pelo fato de apresentar apenas uma porção da molécula solúvel em

água, quando colocados em presença de uma solução aquosa, os lipídios tendem a se agregar em estruturas ordenadas acima de uma concentração crítica.

As forças que governam o arranjo dos lipídios entre si de forma a se organizarem em estruturas definidas resultam da atração hidrofóbica na interface hidrocarboneto-água, que induz as moléculas a se associarem, e da repulsão hidrofílica, iônica ou estérica dos grupos polares, que impõe o contato da molécula de lipídio com a água. O tipo de estrutura formada pela associação de lipídios e outros compostos anfílicos depende das características das moléculas envolvidas, sendo possível a obtenção de agregados com diferentes morfologias, como ilustrado na Figura 1.

Para que ocorra a formação de lipossomas, as moléculas anfílicas devem estar primeiramente organizadas na forma de lamelas ou bicamadas. Embora a bicamada lipídica seja um dos arranjos estruturais mais simples, a exposição de suas extremidades laterais hidrofóbicas a moléculas de água é termodinamicamente desfavorável, resultando na tendência de enrolamento em estruturas esféricas fechadas que retêm um cerne aquoso, formando os lipossomas (Lasic, 1992).

Israelachvili (1994) propõe que o tipo de morfologia das estruturas formadas por moléculas de lipídios e outros compostos anfílicos em soluções aquosas pode ser predito a partir de suas propriedades geométricas de empacotamento. Tais propriedades podem ser convenientemente representadas pelo parâmetro de empacotamento,  $p$ , de acordo com a seguinte equação:

$$p = \frac{v}{a_o l_c} \quad (1)$$

onde  $v$  é o volume molecular da porção hidrofóbica,  $a_o$  é a área superficial ótima,



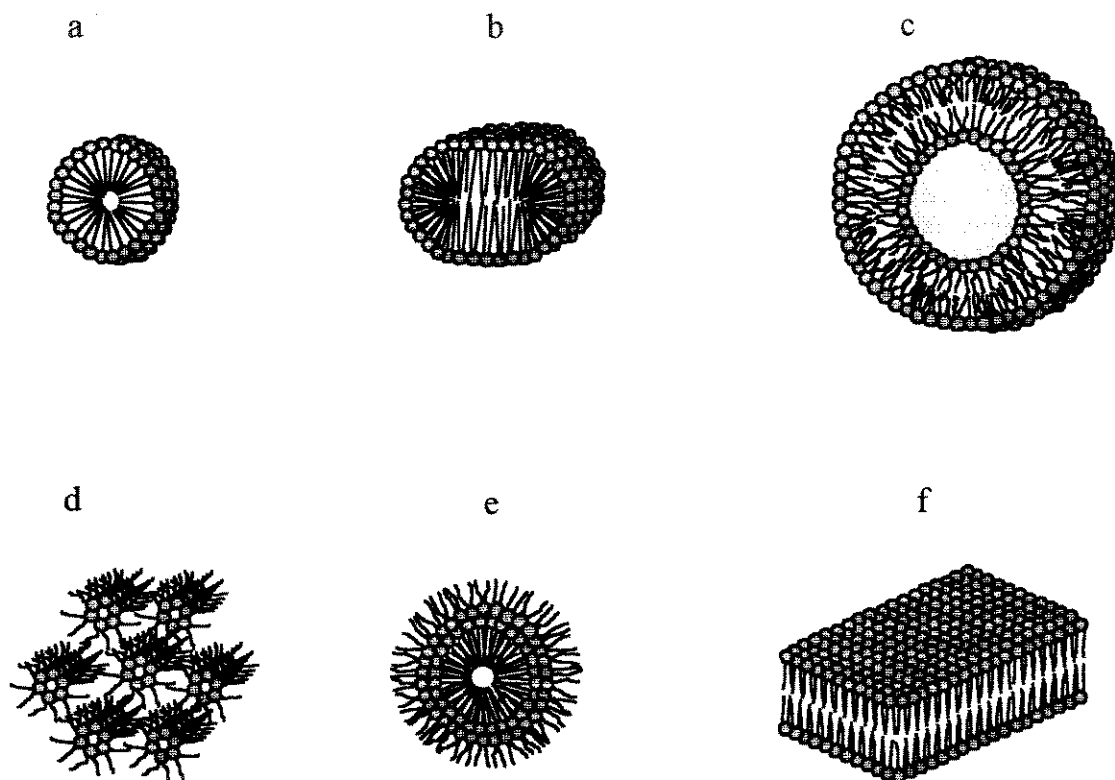


Figura 1 - Estruturas ordenadas formadas por moléculas de lipídios em soluções aquosas. O tipo de estrutura geométrica resultante do empacotamento dos lipídios é determinado pelos tamanhos relativos das cabeças polares e das caudas apolares. Lipídios com cabeças polares relativamente grandes formam estruturas com elevados raios de curvatura (a, b e c). Lipídios com cabeças polares muito pequenas e caudas apolares grandes são empacotados em estruturas invertidas, onde as cadeias de hidrocarboneto compõem a camada externa (d e e). Misturas de lipídios com cabeças polares grandes e pequenas também podem formar vesículas (c). Moléculas de lipídios com partes polares e apolares de tamanho similar tendem a formar bicamadas achatadas (f), que podem se fechar sobre si mesmas, formando um lipossoma (figura adaptada de Lasic, 1992).

(definida como a área ocupada pela porção hidrofílica quando a energia de interação entre os lipídios é mínima) e  $l_c$  é o comprimento crítico da cadeia ou cadeias de hidrocarboneto, não podendo ultrapassar o comprimento máximo efetivo que as cadeias podem assumir quando completamente distendidas.

Assim, um composto na forma de cone apresentando  $p < 1/3$  poderia formar micelas esféricas em condições apropriadas. Compostos na forma de cone truncado com  $1/3 < p < 1/2$  formariam micelas cilíndricas e, com  $1/2 < p < 1$ , formariam bicamadas flexíveis ou lipossomas. Moléculas cilíndricas com  $p$  próximo à unidade resultariam em bicamadas planas, enquanto compostos com  $p > 1$  na forma de cones truncados invertidos formariam micelas invertidas.

Outros fatores que podem afetar as estruturas formadas pelas moléculas de compostos anfílicos são o tamanho da porção hidrofílica, a presença de ramificações e insaturações nas cadeias hidrofóbicas, a força iônica do meio aquoso e a temperatura (Israelachvili, 1994).

Dependendo do tipo de fosfolipídio e da temperatura utilizada, as bicamadas podem se encontrar em um estado de gel, com as cadeias de hidrocarbonetos bem organizadas, ou de líquido-cristalino, onde as cadeias de hidrocarbonetos estão desordenadas (New, 1990). Esta mudança de fases ocorre na chamada temperatura de transição ( $T_m$ ). Cada um dos fosfolipídios que compõem o lipossoma apresenta uma  $T_m$  característica de transição de gel para líquido-cristalino. Esta temperatura depende inteiramente da estrutura do fosfolipídio, sendo afetada pelo comprimento das cadeias hidrofóbicas, pelo grau de saturação e pelo tipo de grupamento polar, podendo variar de  $-15^\circ\text{C}$  para a fosfatidilcolina de gema de ovo com grande número de insaturações até mais de  $50^\circ\text{C}$  para a distearoil-fosfatidilcolina completamente saturada. A mistura de diferentes componentes pode causar uma mudança em  $T_m$  e/ou o completo desaparecimento da transição de fases. Acima de  $T_m$ , pode haver um aumento na liberação do conteúdo hidrossolúvel do lipossoma (Talsma e Crommelin, 1992a).

O conhecimento das transições de fases de membranas fosfolipídicas é de importância fundamental na tecnologia de lipossomas, pois a transição de fases determina propriedades como a permeabilidade da bicamada, a fusão e agregação de vesículas e sua interação com proteínas, afetando a estabilidade dos lipossomas e o seu comportamento em sistemas biológicos (New, 1990).

Na produção de lipossomas geralmente são selecionadas condições onde as bicamadas se formam no estado de líquido-cristalino. Esta prática reduz o aparecimento de defeitos de empacotamento que podem alterar a estrutura do lipossoma.

## **2.2. Classificação dos Lipossomas**

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com o seu tamanho e o número de bicamadas lipídicas que apresentam em sua constituição, como ilustrado na Figura 2 e na Tabela 1. Estruturas compostas por diversas bicamadas sucessivamente separadas por compartimentos fluidos são chamadas de vesículas multilamelares. Vesículas cujos interiores apresentam outros lipossomas de tamanhos variados são denominadas vesículas multivesiculares. Vesículas que apresentam uma única bicamada e uma região aquosa central, por sua vez, são denominadas unilamelares, podendo ser pequenas ou grandes.

A literatura registra uma extensa discussão relacionada à classificação das vesículas de acordo com as suas dimensões. Barenholz e Crommelin (1994) sugerem um tipo de classificação onde as vesículas grandes seriam definidas como aquelas que não apresentam efeitos detectáveis da curvatura da bicamada lipídica nas propriedades físicas do lipossoma. Entre essas propriedades, estariam a transição de fases gel-líquido cristalino e a distribuição de lipídios entre as

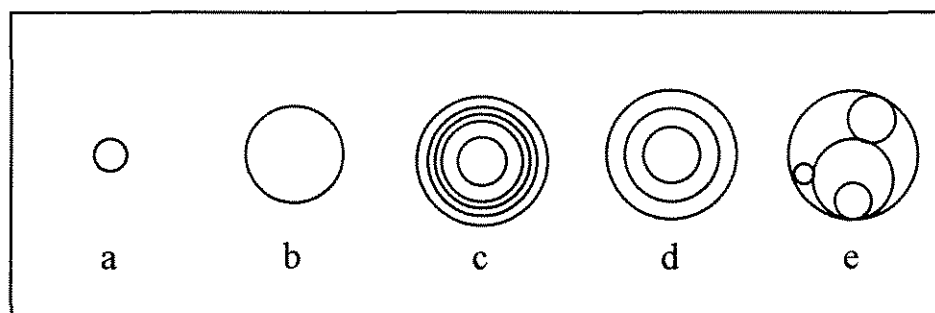


Figura 2 - Classificação de lipossomas quanto à morfologia. (a) Vesícula unilamelar pequena, VUP; (b) vesícula unilamelar grande, VUG; (c) vesícula multilamelar, VML; (d) vesícula oligolamelar, VOL; (e) vesícula multivesicular, VMV (figura adaptada de Barenholz e Crommelin, 1994).

Tabela 1 - Classificação de lipossomas baseada em parâmetros estruturais (Barenholz e Crommelin, 1994).

Classificação/Abreviatura	Diâmetro da Vesícula
Vesícula Multilamelar (VML)	> 0,5 $\mu\text{m}$
Vesícula Oligolamelar (VOL)	0,1 a 1 $\mu\text{m}$
Vesícula Unilamelar Pequena (VUP)	20 a 100 nm
Vesícula Unilamelar Grande (VUG)	> 100 nm
Vesícula Unilamelar Gigante (VUGI)	> 1 $\mu\text{m}$
Vesícula Multivesicular (VMV)	geralmente > 1 $\mu\text{m}$

monocamadas formadoras da lamela do lipossoma. Segundo os autores, este conceito aplica-se a lipossomas com diâmetros maiores que 100 nm, de maneira que vesículas com diâmetros menores seriam classificadas como pequenas.

Essa distinção de comportamento entre vesículas grandes e pequenas é atribuída à diferença no empacotamento das moléculas de lipídios nas monocamadas interna e externa de lipossomas pequenos. Este fato implica em uma tendência de curvatura das monocamadas em direções opostas, o que não ocorre com vesículas maiores. Além das propriedades físicas, o diâmetro das vesículas relaciona-se também às características farmacocinéticas e à interação composto terapêutico/ lipossoma.

### **2.3. Mecanismos de Formação de Lipossomas**

Embora seja possível a produção de lipossomas por diversas técnicas distintas, os mecanismos exatos envolvidos em sua formação ainda não estão completamente esclarecidos. Uma das teorias mais aceitas é a de “fragmentos de bicamadas lipídicas”, proposta por Lasic em 1988.

Segundo Lasic (1988), a observação do processo de inchamento em água de filmes fosfolipídicos secos, através de microscopia ótica de contraste de fases, permite que se obtenha alguns indícios geométricos do mecanismo de formação de vesículas multilamelares. Entretanto, uma vez que as estruturas intermediárias são formadas e mantidas por influências externas (acústicas, de gradientes de concentração, por exemplo), as mesmas são bastante instáveis e de difícil monitoramento. Na Figura 3 pode-se observar uma representação esquemática deste modelo de formação de vesículas.

De acordo com a proposta de Lasic (1988), com a adição de água ao filme

fosfolipídico seco, as duplas camadas mais externas hidratam-se, originando inchamentos convexos. Estes inchamentos são formados em decorrência do aumento da área superficial resultante da hidratação das cabeças polares. A água penetra entre as duplas camadas, bem como através dos inchamentos. A reação de hidratação reduz a energia do sistema, aumentando ainda mais a área superficial específica dos lipídios envolvidos, de forma que as duplas camadas transformam-se em fibras tubulares, aumentando sua área de contato com a água. As duplas camadas deslizam, então, expondo ao máximo suas cabeças polares à água, e se estabilizam em suas distâncias de equilíbrio, as quais são estabelecidas pelo compromisso entre as forças repulsivas estéricas e de ondulação e as forças atrativas de Van der Waals.

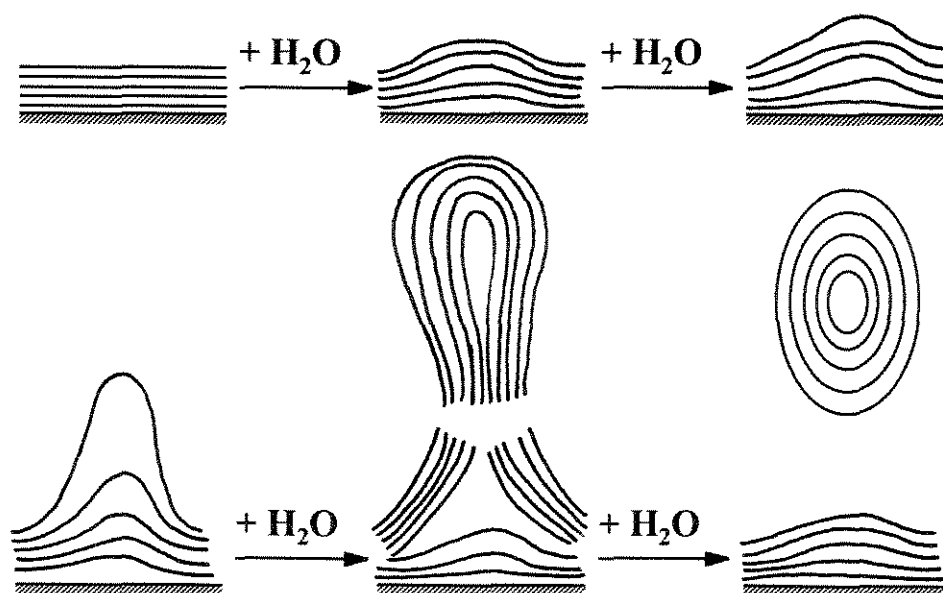


Figura 3 - Representação esquemática da formação de uma vesícula multilamelar através da hidratação do filme fosfolipídico seco. Cada linha representa um fragmento de bicamada fosfolipídica (figura adaptada de Lasic, 1988).

Possíveis defeitos de cristalização ou de empacotamento em um lado ou ponto do inchamento podem induzir a um torque, de tal forma que as fibras se transformam em estruturas helicoidais. Sob agitação, essas fibras se destacam e imediatamente isolam as extremidades expostas, formando os lipossomas.

Vesículas multilamelares são originadas do destacamento de feixes de lamelas. Alternativamente, estes feixes podem apresentar a região interna progressivamente inchada, e terminam por deslizar, com suas extremidades ainda ligadas à bicamada imediatamente anterior. Após desconectar-se da superfície, as lamelas fecham-se sobre si mesmas.

A intensidade de agitação influi diretamente na distribuição de tamanhos das vesículas formadas, que têm formas geralmente ovais, e não esféricas, devido à natureza de seu processo de formação. Com o decorrer do tempo, no entanto, as estruturas ovais transformam-se em esféricas, onde sua energia de curvatura é mínima, e o volume retido, máximo. Isto é alcançado, possivelmente, através de deslocamentos bidirecionais das moléculas de fosfolípido. O número de moléculas na monocamada externa, que pode ser superior a 50 % das moléculas totais que a compõem dependendo dos eventos que ocorrem durante a formação dos lipossomas, determina a forma da vesícula.

Embora os lipossomas formem-se espontaneamente quando um filme seco de lipídios incha em presença de excesso de solução aquosa, as vesículas unilamelares apresentam maiores energias livres, de tal forma que é necessário se dissipar uma certa quantidade de energia no sistema para que se consiga produzi-las. A “teoria do brotamento”, ilustrada na Figura 4, propõe que fosfolípidios hidratados e organizados em arranjos lamelares (como vesículas multilamelares grandes) podem ser convertidos a vesículas unilamelares ou oligolamelares de menores dimensões pela aplicação de diversas formas de tensão ao sistema, como a sonicação ou a extrusão ( Barenholz e Crommelin, 1994).

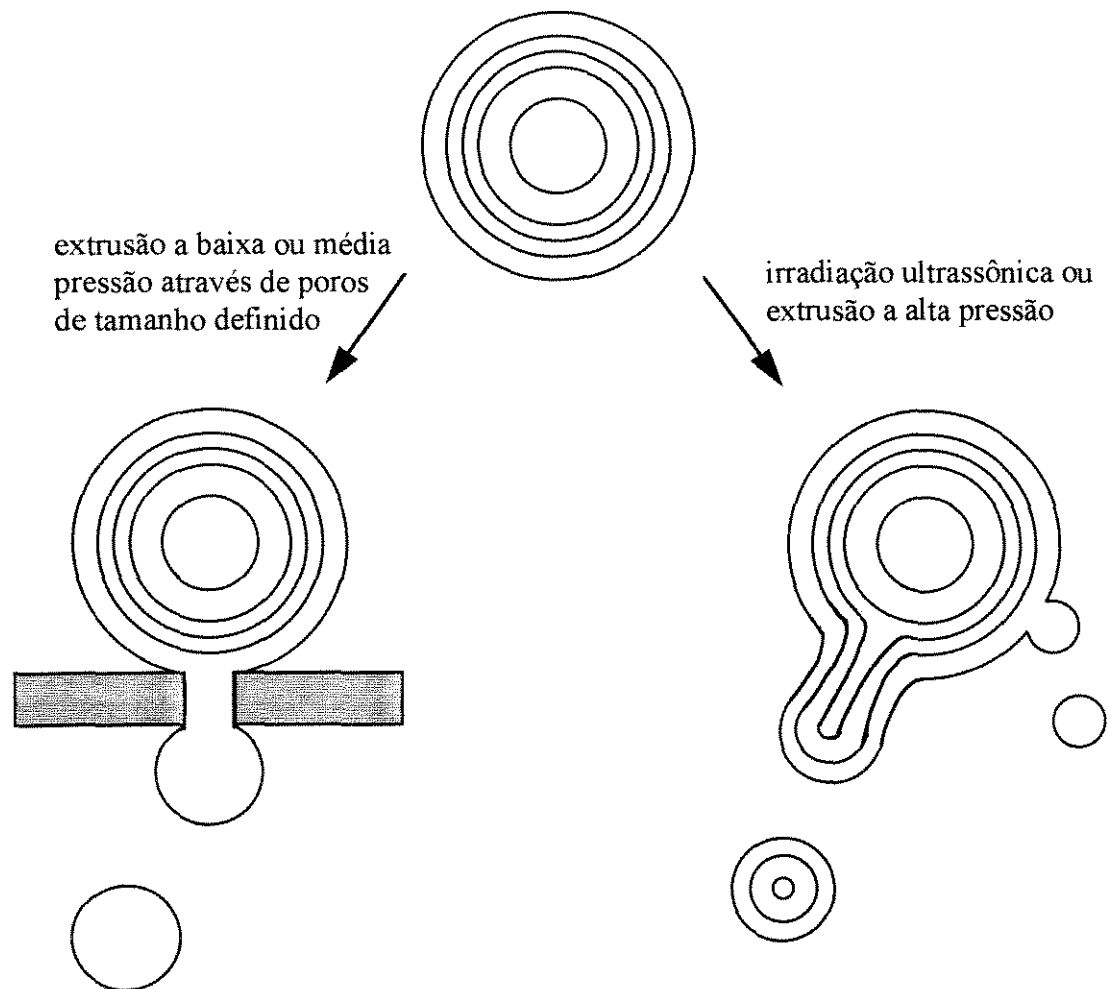


Figura 4 - Formação de vesículas de acordo com a "teoria do brotamento" (figura adaptada de Barenholz e Crommelin, 1994).

Os lipossomas podem também ser formados pela desestabilização de micelas mistas. Neste caso, os fosfolipídios são colocados em contato íntimo com a fase aquosa por intermédio de detergentes, que se associam com os lipídios, protegendo suas porções hidrofóbicas da água. As micelas formadas pela associação de lipídios e detergente são compostas por várias centenas de moléculas, e sua forma e tamanho dependem principalmente dos tipos de



compostos envolvidos e de suas concentrações (New, 1990; Crommelin e Schreier, 1994).

A remoção do detergente das micelas mistas por técnicas como a diálise induz a formação espontânea de vesículas unilamelares. Quando as micelas mistas perdem moléculas de detergente além de um certo limite, a prevenção do contato das cadeias hidrofóbicas do fosfolipídio com a fase aquosa é efetivamente reduzida. Isto resulta no arqueamento e conseqüente vesiculação das micelas com dimensões já alteradas para minimizar a área de contato entre as cadeias hidrofóbicas e as moléculas de água.

## **2.4. Preparação de Lipossomas**

Dependendo da seleção dos componentes da bicamada e do método de preparação utilizado, os lipossomas podem variar consideravelmente algumas de suas características físico-químicas como tamanho, número de lamelas, carga, fluidez da bicamada e volume encapsulado (Talsma e Crommelin, 1992b).

Em geral, a preparação de lipossomas envolve três etapas básicas: a obtenção de um filme lipídico seco proveniente da evaporação dos solventes orgânicos utilizados para solubilizar os lipídios, a dispersão do filme seco em um meio aquoso e a redução do tamanho das vesículas.

### ***2.4.1. Matérias-Primas Utilizadas no Preparo de Lipossomas***

Diversos lipídios e outros compostos anfífilicos podem ser utilizados como matérias-primas ou aditivos na constituição da matriz anfífilica requerida para a formação dos lipossomas. Em geral, os fosfolipídios são os compostos mais

utilizados na preparação de lipossomas destinados a aplicações terapêuticas. Estes compostos podem ser classificados em cinco categorias distintas, fosfolípidios naturais, fosfolípidios naturais modificados, fosfolípidios semi-sintéticos, fosfolípidios completamente sintéticos e fosfolípidios com grupamentos polares modificados (Crommelin e Schreier, 1994).

Os fosfolípidios de fontes naturais em geral são extraídos de gemas de ovos ou da soja, sendo disponíveis comercialmente com diversos graus de pureza. O composto de uso mais comum pertencente a esta classe é a fosfatidilcolina, seguida pela fosfatidiletanolamina, pela esfingomiéline e pelo fosfatidilinositol. Os lípidios do tipo fosfatidilcolina são muito utilizados em formulações de lipossomas devido ao seu custo relativamente baixo quando comparado ao de outros fosfolípidios, devido à sua carga neutra e ao fato de que são quimicamente inertes (New, 1990).

Em geral, lípidios desta classe apresentam diversas insaturações nas cadeias hidrofóbicas, o que os torna susceptíveis à oxidação, reduzindo o tempo de estabilidade de estocagem de lipossomas preparados com estes materiais.

Os fosfolípidios naturais modificados provêm das mesmas fontes que os anteriores, mas são quimicamente modificados por processos como hidrogenação parcial ou completa, com a finalidade de se reduzir o seu grau de insaturação. Este procedimento geralmente resulta em lípidios com melhor aparência e maior resistência à peroxidação.

Os fosfolípidios semi-sintéticos são preparados pela substituição das cadeias hidrofóbicas de fosfolípidios naturais por cadeias com constituição química definida. Os fosfolípidios sintéticos, por sua vez, são preparados completamente por via química.

A alteração do grupamento polar na parte hidrofílica do fosfolípido permite a introdução de resíduos que podem imprimir novas características à superfície dos lipossomas, possibilitando ou dificultando interações com diversos

tipos de moléculas. Entre os tipos de moléculas mais comumente acoplados estão os anticorpos monoclonais e os peptídeos, que podem interagir com receptores na superfície das células, e cadeias de polietileno glicol, que aumentam a estabilidade dos lipossomas em aplicações *in vivo*.

Uma outra categoria de lipídios fundamental na preparação de lipossomas é a de esteróis. Nesta categoria, o colesterol (esterol extraído de células de mamíferos) é o composto mais representativo. Este composto não é capaz de, por si só, formar estruturas na forma de bicamadas, mas pode ser incorporado em membranas de fosfolipídios puros ou em misturas em concentrações de até 50 %. Pelo fato de também ser uma molécula anfifílica, o colesterol é inserido na membrana com seu grupo hidroxila orientado na direção da fase aquosa, de forma a alinhar sua cadeia alifática paralelamente aos dez primeiros átomos de carbono que compõem as cadeias hidrofóbicas dos fosfolipídios presentes na bicamada (New, 1990). Devido ao menor tamanho de suas porções polar e apolar em comparação com as dos fosfolipídios, este posicionamento reduz a liberdade de movimento da parte superior das cadeias hidrofóbicas dos fosfolipídios em contato com o colesterol e simultaneamente cria espaços nas extremidades livres das cadeias, possibilitando a movimentação dos átomos de carbono terminais (New, 1990).

#### **2.4.2. Métodos de Obtenção de Lipossomas**

Diversas técnicas de preparação de lipossomas estão descritas na literatura, (Lasic, 1988; New, 1990; Talsma e Crommelin, 1992a; Barenholz e Crommelin, 1994; Crommelin e Schreier, 1994). O livro editado por New (1990), em particular, descreve detalhes experimentais para a produção de lipossomas em escala de laboratório por uma grande variedade de metodologias.

Os métodos mais comumente utilizados e os tipos de vesículas obtidas

através de seu uso estão listados na Tabela 2. A diferença entre os vários métodos disponíveis baseia-se nas maneiras pelas quais as etapas de hidratação dos lipídios, redução das dimensões das vesículas e remoção do material não encapsulado são conduzidas e combinadas.

O preparo de lipossomas pode envolver técnicas de dispersão mecânica, de substituição de solventes orgânicos por soluções aquosas, de remoção de detergente, de mudança de tamanho e fusão de vesículas e de alteração de pH durante a etapa de hidratação dos lipídios. A redução do tamanho dos lipossomas, por sua vez, pode ser feita por técnicas de extrusão ou sonicação de vesículas multilamelares.

Uma vez que os lipossomas formados necessariamente apresentam dimensões muito maiores que as dos materiais neles encapsulados, a separação do material não incorporado pode ser obtida com base na diferença de tamanho das duas espécies. As técnicas mais utilizadas são a diálise, a ultracentrifugação, a cromatografia de filtração em gel e a separação com resinas de troca iônica (New, 1990).

Em geral, os métodos listados na Tabela 2 são utilizados para a produção de lipossomas em escala laboratorial. A hidratação dos lipídios é a etapa de maior dificuldade na produção de lipossomas em larga escala. Este problema pode ser solucionado pelo aumento da área superficial utilizada na obtenção do filme lipídico, utilizando, por exemplo, a técnica de liofilização (Barenholz e Crommelin, 1994).

Uma vez que pequenas variações nas técnicas e condições experimentais utilizadas na produção dos lipossomas podem alterar as propriedades do produto final, é necessário que se estabeleça protocolos detalhados de preparação para que se obtenha, reprodutivelmente, vesículas com características previamente determinadas (Talsma e Crommelin, 1992a).

Tabela 2 - Métodos de preparação de lipossomas e tipos de vesículas produzidas (adaptada de Crommelin e Schreier, 1994). VUP: vesícula unilamelar pequena; VUG: vesícula unilamelar grande; VML: vesícula multilamelar; VOL: vesícula oligolamelar.

Método	Tipo de Vesícula Obtida
<i>Etapa de Hidratação</i>	
A. Métodos Mecânicos	
a. Agitação manual ou por vórtice	VML
b. Microfluidização	VUP
c. Borbulhamento de gás inerte	VML, VUG
d. Homogeneização com alto cisalhamento	VUP
B. Métodos Baseados na Substituição de Solventes	
Orgânicos por Soluções Aquosas	
a. Remoção dos solventes orgânicos antes da hidratação	VML, VOL, VUP
b. Evaporação da fase reversa	VUG, VOL, VML
c. Uso de solventes imiscíveis com água	VML, VOL, VUG
d. Uso de solventes miscíveis com água	VML, VOL, VUP
C. Métodos Baseados na Remoção de Detergente	
a. Cromatografia de filtração em gel	VUP
b. Diálise lenta	VUG, VOL, VML
c. Diálise rápida	VUG, VOL
d. Técnicas mistas	VML, VOL, VUG, VUP
D. Métodos Baseados na Modificação de Tamanho e Fusão	
a. Fusão espontânea de VUP na fase de gel	VUG
b. Congelamento/descongelamento	VML
c. Liofilização	VML
d. Desidratação/reidratação seguida ou não de ajuste de diâmetro	VUP, VUG
e. Fusão induzida pelo íon Ca <sup>2+</sup>	VUG, VOL, VML
f. Crescimento de lipossomas induzido por detergente	VUG, VOL
E. Métodos Baseados em Ajuste de pH	VUP, VUG
<i>Etapa de Redução de Tamanho</i>	
A. Extrusão a Alta Pressão	VOL, VUP, VUG
B. Extrusão a Baixa Pressão	VUP, VUG
C. Tratamento Ultrassônico	VUP

## 2.5. Incorporação de Compostos Terapêuticos em Lipossomas

Atualmente, a maior aplicação farmacológica dos lipossomas é a liberação controlada de medicamentos. Assim, a obtenção de lipossomas com boa eficiência de encapsulamento é fundamental, principalmente quando há dificuldades na recuperação do material não encapsulado ou quando se necessita administrar doses elevadas do medicamento (Barenholz e Crommelin, 1994).

De maneira geral, as características físico-químicas dos compostos terapêuticos definem sua localização no lipossoma, fornecendo indícios das técnicas mais adequadas para o seu encapsulamento. Algumas destas características são a solubilidade e o peso molecular do composto. Outra variável que pode afetar a eficiência de encapsulamento do composto terapêutico em lipossomas é a sua partição entre a bicamada lipídica e o meio aquoso, principalmente se este composto for uma amina lipofílica protonada (Madden et al., 1990). O coeficiente de partição de um composto em um solvente orgânico relativamente não polar e a água é geralmente aceito como uma medida adequada da lipofilicidade da droga, indicando sua tendência de acúmulo em membranas celulares.

Na maioria das vezes, o solvente orgânico utilizado é o 1-octanol, que apresenta uma longa cadeia alifática saturada e um grupo hidroxila capaz de participar de pontes de hidrogênio, dissolvendo a água até um limite de saturação de 1,7 M (Silverman, 1992). Essa combinação de cadeias lipofílicas, grupos hidroxila e moléculas de água confere ao 1-octanol propriedades bastante próximas às encontradas em membranas naturais, assim como em lipossomas. Desta forma, a avaliação de coeficientes de partição de compostos terapêuticos em sistemas formados por 1-octanol e soluções aquosas pode ser

uma ferramenta importante no estudo preliminar da incorporação de compostos terapêuticos em lipossomas e da posterior liberação da droga.

Barenholz e Crommelin (1994) classificam os compostos terapêuticos em três categorias, de acordo com seu tipo de interação com a bicamada lipídica. O primeiro grupo compreende compostos hidrofílicos solúveis em água com coeficientes de partição óleo/água e octanol/água praticamente nulos. Os coeficientes de partição óleo/água, neste caso, relacionam-se às interações que poderiam ocorrer entre o composto terapêutico e as porções das cadeias lipídicas hidrofóbicas localizadas na região central da bicamada lipídica. Os compostos pertencentes a esta classe não interagem com a bicamada, e a eficiência de seu encapsulamento está diretamente relacionada ao volume de solução aquosa capaz de ser retido no cerne da vesícula.

O segundo grupo está relacionado a compostos com baixos coeficientes de partição óleo/água. Entretanto, seus coeficientes de partição octanol/água podem variar consideravelmente. Neste caso, os coeficientes de partição bicamada lipídica/meio aquoso não estão diretamente relacionados aos coeficientes de partição óleo/água e octanol/água devido ao espaço limitado disponível no interior da bicamada e à maior restrição de movimentação dos componentes da bicamada em comparação com sistemas contendo apenas óleo ou octanol. Os coeficientes de partição dos compostos pertencentes a este grupo dependem do pH e da força iônica do meio onde se encontram.

O terceiro grupo inclui compostos com elevados coeficientes de partição óleo/água e octanol/água. Alguns destes compostos podem ser solubilizados pelos componentes da bicamada lipídica. Entretanto, a afinidade de alguns dos elementos deste grupo por bicamadas lipídicas pode ser limitada por restrições estéricas.

### *2.5.1. Técnicas de Encapsulamento de Compostos Terapêuticos em Lipossomas*

A encapsulação de agentes terapêuticos em lipossomas pode ser feita por incorporação passiva ou ativa (Mayer et al., 1986). Na incorporação passiva, o agente terapêutico é encapsulado durante a formação das vesículas ou em uma etapa onde a estrutura do lipossoma se encontra perturbada. Neste caso, a eficiência de encapsulamento, definida como a fração de composto terapêutico encapsulado no lipossoma, é influenciada principalmente pelo volume de solução aquosa retido no cerne da vesícula, onde o soluto de interesse se encontra dissolvido. O volume de solução aquosa capturada, por sua vez, depende do tamanho e do número de lamelas da vesícula. Para vesículas unilamelares, o volume de solução capturada diminui com a diminuição do diâmetro do lipossoma. Para vesículas multilamelares (de igual tamanho e concentração), o aumento no número de lamelas conduz à diminuição do volume de solução aquosa capturada.

Na incorporação ativa, o agente terapêutico é adicionado a lipossomas previamente formados apresentando um gradiente de pH estabelecido entre os meios aquosos interno e externo às vesículas (o pH no cerne aquoso dos lipossomas é normalmente mantido em valores menores que no ambiente externo). O uso de gradientes de pH é especialmente útil na encapsulação de aminas lipofílicas.

O mecanismo da incorporação ativa é baseado no fato de que uma espécie não protonada (neutra) pode atravessar a bicamada lipídica do lipossoma. Havendo um excesso de prótons no cerne aquoso da vesícula, o agente terapêutico torna-se positivamente carregado, não mais sendo permeado através da bicamada lipídica e conseqüentemente, acumulando-se no interior do lipossoma. A redistribuição do agente terapêutico em resposta ao gradiente de pH pode resultar em eficiências de encapsulação próximas a 100 % (Mayer



et al., 1990; Madden et al., 1990; Mayer et al., 1993).

O efeito do pH nas concentrações do agente terapêutico interna e externa ao lipossoma é descrito pela equação de Henderson-Hasselbach:

$$[\text{HA}^+]_{\text{interna}} / [\text{HA}^+]_{\text{externa}} = [\text{H}^+]_{\text{interna}} / [\text{H}^+]_{\text{externa}} \quad (2)$$

onde  $[\text{HA}^+]$  é a concentração do composto terapêutico protonado e  $[\text{H}^+]$  é a concentração de prótons.

A eficiência da técnica de encapsulamento ativo depende da composição da bicamada lipídica, das características físico-químicas do composto encapsulado (tais como pK e tendência em interagir com a bicamada) e das condições experimentais utilizadas, como temperatura.

O encapsulamento ativo apresenta diversas vantagens em relação à incorporação passiva. Em geral, pode-se obter elevadas eficiências de encapsulação, sendo desnecessário remover o material não encapsulado. Uma outra vantagem é que não se expõe o composto encapsulado a solventes orgânicos, detergentes ou a condições onde cisalhamento intenso seja envolvido. Por fim, a utilização desta técnica permite que o encapsulamento possa ser feito imediatamente antes do uso dos lipossomas, evitando a degradação de compostos lábeis durante sua estocagem a longo termo na forma de dispersões aquosas.

## **2.6. Utilização de Lipossomas na Liberação Controlada de Compostos Terapêuticos**

Um dos objetivos básicos da quimioterapia é a liberação do composto

terapêutico ou droga de maneira eficiente e específica nas células afetadas pela doença. Em alguns casos, isto pode ser conseguido pela administração da droga em sua forma pura ou livre e, em diversas situações, a efetividade da droga pode ser aumentada através de sua encapsulação em carreadores específicos, como lipossomas (Lasic, 1992).

A prescrição da dosagem do medicamento, por sua vez, é o resultado de um compromisso. Por um lado, as drogas são potencialmente tóxicas, o que sugere sua administração na mínima quantidade possível. Por outro lado, as drogas diluem-se no sangue e grandes quantidades são degradadas ou absorvidas por tecidos saudáveis, além do que as mesmas podem ser excretadas antes de alcançar as células-alvo. Assim, as drogas são prescritas em quantidades elevadas o bastante para controlar o problema do paciente, mas em quantidades baixas o suficiente para evitar danos inaceitáveis a tecidos saudáveis (Ostro, 1987a).

Desta forma, é de grande importância o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de compostos terapêuticos, visando diminuir o risco e a ineficiência dos processos de administração convencionais, de maneira a elevar a razão efetividade/toxicidade.

Os lipossomas são uma opção relevante para o transporte e deposição específica de compostos terapêuticos em células, pois além de apresentar baixa toxicidade, são biodegradáveis. Além disto, os lipossomas são capazes de proteger os compostos terapêuticos nele encapsulados da diluição e degradação no sangue, de forma que quando alcançam os tecidos que necessitam de tratamento, podem liberar doses concentradas do medicamento.

Em terapias onde se utiliza vesículas fosfolipídicas, há duas alternativas possíveis para a administração da droga encapsulada, a aplicação direta dos lipossomas, destinados a seus alvos naturais, ou a utilização de lipossomas quimicamente modificados com determinantes moleculares superficiais seletivos e de grande afinidade, como anticorpos, com o objetivo de atingir alvos específicos.

### 2.6.1. Comportamento dos Lipossomas em Sistemas Biológicos

Em circunstâncias apropriadas, os lipossomas podem interagir por adsorção com praticamente qualquer tipo de célula. A velocidade com que uma droga é liberada de um lipossoma adsorvido depende de vários fatores, entre eles, do tamanho e composição da membrana lipídica, do tipo de droga encapsulada e da natureza da célula (Ostro, 1987a). Depois de adsorvido, o lipossoma pode sofrer um processo de endocitose, sendo englobado pela célula, pode também trocar lipídios com a membrana celular, ou pode ainda fundir-se a ela. Quando ocorre o processo de fusão, a bicamada lipídica do lipossoma integra-se à membrana da célula e o conteúdo aquoso da vesícula é anexado ao fluido celular (Ostro, 1987a).

A administração *in vivo* de lipossomas por via intravenosa apresenta algumas limitações detectadas desde o início do uso destas vesículas em terapias. Após a injeção da suspensão contendo lipossomas por via intravenosa, as vesículas podem se tornar instáveis na presença do soro. O mecanismo responsável pela perda da estabilidade envolve a troca e a transferência dos fosfolipídios presentes nos lipossomas com lipoproteínas de alta densidade presentes no sangue. Outra limitação é a interação dos lipossomas com proteínas como as opsoninas, que são capazes de promover o rápido reconhecimento e remoção das vesículas da corrente sanguínea. Esta remoção é feita por células do sistema fagocitário mononucleado, também conhecido como sistema reticuloendotelial (SRE). Este sistema de defesa, que consiste de macrófagos circulantes e de macrófagos fixos do fígado (células Kupffer), do baço, dos pulmões e da medula óssea, remove material particulado estranho, incluindo os lipossomas, da corrente sanguínea e da linfa, em intervalos de tempo da ordem de minutos. Os lipossomas são removidos da circulação primeiramente pelas células Kupffer e depois, em menor extensão, pelas outras populações de macrófagos

(Woodle et al., 1991).

Embora essas células sejam bastante efetivas na remoção dos lipossomas da circulação, há a possibilidade dos lipossomas entrarem e se acumularem nos espaços extracelulares dos órgãos do SRE, onde podem persistir por dias ou semanas, de maneira a interagir com as células destes órgãos, antes que as células fagocitárias promovam sua endocitose e posterior degradação (Ostro, 1987a).

## **2.7. Lipossomas Estericamente Estabilizados**

As aplicações de lipossomas como sistemas de liberação controlada de drogas na terapia de doenças resultantes da infecção de células do SRE por bactérias ou parasitas são bastante eficientes. Isto acontece porque poucas drogas são capazes de penetrar nestas células, tornando difícil ou impossível o tratamento destas enfermidades pelos métodos convencionais e também porque as células do SRE são alvos naturais dos lipossomas (Ostro, 1987a).

No entanto, quando o alvo é um tecido diferente das células do SRE, a rápida remoção das vesículas da corrente sanguínea pelas células do sistema fagocitário mononucleado consiste em um grande obstáculo para diversas aplicações terapêuticas.

Assim, lipossomas capazes de se evadir do SRE apresentariam duas vantagens importantes. A primeira seria o aumento de seu tempo de circulação no sangue, o que contribuiria para o melhoramento da farmacocinética de liberação lenta da droga na corrente sanguínea, além do aumento das chances de se atingir um tecido específico que não fizesse parte do SRE.

A segunda vantagem destes lipossomas seria a capacidade de poupar o próprio SRE, pois além de sua importância na remoção de partículas estranhas, o

SRE envolve-se em outras funções, incluindo a defesa contra microrganismos patogênicos, parasitas e células de tumores, respondendo também a choques hemorrágicos, endotoxinas, drogas e complexos imunológicos circulantes. Assim, na administração de lipossomas na corrente sanguínea, procura-se evitar o sério comprometimento do SRE (Woodle et al., 1991).

Segundo Lasic et al. (1991), entre o final da década de 70 e o início da década de 80, foi determinado que a estabilidade de lipossomas em fluidos biológicos é bastante aumentada pela utilização de fosfolípidios saturados neutros de cadeia longa e de colesterol na formulação das vesículas, embora ainda não fosse possível a obtenção de grandes tempos de circulação na corrente sanguínea. A adição de colesterol aumenta a estabilidade das vesículas em fluidos fisiológicos como o plasma sanguíneo e altera as características de permeabilidade e fluidez de membranas lipossômicas. Em alguns casos, a adição de colesterol pode resultar na eliminação da transição de fases. Além disto, o equilíbrio do processo de transferência de fosfolípidios de um lado para o outro da dupla camada é alcançado mais rapidamente na presença de colesterol, possivelmente devido ao menor tamanho de sua porção polar, em comparação com a dos fosfolípidios (New, 1990).

Em experimentos *in vivo*, resultados promissores foram obtidos com relação à estabilidade dos lipossomas utilizando-se vesículas neutras pequenas, com membranas rígidas compostas por colesterol e por lípidios com elevadas temperaturas de transição de fase gel-líquido. Formulações de lipossomas contendo distearoil-fosfatidilcolina (DSPC) ou esfingomielina, além de 30 a 50 % molar de colesterol, com diâmetro médio menor que 100 nm, apresentaram tempos de meia vida de circulação ( $t_{1/2}$ ) da ordem de várias horas, em contraste com os valores medidos em minutos para os lipossomas contendo apenas fosfolípidios (Lasic et al., 1991). Esfingomielinas são fosfolípidios neutros com elevada resistência à hidrólise e, devido a sua configuração ser similar à das

lecitinas, embora com menor liberdade de movimento que estas, as membranas contendo esfingomielinas são consideradas mais estáveis e melhor empacotadas, o que resulta na menor permeabilidade a solutos, maior resistência à lise e menor fluidez da membrana (New, 1990).

Além de Lasic et al. (1991), outros pesquisadores também observaram que a capacidade dos lipossomas permanecerem em circulação por tempos prolongados relacionava-se com o diâmetro médio das vesículas utilizadas. Tempos de circulação mais elevados foram obtidos para lipossomas com diâmetros inferiores a 100 nm (Gabizon e Papahadjopoulos, 1988; Allen et al., 1989; Liu et al., 1991).

Nos últimos anos, foi desenvolvida uma nova classe de lipossomas, com valores de  $t_{1/2}$  de até 12 horas após sua administração. Este comportamento foi obtido devido à presença de alguns glicolipídios específicos na membrana dos lipossomas, como os gangliosídios GM1, GD, GT (Allen et al., 1985; Allen e Chonn, 1987; Gabizon e Papahadjopoulos, 1988; Allen et al., 1989; Allen et al., 1991; Liu et al., 1991; Gabizon e Papahadjopoulos, 1992). Os gangliosídios são glicolipídios que contêm ácido siálico em sua composição. Estes compostos foram incorporados aos lipossomas com a finalidade de torná-los similares aos glóbulos vermelhos do sangue, que não sofrem o ataque do sistema imunológico pois também apresentam superfície recoberta por moléculas conjugadas a oligômeros do ácido siálico.

A inclusão de fosfatidilinositol hidrogenado em lipossomas também resulta no aumento de  $t_{1/2}$ , como observado por Gabizon e Papahadjopoulos (1988), embora este efeito tenha-se mostrado mais relevante quando da utilização do gangliosídio GM1.

Tanto os gangliosídios como o fosfatidilinositol conferem à superfície do lipossoma cargas negativas, o que resulta no aumento da hidroflicidade, embora estas cargas estejam protegidas por grupos polares volumosos da própria molécula

de fosfolípido, evitando assim a interação eletrostática dos lipossomas com algumas proteínas do sangue (Gabizon e Papahadjopoulos, 1988). Apesar das vantagens do emprego do gangliosídeo GM1 naturalmente obtido em tecidos cerebrais e nervosos, o seu elevado custo e a dificuldade em sua obtenção, mesmo por via sintética, praticamente inviabilizam sua utilização terapêutica, (Allen et al., 1991).

Com base em observações empíricas, foi feita uma proposta onde foram estabelecidas três condições necessárias para a obtenção de lipossomas com tempos de circulação prolongados (Gabizon e Papahadjopoulos, 1988): (i) superfície com cargas negativas parcialmente protegidas ou ausentes; (ii) dupla camada estruturalmente rígida; e (iii) pequeno tamanho (vesículas com diâmetros inferiores a 100 nm).

A busca de alternativas menos onerosas capazes de igualar ou superar a estabilidade conferida pela presença de gangliosídeos nos lipossomas sugeriu a incorporação de polímeros hidrossolúveis às vesículas fosfolípídicas, uma vez que já havia sido observado anteriormente um decréscimo na imunogenicidade e na antigenicidade de proteínas ligadas covalentemente a poli-oxietilenos.

Recentemente, lipídios sintéticos contendo grupos hidrofílicos volumosos resultantes do acoplamento covalente de cadeias de polietileno glicol (PEG) aos fosfolípídios foram incorporados à classe de materiais capazes de aumentar o tempo de circulação de lipossomas, aumentando sua estabilidade (Klibanov et al., 1990; Blume e Cevc, 1990; Papahadjopoulos et al., 1991; Lasic et al., 1991; Woodle et al., 1992). O efeito estabilizador obtido com a incorporação destes lipídios especiais é ilustrado na Figura 5.

As vesículas estericamente estabilizadas capazes de se evadir do SRE por períodos de tempo relativamente longos foram convenientemente denominadas de “Stealth Liposomes”, com marca registrada pela Liposome Technology Incorporation. O estudo subsequente deste tipo de lipossoma foi tão intenso nos

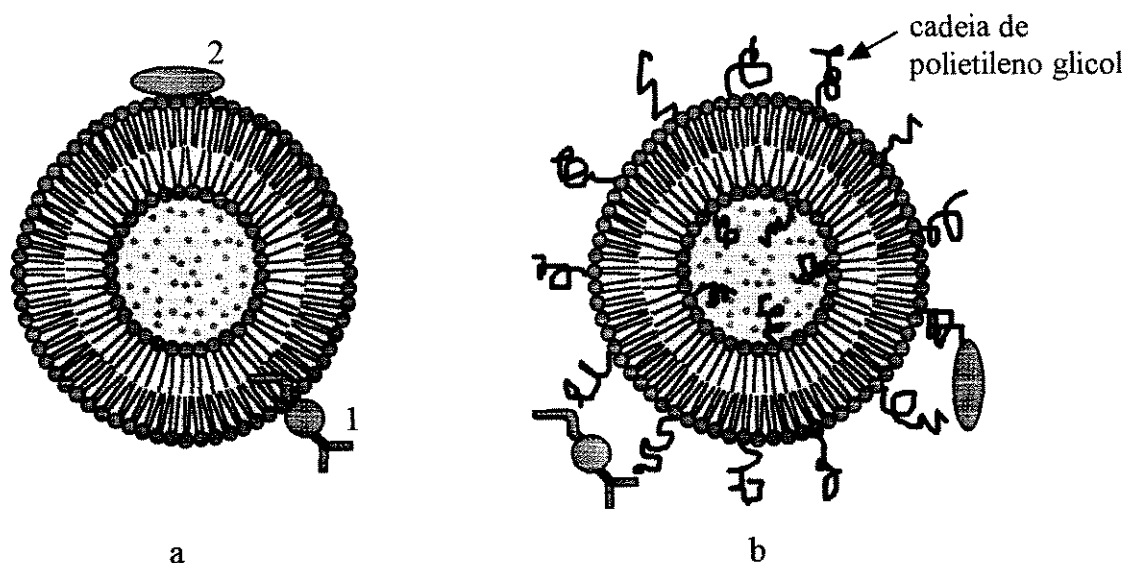


Figura 5 - Comparação entre as estruturas dos lipossomas do tipo convencional (a) e estericamente estabilizado com cadeias de polietileno glicol (b). Ambos diferem na estrutura de suas membranas lipídicas. As lipoproteínas do plasma sanguíneo (1) aderem na superfície dos lipossomas convencionais e os destroem, removendo seus lipídios. As opsoninas (2), moléculas protéicas características do sistema imunológico presentes no soro, podem também aderir na superfície das vesículas convencionais, identificando os lipossomas como partículas estranhas, o que facilita sua ingestão e destruição pelos macrófagos. O lipossoma estericamente estabilizado (“stealth”) é recoberto com longas cadeias de PEG, o que previne a adesão de moléculas protéicas em sua superfície, fazendo com que sejam capazes de passar despercebidos ao SRE por intervalos de tempo mais prolongados (adaptado de Lasic, 1992).



anos seguintes que resultou em um grande número de publicações. Recentemente, foi publicado um livro dedicado apenas ao estudo de lipossomas “stealth” (Lasic e Martin, 1995).

Apesar da quantidade significativa de dados experimentais que mostram o aumento do tempo de circulação no sangue dos lipossomas contendo PEG, o mecanismo que conduz a estes resultados ainda permanece desconhecido. Um modelo qualitativo propõe que a estabilização resulta da concentração superficial de grupos altamente hidratados que inibem estericamente interações eletrostáticas e hidrofóbicas de uma grande variedade de componentes do sangue com a superfície dos lipossomas (Klibanov et al., 1990; Lasic et al., 1991).

Experimentalmente, vários grupos de pesquisa observaram que em condições favoráveis, o acúmulo de lipossomas em tumores ocorre em quantidades elevadas se comparadas às obtidas em tecidos normais (Gabizon e Papahadjopoulos, 1988; Papahadjopoulos et al., 1991; Wu et al., 1993). Embora ainda não se tenha esclarecido o mecanismo exato deste acúmulo supõe-se que o transporte de lipossomas para tecidos cancerosos seria auxiliado pelo sistema vascular responsável pela irrigação do tumor. Em geral, estes vasos desenvolvem-se de maneira muito rápida e em grande quantidade, apresentando diâmetros maiores que os observados em tecidos normais. Uma vez localizados nas imediações do tumor, os lipossomas poderiam então ser internalizados por endocitose, distribuindo-se entre as organelas celulares e o citoplasma (Shelly et al., 1992).

## **2.8. Estabilidade de Lipossomas**

Em aplicações farmacológicas, os lipossomas são utilizados como

reservatórios de moléculas de compostos terapêuticos de interesse. A liberação do composto terapêutico nas células-alvo deveria ocorrer, teoricamente, apenas sob condições pré-estabelecidas, ou seja, no intervalo entre a produção dos lipossomas e a sua utilização, os lipossomas deveriam manter suas propriedades originais. A taxa de liberação indesejável do composto terapêutico depende da composição da bicamada lipídica e da natureza físico-química da droga. Bicamadas no estado gel ou contendo elevadas frações de colesterol tendem a liberar a droga lentamente, enquanto bicamadas no estado líquido são menos estáveis, tendo maior tendência à liberação do composto terapêutico.

Os lipossomas estão sujeitos a diversos processos químicos e físicos de desestabilização que podem afetar a retenção do composto encapsulado na vesícula e a segurança de administração dos lipossomas.

A estabilidade química dos lipossomas pode ser afetada por reações de degradação como a hidrólise das ligações do tipo éster e a peroxidação de cadeias hidrofóbicas insaturadas dos fosfolípidios (Crommelin e Schreier, 1994). Em geral, a ocorrência destas reações de degradação causa alterações na permeabilidade da bicamada lipídica.

Os processos físicos que mais afetam a estabilidade dos lipossomas incluem a liberação indesejável do composto terapêutico associado às vesículas e alterações no tamanho e forma das vesículas por agregação e fusão (Crommelin e Schreier, 1994). A agregação é a formação de estruturas maiores compostas por lipossomas individuais, sendo, em princípio, reversível. A fusão resulta da formação de novas estruturas coloidais, sendo um processo irreversível.

Como já mencionado anteriormente, a integridade dos lipossomas é também afetada por sua interação com moléculas anfifílicas, particularmente quando os mesmos são expostos a fluidos fisiológicos. Diversos tipos de substâncias podem danificar a arquitetura da dupla camada lipídica, e os efeitos da adição de agentes tensoativos em dispersões de lipossomas têm sido bastante

estudados (Sunamoto et al., 1978; Nilsson et al., 1987; Ruiz et al., 1988; Urbaneja et al., 1988; Edwards et al., 1989; Edwards e Almgren, 1990, 1991, 1992).

A adição de um agente tensoativo não afeta apenas o tamanho e a estrutura das vesículas, mas também a sua permeabilidade. Edwards e Almgren (1990), avaliando o efeito dos tensoativos  $C_{12}E_8$  (octaetileno glicol n-dodecil monoéter) e Triton X-100 na permeabilidade de membranas lipídicas observaram que a adição de concentrações muito baixas dos tensoativos já resultam em aumentos significativos na liberação do marcador fluorescente hidrossolúvel 6-carboxifluoresceína encapsulado nas vesículas. Estes autores observaram que, em geral, a taxa de liberação aumenta com a elevação da concentração de tensoativos e, a concentrações muito elevadas, a liberação do marcador é praticamente instantânea.

A partir de dados experimentais, alguns pesquisadores (Nilsson et al., 1987; Edwards et al., 1989; Edwards e Almgren, 1990) puderam estabelecer uma tendência geral para o comportamento de vesículas unilamelares sonicadas pequenas de fosfatidilcolina expostas a concentrações variadas dos tensoativos não-iônicos isolados Triton X-100 e  $C_{12}E_8$ . Esta tendência geral é ilustrada na Figura 6 para o sistema contendo Triton X-100.

As estruturas formadas nas várias faixas de concentração de tensoativo têm sido estudadas principalmente através de técnicas de calorimetria (Alonso et al., 1982; Goñi e Alonso, 1988; Urbaneja et al., 1988), de espectroscopia de espalhamento de luz (Goñi e Alonso, 1988; Nilsson et al., 1987; Urbaneja et al., 1988; Edwards e Almgren, 1990, 1991, 1992), ressonância magnética nuclear (Nilsson et al., 1987), sedimentação (Nilsson et al., 1987), microscopia eletrônica (Alonso et al., 1982; Goñi e Alonso, 1988; Urbaneja et al., 1988; Edwards e Almgren, 1991), além de métodos envolvendo o monitoramento da fluorescência (Nilsson et al., 1987; Urbaneja et al., 1988; Ruiz et al., 1988; Edwards e Almgren, 1990; 1992) ou da absorvância das amostras (Sunamoto et al., 1978; Alonso et al.,

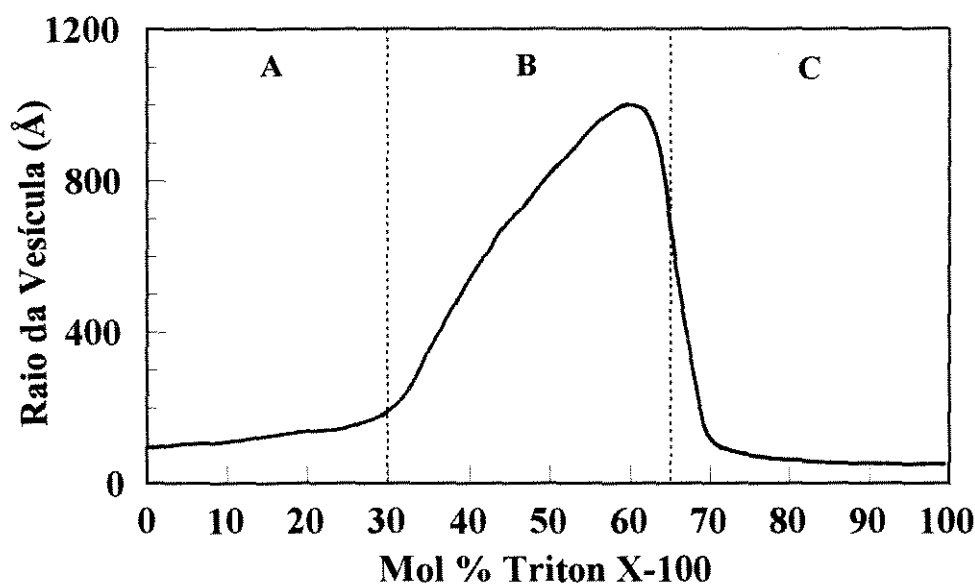


Figura 6 - Comportamento do raio hidrodinâmico (medido por espectroscopia de espalhamento de laser) de vesículas unilamelares sonicadas de lecitina, após a adição do tensoativo não iônico Triton X-100. No primeiro estágio, a baixas concentrações do agente tensoativo, as variações na absorbância ou no diâmetro das vesículas são pequenas, correspondendo somente ao aumento na área superficial devido à incorporação do tensoativo na membrana (região A). A partir de uma dada concentração, ocorre o aparecimento de vazamentos na membrana do lipossoma a uma taxa que aumenta rapidamente com a concentração do tensoativo. Acima de uma concentração crítica, o vazamento é praticamente instantâneo e, simultaneamente ao crescimento acentuado das vesículas, os lipossomas agregam-se em estruturas grandes e uniformes (região B). Aumentos na concentração do agente tensoativo podem conduzir ao rompimento dos lipossomas, levando à coexistência de vesículas e de micelas mistas. A concentrações ainda maiores de tensoativos, as vesículas dissolvem-se completamente em uma mistura de micelas menores (região C). Figura adaptada de Edwards e Almgren, 1990.

1982; Saez et al., 1985; Goñi e Alonso, 1988; Urbaneja et al., 1988; Edwards e Almgren, 1992), tanto em sistemas dinâmicos como em equilíbrio. Os resultados obtidos possibilitaram a proposição de mecanismos para o processo de alteração estrutural observado em vesículas expostas a agentes tensoativos. O crescimento e a fusão de vesículas não são necessariamente sinônimos. Pode haver a fusão de lipossomas inteiros e a difusão de moléculas de lipídios livres de uma vesícula para a outra. Segundo Goñi e Alonso (1988), a característica essencial que faz com que as vesículas sejam susceptíveis à fusão em presença de tensoativos é a meta-estabilidade originada das imperfeições no empacotamento de vesículas sonicadas acima da temperatura de transição de fases, uma vez que apenas as vesículas sonicadas acima desta temperatura fundem-se, nestas condições. As imperfeições no empacotamento, juntamente com a elevada curvatura das bicamadas destas vesículas, originam uma considerável tensão lateral. A absorção do tensoativo pela porção que contém hidrocarbonetos feita pela dupla camada fosfolipídica conduz a um aumento nesta tensão, até o ponto em que o detergente agirá como uma cunha, rompendo a estrutura da vesícula e liberando-a da tensão lateral imposta anteriormente.

Entretanto, estas vesículas abertas são bastante instáveis, pois o contato das cadeias hidrofóbicas com a água é termodinamicamente desfavorável. Assim, diversas vesículas abertas apresentarão uma tendência natural de se agrupar, originando vesículas maiores e livres de tensão. A ruptura mecânica da dupla camada e a liberação do conteúdo da vesícula parecem ocorrer sob condições onde a fusão é iminente.

## **2.9. Aplicação de Lipossomas na Terapia de Tumores Cerebrais Malignos**

Embora as técnicas terapêuticas utilizadas atualmente sejam efetivas no

tratamento de diversos tipos de tumores, levando à sua eventual cura, algumas formas de câncer ainda permanecem incuráveis, como os tumores cerebrais malignos. O Glioblastoma Multiforme é o tipo de tumor primário mais comum que se desenvolve no sistema nervoso central (Westermarck et al., 1990). Como sugerido pela própria terminologia, este tumor é caracterizado pela abundância de morfologias, onde ocorre uma profusão de tipos de células cancerosas.

As formas de tratamento de tumores cerebrais malignos correntemente utilizadas são a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia, a imunoterapia e a combinação seqüencial ou simultânea de duas ou mais destas técnicas. No entanto, devido ao comportamento agressivo desses tumores, o estudo de técnicas alternativas de tratamento tem-se intensificado nos últimos anos.

A terapia de gliomas intracranianos malignos (tumores originados no tecido neuroglial) é em geral pouco eficaz e normalmente envolve elevados riscos de mortalidade. O tempo médio de sobrevivência é de cerca de 14 semanas quando apenas é utilizado tratamento de suporte (Walker et al., 1978). O emprego de remoção cirúrgica e de radiação aparentemente eleva o tempo médio de sobrevivência para 6 meses (Simpson et al., 1993; Walker et al., 1978), enquanto a adição de quimioterapia sistêmica pode aumentar o tempo de sobrevivência para 12 meses (Green et al., 1983). O prognóstico para pacientes com tumores recorrentes também é limitado: sobrevivência média de 9 meses e qualidade de vida aceitável limitada a 10 semanas (Harsh et al., 1987). Apenas cerca de 20 % dos pacientes sobrevive por 2 anos em decorrência do uso de técnicas de tratamento combinadas, sendo que menos de 5 % dos pacientes consegue sobreviver além de 5 anos.

A dificuldade de tratamento de gliomas cerebrais malignos pode ser decorrente de várias causas. A elevada taxa de crescimento das células cancerosas e a invasão de tecidos vizinhos por infiltração são algumas delas. Hoshino (1984) verificou a existência de focos de células malignas afastadas

em até 2 a 3 cm das margens visíveis do tumor.

Um outro fator que dificulta o tratamento de gliomas cerebrais malignos é a proteção naturalmente conferida ao tumor pela barreira sangue-cérebro. Esta barreira sangue-cérebro é formada por uma rede complexa de membranas que dificulta o transporte de substâncias hidrossolúveis, ionizadas ou com peso molecular superior a 200 dáltons às células cancerosas (Grossman, 1991). E, como um grande número de compostos utilizados na quimioterapia destes tumores segue essa descrição, esses agentes não conseguem penetrar no tecido cerebral em condições terapêuticas.

Estes fatores associados implicam em acentuada predisposição para a recorrência dos tumores após o tratamento. Por exemplo, um tratamento quimioterápico que causasse a morte de 99,99 % das células que compõem um tumor reduziria quase que a zero a massa total deste tumor, resultando em sua remissão clínica. No entanto, qualquer uma das células de tumor remanescentes com capacidade de reprodução teria o potencial para causar a reincidência do tumor.

Um método terapêutico ideal consistiria em um procedimento que destruísse células malignas de maneira seletiva não afetando seriamente tecidos normais. A utilização de lipossomas para o transporte e deposição específica de compostos terapêuticos em tumores cerebrais malignos pode ser uma opção promissora.

A aplicação específica de lipossomas com esta finalidade é ainda muito restrita e o número de publicações na área é reduzido. Entre as poucas publicações localizadas, destacam-se os trabalhos de Firth et al. (1984) e McKeran et al. (1985), que descrevem a injeção intracraniana da droga bleomicina encapsulada em lipossomas tanto em ratos como em humanos. Os resultados obtidos indicaram que os sistemas testados foram razoavelmente eficientes, atuando como depósitos da droga nas imediações do tumor. Nestes

estudos, os autores observaram também que o uso de lipossomas não acarretou efeitos colaterais indesejáveis como a toxicidade neurológica.

Como mencionado anteriormente, há diversos tipos de terapias disponíveis para o tratamento de tumores cerebrais. Nos itens que se seguem, duas modalidades promissoras serão descritas. A primeira envolve princípios da radioterapia, enquanto a segunda resulta da combinação simultânea de quimioterapia e imunoterapia.

### 2.9.1. Terapia de Captura de Nêutrons por Boro

O emprego de boro no tratamento de tumores através da Terapia de Captura de Nêutrons por Boro (TCNB) fundamenta-se na propensão de núcleos de átomos de boro-10 para a captura de nêutrons irradiados de baixa energia cinética, com a finalidade de produzir radiação *in situ* letal às células. Experimentos utilizando esta técnica vêm sendo realizados mundialmente em pacientes com câncer de pele ou no cérebro (Dibner, 1993). A reação envolvida nesta terapia é ilustrada na Figura 7.

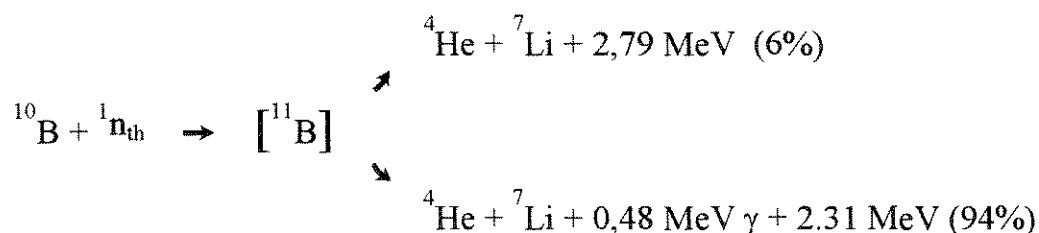


Figura 7 - Reações paralelas de fissão que ocorrem após a captura de um nêutron de baixa energia por um átomo de  ${}^{10}\text{B}$  (adaptado de Hawthorne, 1993).



A reação de captura de nêutrons por  $^{10}\text{B}$  produz partículas energéticas capazes de se deslocar por distâncias equivalentes ao diâmetro de uma célula (10 a 14  $\mu\text{m}$ ). Durante sua passagem no interior da célula, as partículas geradas pela fissão do boro causam dano a materiais orgânicos por processos de ionização, produzindo compostos citotóxicos e destruindo moléculas biologicamente ativas como DNA, RNA e proteínas (Barth et al., 1990).

O boro-10 é um dos poucos elementos adequados à TCNB por não ser radioativo e apresentar uma grande tendência para a captura de nêutrons devido à sua elevada seção transversal de captura, igual a 3.837 barns (1 barn equivale a uma área de  $10^{-24}\text{ cm}^2$ ). Elementos com ocorrência natural em tecidos apresentam seções de captura bem inferiores. O oxigênio, o carbono, o hidrogênio e o nitrogênio exibem seções de captura menor que 0,002 e igual a 0,0037, 0,332 e 1,75, respectivamente (Barth et al., 1990).

Assim, se o  $^{10}\text{B}$  estiver seletivamente acumulado nas células malignas, teoricamente os efeitos letais decorrentes da irradiação com nêutrons ficariam confinados nestas células, não afetando tecidos saudáveis. Por outro lado, como os nêutrons absorvidos pelos núcleos de boro exibem baixa energia (cerca de 0,025 eV), o dano causado por sua irradiação em tecidos normais seria reduzido, se comparado ao obtido por outras formas de radiação como prótons, raios gama e nêutrons acelerados (Barth et al., 1990).

Embora a idéia da TCNB seja antiga (Locher, 1936), apenas recentemente foram descritos casos bem documentados onde o uso desta técnica resultou na cura de tumores cerebrais e na manutenção de boa qualidade de vida dos pacientes após o tratamento (Hatanaka e Nakagawa, 1993; 1994).

Nas décadas de 50 e 60, a aplicação da TCNB não foi bem sucedida e o sucesso das tentativas atuais deve-se principalmente a dois fatores: o aumento da pureza dos nêutrons de baixa energia irradiados e o uso de compostos com

uma certa tendência de acúmulo em células cancerosas. Ambos os fatores reduzem os danos às células cerebrais sadias.

O estudo de compostos contendo boro que apresentem uma certa afinidade para o acúmulo seletivo em tumores foi intensificado nos últimos anos. Entre os diversos compostos testados em animais, alguns apresentaram propriedades favoráveis como a [ $^{10}\text{B}$ ]Boronofenilalanina (BPA), indicada para o tratamento de melanomas (uma forma pigmentada de câncer de pele). O fato de que as células malignas apresentam uma elevada taxa de síntese de proteínas e de outros metabólitos a partir de aminoácidos, e de que estes compostos são transportados ativamente e acumulados no interior das células tem encorajado o estudo de  $\alpha$ -aminoácidos contendo boro para a TCNB, incluindo dentre eles a BPA. Esse composto, cuja estrutura é mostrada na Figura 8, é um análogo do aminoácido fenilalanina.

Diversos investigadores observaram o acúmulo significativo de BPA em melanomas (Matalka et al., 1993), gliomas (Matalka et al., 1994) e gliossarcomas (Coderre et al., 1990) intracerebrais desenvolvidos em ratos. Além destes resultados, a BPA revelou-se como atóxica em estudos envolvendo animais (Coderre et al., 1990; Saris et al., 1992). Esse composto foi utilizado com sucesso no tratamento de pacientes com melanomas, resultando em bom controle local dos tumores e em reações toleráveis na pele (Fukuda et al., 1994).

Uma outra classe de compostos promissores no uso da TCNB são os aminoácidos contendo carboranos. Os compostos desta categoria, além de apresentar vários átomos de boro por molécula, têm um caráter lipofílico que permite sua fácil penetração na membrana celular, sendo também mais resistentes à degradação metabólica (Barth et al., 1992). Embora a síntese de alguns destes carboranos já tenha sido descrita na literatura, a avaliação de sua capacidade de absorção seletiva por células malignas tem sido pouco estudada.

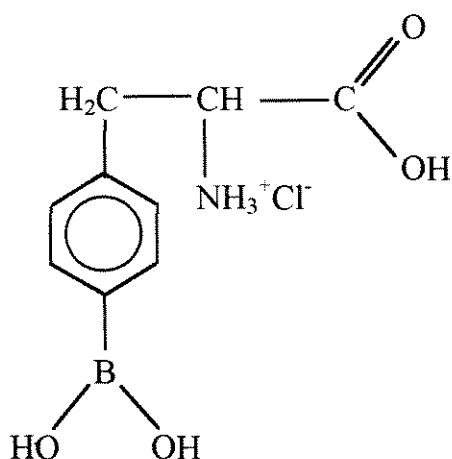


Figura 8 - Estrutura química da BPA HCl.

Em 1993, Hawthorne mencionou a síntese de compostos destinados a atuar como blocos construtores de substâncias desta categoria. Um destes compostos, denominado carboranilpropilamina (CPA), apresenta a estrutura ilustrada na Figura 9. Este composto poderia ser convertido à amida correspondente por reação com o 5-carboxi-2-tiouracila. O composto resultante, por sua vez, poderia ser natural e seletivamente incorporado em melanomas durante a biossíntese de melanina. Ainda não há evidências na literatura da eficácia deste derivativo tiouracila na TCNB. O uso da CPA por si só seria bastante atraente se este composto se acumulasse especificamente em células de tumor, representando no mínimo uma etapa a menos na síntese do agente de captura.

Outros compostos em uso clínico ou ainda em investigação são aminoácidos, fosfolipídios, promazinas e porfirinas contendo carboranos, além de nucleosídeos, lipoproteínas, peptídeos e anticorpos aos quais foram

conjugados átomos de boro. Revisões detalhadas destes e de outros compostos utilizados na TCNB foram publicadas por Barth et al., 1990; 1992 e Hawthorne, 1993.

Como mencionado anteriormente, para que a TCNB seja efetiva o acúmulo de átomos de boro deve ocorrer em maior extensão nos tumores que no sangue ou em tecidos saudáveis, para que não haja danos desnecessários após a irradiação com nêutrons. Uma estratégia que pode elevar sensivelmente a liberação seletiva de compostos contendo boro em tumores é o uso de lipossomas.

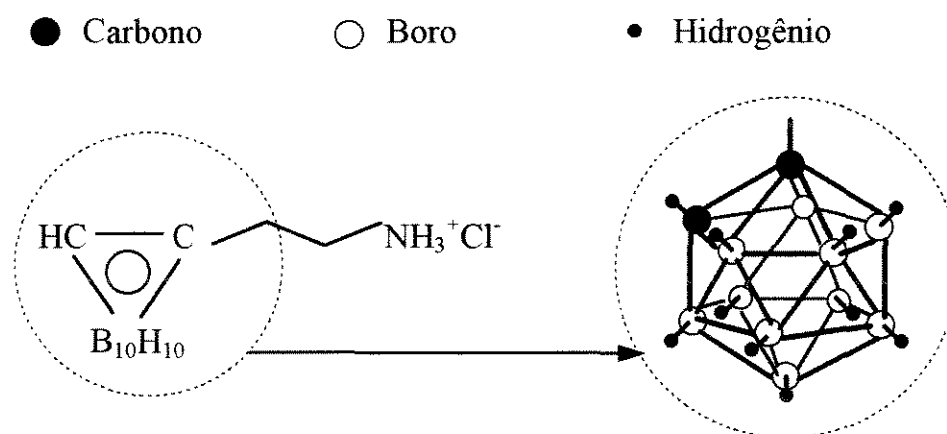


Figura 9 - Estrutura química da CPA HCl.

Diversos grupos de pesquisadores testaram com sucesso o uso de lipossomas para o transporte seletivo de compostos contendo boro para tumores. Yanagië et al. (1991) observaram que lipossomas multilamelares conjugados a moléculas de anticorpos e encapsulando passivamente C<sub>2</sub>B<sub>12</sub>H<sub>11</sub>SH ligaram-se seletivamente às células-alvo de carcinoma

pancreático *in vitro*. Embora os resultados destes autores sejam promissores, tais lipossomas provavelmente não seriam tão efetivos em aplicações *in vivo*, uma vez que vesículas multilamelares são, em geral, rapidamente removidas da corrente sanguínea pelas células do sistema reticuloendotelial.

Os sais hidrofílicos  $\text{NaB}_{10}\text{H}_{10}$ ,  $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$ ,  $\text{Na}_4\text{B}_{20}\text{H}_{17}\text{OH}$ ,  $\text{Na}_3\text{B}_{20}\text{H}_{19}$ ,  $\text{Na}_2\text{B}_{20}\text{H}_{18}$  e seu fotoisômero foram também passivamente encapsulados em lipossomas (Shelly et al., 1992). Os resultados deste estudo indicaram que alguns dos sistemas utilizados foram capazes de transportar seletivamente os ânions utilizados para células de adenocarcinomas do tipo EMT6 implantadas no flanco direito de ratos, em concentrações elevadas o suficiente para atingir doses terapêuticas.

Outros compostos de boro eficazmente encapsulados no cerne aquoso de lipossomas por incorporação passiva são o  $\text{NaB}_{10}\text{H}_9\text{NH}_3$  e os isômeros de  $\text{Na}_3\text{B}_{20}\text{H}_{17}\text{NH}_3$  (Feakes et al., 1994). Nesse estudo, tanto lipossomas “stealth” (contendo 5 % de PEG), como convencionais foram utilizados em experimentos de biodistribuição, resultando em um acúmulo apreciável de boro em tumores quando da utilização dos isômeros de  $\text{Na}_3\text{B}_{20}\text{H}_{17}\text{NH}_3$ . Em um outro estudo, Feakes et al. (1995) demonstraram que o transporte efetivo de boro para tumores pode ser significativamente melhorado pela incorporação simultânea do composto lipofílico  $\text{K}[\text{nido-7-CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{-C}_2\text{B}_9\text{H}_{11}]$  na membrana de lipossomas, de maneira isolada ou em conjunto com o composto hidrofílico  $\text{Na}_3[1\text{-(2'-B}_{10}\text{H}_9)\text{-2-NH}_3\text{B}_{10}\text{H}_9]$  passivamente encapsulado no cerne aquoso das vesículas.

Embora a maioria destes trabalhos mencione vários aspectos da biodistribuição dos lipossomas contendo compostos de boro quando injetados em animais, nenhum deles avalia o uso de lipossomas especificamente na terapia de tumores cerebrais. Outros aspectos pouco estudados são a citotoxicidade dos compostos empregados e a otimização do encapsulamento

dos compostos utilizados nos lipossomas.

### 2.9.2. Terapia com Imunolipossomas Contendo Doxorrubicina Encapsulada

Uma droga muito utilizada na terapia de tumores malignos é a doxorrubicina, um antibiótico do tipo antraciclina. Embora o seu mecanismo de ação não tenha sido ainda completamente elucidado, presume-se que a doxorrubicina liga-se aos ácidos nucleicos por intercalação específica dos grupos planares de antraciclina com a dupla hélice do DNA, inibindo a síntese de ácidos nucleicos.

A estrutura química da doxorrubicina pode ser visualizada na Figura 10. O anel da antraciclina é lipofílico, mas a extremidade saturada do sistema anelar é abundante em grupos hidroxila adjacentes ao açúcar amínico, o que confere uma região hidrofílica à molécula (Physicians' Desk Reference, 1993).

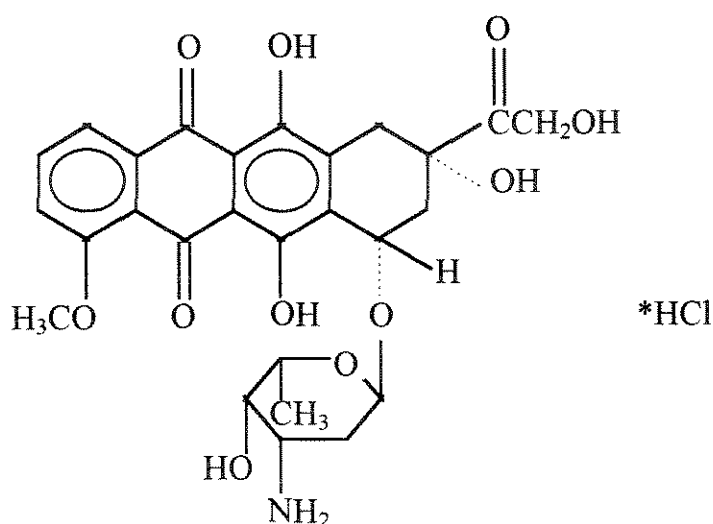


Figura 10 - Estrutura química da DOX HCl.

Embora seja muito efetiva contra vários tipos de tumores, a administração intravenosa desta droga é associada a diversos efeitos colaterais. As reações adversas mais sérias são toxicidade cardíaca irreversível e supressão imunológica severa decorrente da diminuição do número de leucócitos. Estes efeitos colaterais podem ser, ao menos parcialmente, contornados pela encapsulação da droga em lipossomas. E, sendo uma amina lipofílica, a doxorubicina pode ser facilmente encapsulada em lipossomas por incorporação ativa.

Esta possibilidade já foi explorada por um grande número de pesquisadores. Numerosos estudos são citados na literatura envolvendo a encapsulação ativa de doxorubicina em lipossomas com composições e características variadas (Mayer et al., 1986; Madden et al., 1990; Mayer et al., 1990; Ahmad e Allen, 1992; Horowitz et al., 1992; Ahmad et al., 1993; Mayer et al., 1993; Ohta et al., 1993, entre outros).

Os resultados de inúmeros testes *in vitro* e *in vivo* mostraram o ótimo potencial destes sistemas na terapia de diversos tipos de tumores e atualmente, estudos pré-clínicos e farmacocinéticos estão sendo realizados em humanos utilizando uma formulação denominada DOX-SL, que consta basicamente de doxorubicina encapsulada em lipossomas estericamente estabilizados por cadeias de polietileno glicol suspensos em uma solução de sacarose a 10 %. Os resultados de vários destes experimentos com humanos estão descritos no livro publicado por Lasic e Martin (1995) e a maioria dos testes indica que a administração de DOX-SL resulta comprovadamente em maior atividade terapêutica que quando se utiliza a droga em sua forma livre, possibilitando também uma melhor qualidade de vida ao paciente.

Embora os lipossomas “stealth” tenham em geral uma maior tendência de acúmulo em tumores que lipossomas convencionais quando injetados por via intra-venosa (Gabizon e Papahadjopoulos, 1988; Wu et al., 1993),

lipossomas convencionais poderiam ser utilizados para a administração intracraniana de doxorubicina. Esta rota terapêutica protegeria os lipossomas de sua eventual remoção pelo sistema reticuloendotelial de defesa, levando a um conseqüente acúmulo do composto encapsulado em tumores cerebrais.

Maior especificidade no acúmulo de doxorubicina em tumores cerebrais poderia ser obtida pela ligação de moléculas que interagem especificamente com as células de tumores à superfície de lipossomas, tais como anticorpos. Moléculas como as imunoglobulinas são bastante utilizadas para este fim, devido à relativa facilidade com que as mesmas podem ser preparadas de forma a apresentar elevada especificidade e afinidade contra células previamente estabelecidas (Wright e Huang, 1989). Neste caso, a interação da célula-alvo com os imunolipossomas (lipossomas contendo moléculas de anticorpos acopladas à sua superfície) seria mediada pelo determinante antigênico correspondente presente na célula. Assim, a droga sofreria deposição seletiva no tecido após interagir com a célula segundo os mecanismos descritos anteriormente.

Allen et al. (1995) sugerem que a obtenção de imunolipossomas contendo drogas deve seguir algumas prerrogativas básicas, como o uso de um método de acoplamento rápido, simples e de alta eficiência que resulte em densidade de anticorpos ótima na superfície do lipossoma, sem perturbar as características de incorporação e liberação da droga. Outras propriedades ideais seriam a retenção de elevados tempos de circulação na corrente sanguínea e da capacidade de reconhecimento das células-alvo *in vitro* e *in vivo*, a possibilidade de uso de compostos compatíveis com o uso em seres humanos e, finalmente, a eficácia *in vivo*.

O acoplamento de anticorpos em lipossomas pode ser obtido pelo uso de diversos métodos (Wright e Huang, 1989; New, 1990; Allen et al., 1995). Normalmente, os grupos funcionais envolvidos na ligação são aminas,



hidroxilas, carboxilas ou sulfidrilas.

Uma das técnicas que apresenta maior eficiência de acoplamento é a ligação via grupos maleimida. Neste caso, grupos sulfidrilas presentes no anticorpo reagem com grupos maleimida ligados a moléculas de lipídio artificialmente modificadas e incorporadas em lipossomas a baixas concentrações. Anticorpos que não apresentam grupos sulfidrilas reativos em quantidade suficiente para a reação com os lipossomas podem ser quimicamente modificados, vindo então a incorporá-los (Carlsson et al., 1978). Proteínas contendo pontes dissulfeto podem ser reduzidas com mercaptoetanol, ditioneitol ou cisteína, de forma a originar resíduos tiol disponíveis para a ligação com os lipossomas. O uso de resíduos tiol endógenos é ideal para a ligação de fragmentos Fab e de imunoglobulinas do tipo IgM a lipossomas contendo grupos maleimida.

Martin e Papahadjopoulos (1982), utilizando esta técnica, observaram que o acoplamento covalente de fragmentos de Fab a lipossomas contendo maleimida pode resultar em razões de acoplamento maiores que 250  $\mu\text{g}$  de Fab por  $\mu\text{mol}$  de lipídio. Os mesmos autores comprovaram que o uso dos imunolipossomas com concentrações de lipídio menores que 65 nmol resultaram em interação quase que total com as células-alvo. Acima desta concentração de lipídios, um patamar foi atingido. Pelo uso da mesma técnica de acoplamento de anticorpos a lipossomas, Hashimoto et al. (1983) observaram que lipossomas covalentemente ligados a subunidades monoméricas de IgM monoclonal específica contra tumor mamário de camundongo ligaram-se seletivamente a seu alvo.

Um outro método útil no acoplamento de anticorpos a lipossomas é a técnica do periodato. Este método consta da oxidação dos grupos hidroxila dos anticorpos a aldeído em condições brandas pelo uso de periodato de sódio. Após a oxidação, os anticorpos ativados são colocados em contato com os

lipossomas contendo lipídios que apresentam grupamentos amina reativos, como por exemplo, dimiristoil-fosfatidiletanolamina. Esta técnica foi utilizada com sucesso por Jones et al. (1993) para a ligação de moléculas de peroxidase de raiz-forte (“horseradish peroxidase”, HRP) a lipossomas modificados com biotina, resultando no acoplamento de 100 a 200 moléculas de HRP por lipossoma sem que houvesse perda excessiva da atividade da enzima. A mesma metodologia foi utilizada por Singh et al. (1995) para a obtenção de lipossomas bifuncionais acoplando covalente e simultaneamente a enzima HRP e o anticorpo anti D-dímero. Como no trabalho anterior, em torno de 100 a 200 moléculas de HRP foram ligadas por vesícula, além de 7 a 12 moléculas do anticorpo. E, também neste caso as propriedades originais das proteínas não foram extensivamente afetadas após o acoplamento. Os autores observaram uma perda de 20 a 30 % da atividade da HRP imobilizada em lipossomas em relação à da proteína livre e a manutenção da especificidade do anticorpo acoplado.

Após o acoplamento dos anticorpos adequados e a incorporação da droga em condições otimizadas, a etapa seguinte do estudo desta modalidade terapêutica consistiria da realização de testes *in vitro* e *in vivo* utilizando os imunolipossomas obtidos. Estes testes são muito comuns na seleção e identificação de novos agentes terapêuticos anti-câncer para avaliação pré-clínica, geralmente envolvendo um grande número de experimentos com linhagens estabelecidas e caracterizadas de células e com animais criados especialmente com esta finalidade.

A citotoxicidade é um evento complexo *in vivo*, podendo se manifestar através de diversos efeitos, desde a simples morte celular, como observado no teste de agentes anti-câncer onde tanto células malignas como normais podem ser afetadas, até complexas alterações metabólicas. Outros efeitos geralmente notados são as reações inflamatórias e alérgicas que, se muito intensas, podem

inviabilizar a administração *in vivo* do composto terapêutico em estudo.

Os testes *in vitro* podem ser interpretados em termos da resposta *in vivo* desde que se leve em consideração as diferenças existentes nos dois sistemas. Seria muito difícil recriar *in vitro* a farmacocinética complexa da exposição das células à droga, onde haveriam diferenças significativas na distribuição espacial das células, no tempo de exposição à droga, na sua concentração local e na variação da concentração da droga com o tempo. Outras diferenças comumente observadas *in vivo* são o metabolismo, a penetração nos tecidos e a excreção da droga.

No entanto, não necessariamente um sistema com desempenho *in vitro* insatisfatório resultaria em efeitos também insatisfatórios *in vivo*. Embora seja possível simular vários parâmetros associados ao desenvolvimento celular *in vivo*, a maior parte dos estudos *in vitro* se concentra em respostas celulares diretas, onde se avalia a toxicidade por variações na concentração de células ou no seu metabolismo. Este procedimento resulta em maior simplicidade e reprodutibilidade dos ensaios *in vitro*, associado a um menor custo.

## CAPÍTULO III

# MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais, equipamentos e a metodologia experimental utilizada no desenvolvimento deste trabalho.

### 3.1. Materiais

*Lipídios:* Colesterol (Col), dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), distearoil-fosfatidilcolina (DSPC), e dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) foram obtidos da Sigma Chemical Company. 1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N[poli(etileno glicol) 2.000] (DMPE-PEG), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[4-(p-maleimido fenil) butirato] (MPB-PE), ácido dimiristoil-fosfatídico (DMPA) e dimiristoil-fosfatidiletanolamina-N-caproilamina (DMPE-CAP) foram obtidos da Avanti Polar Lipids Inc. Sal de triamônio N-5-(fluoresceínatiocarbamoil)-1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (DPPE-FITC) foi obtido da Molecular Probes Inc.

*Agentes terapêuticos:* Os compostos contendo boro, L-p-boronofenilalanina HCl (BPA) e o-carboranilpropilamina HCl (CPA) foram generosamente doados pela Boron Biologicals, Inc. (Raleigh, NC, EUA) e utilizados sem purificação posterior. Hidroclorato de doxorubicina (DOX) foi obtido da Chiron Therapeutics. Sulfato de bleomicina, na forma de Blenoxane,

foi obtido da Mead Johnson Oncology Products.

*Anticorpos:* IgM humana (IgM-C, anticorpo controle), na forma de plasma, foi uma doação do Dr. Malcolm R. Mackenzie, do Department of Internal Medicine da University of California (Davis, CA, EUA). O anticorpo específico contra as células SK-MG-1 (IgM-H11) foi doado pela Novopharm Biotech. A proteína purificada de mieloma de camundongo (IgG2a, tipo  $\kappa$ ) foi obtida da Cappel-Organon Teknika Corporation. IgG caprina (IgG-C) foi obtida da Sigma ImmunoChemical.

*Células:* Glioblastoma Multiforme linhagem SK-MG-1 (descrita por Cairncross et al., 1982), doada pela Novopharm Biotech e linfócitos humanos extraídos do sangue de dois doadores.

*Meio de cultura para células SK-MG-1:* DMEM-F12 suplementado com 365 mg/ml de glutamina, 15 mM de HEPES, 1,6 % de solução aquosa a 7,5 % de bicarbonato de sódio, 100 unidades/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina (obtidos do Lineberger Cancer Research Center) e 10 % de soro de feto bovino (SFB) obtido da Irvine Scientific.

*Indicador de metabolismo celular:* Reagente Alamar Blue, obtido da Alamar Biosciences, Inc.

*Outros materiais:* A água utilizada em todos os experimentos foi purificada por osmose reversa através do sistema ROpure ST, da Barnstead, seguida por deionização no equipamento NANOpure, da Barnstead, apresentando resistividade em torno de 18,3 Mohm/cm. Todos os reagentes listados a seguir apresentaram, no mínimo, qualidade analítica certificada. Ácido cítrico, Triton

X-100, curcumina, ácido acético glacial,  $\beta$ -D(-)frutose, molibdato de amônio e os géis Sepharose CL-6B e Sephacryl S-300 foram obtidos da Sigma Chemical Company. Clorofórmio, metanol, ácido ascórbico, cloreto de sódio, ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS), ácido clorídrico, hidróxido de sódio, bicarbonato de sódio, peróxido de hidrogênio (30%), ácido sulfúrico concentrado, etanol desnaturado (reagent alcohol) e 1-octanol foram obtidos da Fisher Scientific. Permanganato de potássio, N-[2-hidroxietyl]piperazina-N'-[2-ácido etanossulfônico] (HEPES), ácido bórico e 2-etil-1,3hexanodiol foram obtidos da Aldrich Chemical Company, Inc. Ácido sulfúrico 10 N e solução padronizada de fosfato inorgânico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) a 0,5 mg  $\text{PO}_4/\text{ml}$  foram obtidos da Mallinckrodt Inc. Pentaetilenoglicol n-dodecil monoéter ( $\text{C}_{12}\text{E}_5$ ) foi obtido da Nikko Chemicals Company. Os coquetéis de cintilação CytoScint e Universol foram obtidos da ICN Biomedicals Inc. O hidrocloreto de [ $^{14}\text{C}$ ]-metilamina foi obtido da Du Pont NEN Products. Formaldeído radioativo ( $^{14}\text{C}$ ) obtido da Amersham Corporation. L-cisteína, EDTA e hidrocloreto de TRIS foram obtidos da Sigma Chemical Company. Solução salina balanceada de Hank (SSBH) foi obtida do Lineberger Cancer Research Center. Solução a 0,05 % de tripsina suína diluída em SSBH suplementada com 0,02 % de EDTA-4Na foi obtida da JRH Biosciences.

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Preparação dos Lipossomas**

Vesículas unilamelares pequenas e grandes com composição DSPC/Col (em razões molares percentuais de 60:40), DSPC/DMPE/Col (40:20:40

mol %), DSPC/DMPE/Col/DMPE-PEG (40:14:40:6 mol %), DSPC/DMPE/Col/DMPE-PEG (40:8:40:12 mol %), DSPC/DMPE/Col/DMPA (40:15:40:5 mol %), DSPC/DMPE/Col/DMPE-CAP (40:15:40:5 mol %), DSPC/Col/DMPE-CAP/DPPE-FITC (40:40:5:15 mol %) e DPPC/Col/MPB-PE (56,3:42,7:1 mol %) foram preparadas utilizando-se duas técnicas diferentes: sonicação e extrusão.

O preparo de lipossomas por extrusão (a partir de modificações nos métodos sugeridos por Madden et al., 1990; Mayer et al., 1990 e MacDonald et al., 1991) objetivou o estudo da encapsulação dos compostos de boro em vesículas apresentando diâmetros maiores (em torno de 100 nm) que as obtidas por sonicação (cerca de 60 a 70 nm), baseadas na técnica de Szoka e Papahadjopoulos (1980). Estes procedimentos foram selecionados por serem relativamente simples, permitindo que se obtivesse lipossomas com características farmacológicas adequadas, minimizando a contaminação por solventes orgânicos e não se utilizando detergentes durante a preparação.

Para a preparação das vesículas, normalmente a uma concentração final total em lipídios entre 5 e 10 mM, os lipídios foram pesados e transferidos para um frasco de fundo redondo com capacidade de 50 ml. Os mesmos foram dissolvidos e homogeneizados adicionando-se uma solução contendo clorofórmio/metanol (9:1 v/v), a qual foi evaporada em evaporador rotatório até a obtenção de um filme lipídico seco depositado na parede interna do frasco. O filme lipídico foi então hidratado em uma solução tampão contendo 300 mM de ácido cítrico a pH 4,00 (tampão A) por 15 minutos a 65°C. Após a hidratação, a suspensão contendo vesículas multilamelares foi congelada (a -37°C) e descongelada (a 80°C) por cinco vezes, para melhorar a distribuição de solutos e aumentar o volume de encapsulamento, com base no procedimento de Mayer et al. (1985).

Para a obtenção de vesículas pequenas, a suspensão de lipossomas

multilamelares foi então sonicada a 80°C por 2,5 horas a 60 % de potência, utilizando um sonicador com ponta recoberta com safira (Heat Systems Ultrasonics W385, modelo XL2020, Farmingdale, NY, EUA). Após o resfriamento até temperatura ambiente, os lipídios não dispersos foram removidos por centrifugação a 4.200 g por 20 minutos em uma centrífuga de rotor fixo modelo Centra 4, da International Equipment Company.

Para a preparação de lipossomas com maiores diâmetros, a suspensão de vesículas multilamelares foi inicialmente sonicada por 10 minutos em um sonicador de bancada modelo 3200 fabricado pela Branson Ultrasonics Corporation. A seguir, as vesículas foram transformadas em unilamelares por extrusão da amostra por 31 vezes consecutivas através de duas membranas filtrantes de policarbonato (tipo Nuclepore, Costar) com tamanho de poro igual a 100 nm. Durante a extrusão, utilizou-se o extrusor de lipossomas LiposoFast (obtido da Avestin Inc., Ottawa, Canadá) acoplado a seringas de vidro do tipo gastight # 1750 (obtidas da Hamilton Co.) com capacidade de 500 µl (operação manual) ou conectado a uma bomba peristáltica de HPLC série 10, da Perkin-Elmer (operação automatizada, com recirculação da suspensão de lipídios, à temperatura ambiente e vazão entre 2 a 3 ml/min).

Após o preparo, ambos os tipos de lipossomas foram estocados em geladeira a 5°C.

### *3.2.2. Geração de Gradientes de pH nos Lipossomas*

O pH externo das vesículas foi modificado através da passagem dos lipossomas (originalmente suspensos na solução tampão A, a pH 4,00) por uma coluna cromatográfica de dessalinização (tipo Econo-Pac 10DG, pré-empacotada com Bio-Gel P-6 e volume de leito igual a 10 ml, obtida da BioRad), previamente equilibrada com solução tampão a pH 7,5 (solução



tampão I, contendo 20 mM HEPES e 150 mM NaCl), no caso do encapsulamento de compostos contendo boro, ou com solução tampão a pH 7,4 (solução tampão II, contendo 10 mM HEPES e 120 mM NaCl), no caso da incorporação de DOX. No caso do encapsulamento dos compostos de boro, maior salinidade e maior poder tamponante foram necessários para evitar a liberação espontânea do material encapsulado.

As mesmas soluções tampão correspondentes foram utilizadas para a eluição dos lipossomas. Com este procedimento, estabeleceu-se gradientes de pH nos lipossomas de aproximadamente 3,5 e 3,4 unidades, respectivamente.

As soluções tamponantes descritas foram selecionadas por apresentar baixa toxicidade em células cultivadas *in vitro*.

### 3.2.3. Encapsulamento dos Compostos Terapêuticos

A incorporação dos compostos terapêuticos em lipossomas foi realizada ativa ou passivamente.

Para o encapsulamento ativo, a suspensão de lipossomas apresentando gradientes de pH foi convenientemente diluída e misturada com soluções contendo o composto terapêutico que se desejava testar solubilizado na mesma solução tampão empregada para suspender os lipossomas (pH igual a 7,5 ou 7,4). As misturas lipossoma/composto terapêutico foram incubadas a diversas temperaturas e por diferentes intervalos de tempo, de acordo com o tipo de composto envolvido no teste.

Ensaio para o estudo do efeito da variação da razão molar inicial composto terapêutico/lipídio na razão molar final composto terapêutico/lipídio foram também realizados, após o estabelecimento das condições de incubação mais adequadas. As incubações foram conduzidas em frascos de fundo redondo agitados a 200 rpm em um evaporador rotatório (com vácuo

desconectado). Este método foi usado para o encapsulamento da CPA, da BPA e da DOX.

A incorporação passiva foi utilizada apenas para o encapsulamento de compostos contendo boro, sendo realizada durante a preparação dos lipossomas multilamelares. Nesse caso, a encapsulação foi feita utilizando-se uma solução (ou suspensão) do composto para hidratar o filme lipídico (também conduzida por 15 minutos a 65°C). A CPA foi solubilizada em 10 mM HEPES, pH 7,40. A BPA foi suspensa em solução contendo 10 mM de HEPES a pH 7,40 ou 50 mM de frutose, a pH 9,0. As vesículas multilamelares obtidas foram transformadas em unilamelares pelos métodos descritos anteriormente

Em todas as situações estudadas, após a incubação, o composto terapêutico não encapsulado foi removido por cromatografia de filtração em gel, passando-se a mistura lipossoma/composto terapêutico através das colunas de dessalinização tipo Econo-Pac 10DG. Utilizou-se como eluentes as mesmas soluções tamponantes empregadas na etapa de incubação. O eluato foi convenientemente recolhido em frações com volume de cerca de 1,3 ml, com o auxílio de um coletor automático modelo 203 fabricado pela Gilson. Ressalta-se que as colunas de dessalinização foram pré-saturadas com vesículas livres dos compostos terapêuticos, porém com a mesma composição em lipídios que as empregadas no experimento, antes da passagem da amostra real. Esta etapa foi necessária para se evitar a perda de lipídios por adsorção na coluna.

#### *3.2.4. Purificação do Anticorpo Controle IgM-C*

O anticorpo controle foi obtido do plasma de um paciente com macroglobulinemia de Waldenstrom (esta doença provoca um aumento na concentração de IgM no sangue). A separação da IgM do plasma, na forma de

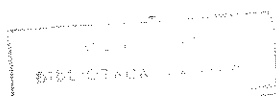
pentâmeros, foi obtida por precipitação lenta com sulfato de amônio saturado. Após centrifugação por 10 minutos a 2.500 rpm em uma centrífuga de rotor fixo Centra-4, o sobrenadante foi descartado e a proteína precipitada foi ressuspensa em solução aquosa de NaCl a 0,9 % (m/v). O processo de precipitação/centrifugação foi repetido por duas vezes mais e o material precipitado foi dialisado contra 0,9 % NaCl por 36 horas, utilizando-se uma membrana do tipo Spectra/Por 4, com peso molecular de corte de 12.000 a 14.000 dáltons (Spectrum Medical Industries, Inc., Los Angeles, CA).

Alíquotas do material dialisado (1 a 3 ml) foram passadas por uma coluna de 75 cm x 1,5 cm de Sephacryl S-300 equilibrada com 0,9 % NaCl. As frações eluídas tiveram suas absorvâncias monitoradas a 280 nm. A composição final das frações combinadas contendo IgM foi determinada por nefelometria no laboratório de análises clínicas no hospital da Universidade da Carolina do Norte, Chapel Hill, NC, EUA, resultando em amostras com cerca de 94 % em IgM.

### 3.2.5. Determinação da Concentração de Anticorpos por Marcação com $^{14}\text{C}$

Para possibilitar a detecção quantitativa dos anticorpos efetivamente ligados a lipossomas, foram introduzidos átomos de  $^{14}\text{C}$  nas proteínas utilizando-se uma técnica de metilação redutiva similar à descrita por Jentoft e Dearborn (1983). A mesma técnica foi utilizada para todos os tipos de anticorpos.

Inicialmente, diluiu-se 6,3 mg de  $\text{NaCNBH}_3$  em 1 ml de solução tampão II. A seguir, misturou-se de 50 a 70  $\mu\text{l}$  da solução resultante com 1 mg de anticorpo em solução aquosa e adicionou-se de 2 a 10  $\mu\text{Ci}$  de formaldeído radioativo ( $^{14}\text{C}$ ) à mistura (quantidades reduzidas, de no máximo 5  $\mu\text{Ci}$ , foram empregadas quando da utilização dos anticorpos em testes *in vitro*, para



provocar a mínima alteração possível na composição e estrutura original da proteína). Após a adição do formaldeído, a amostra foi agitada a 150 rpm por 2 horas à 25°C. Após a reação, as moléculas de anticorpo foram separadas dos reagentes por cromatografia de filtração em gel em uma coluna de dessalinização do tipo Econo-Pac 10DG, usando-se como eluente uma solução de TRIS a 0,2 M e pH 8,6. A radioatividade específica dos anticorpos reagidos foi determinada pelo número de desintegrações por minuto (dpm) detectado em 10 µl de amostra diluída em 10 ml do coquetel de cintilação CytoScint. A análise foi feita por 20 minutos em um analisador de cintilação de líquidos modelo Tri-Carb 1500 (Packard Instrument Co.).

A partir da radioatividade específica do formaldeído utilizado (igual a 17,7 mCi/mmol, fornecida pelo fabricante) e da relação entre dpm e mCi ( $1 \text{ mCi} = 2,22 \cdot 10^9 \text{ dpm}$ ), calculou-se o número de átomos de  $^{14}\text{C}$  ligados por molécula de anticorpo, utilizando-se os respectivos coeficientes de extinção a 280 nm para cada uma das proteínas (anticorpos do tipo IgG = 1,4 L/g\*cm; IgM-C = 1,07 L/g\*cm; IgM-H11 = 1,17 L/g\*cm) e seus pesos moleculares aproximados (150.000 dáltons para as proteínas do tipo IgG e 900.000 dáltons para os pentâmeros de IgM). Com o procedimento descrito, de 6 a 14 átomos de  $^{14}\text{C}$  foram ligados por molécula de IgG ou por monômero de IgM.

### ***3.2.6. Acoplamento de Anticorpos do Tipo IgG a Lipossomas***

O método utilizado para a ligação de anticorpos a lipossomas envolve o acoplamento dos grupos hidroxila do anticorpo aos grupamentos amínicos de lipídios presentes nos lipossomas. Esse procedimento é baseado nos métodos descritos por Heath et al. (1980) e Singh et al. (1995). A Figura 11 ilustra as etapas do acoplamento, que são descritas como se segue.

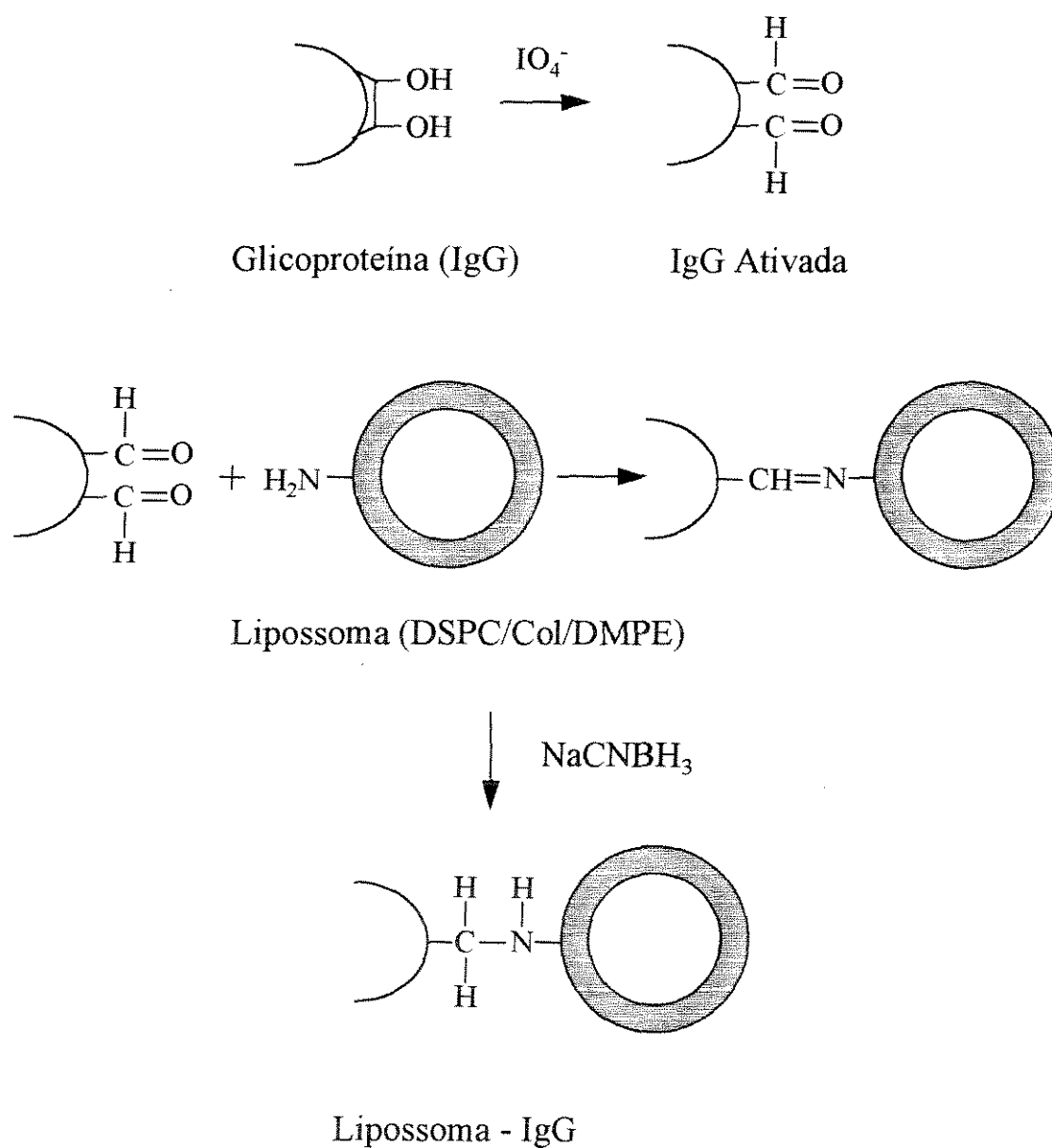


Figura 11 - Esquema da ligação de moléculas de IgG ativadas com periodato a lipossomas contendo DMPE em sua composição.

A um miligrama de anticorpo marcado com  $^{14}\text{C}$ , adicionou-se 40  $\mu\text{l}$  de uma solução a 0,3 M de  $\text{NaIO}_4$  diluído em solução tampão apresentando uma concentração de 50 mM em citrato de sódio (pH 6,0). A amostra foi mantida no escuro por 30 minutos à 25°C, com agitação suave. Com este procedimento, oxidou-se os grupos hidroxila do anticorpo a aldeídos.

O excesso de periodato foi neutralizado pela adição de 500  $\mu\text{l}$  de solução de etileno glicol a 0,64 M também diluído em solução de tampão citrato a 50 mM e pH 6,0.

A mistura foi mantida por 1 h, nas mesmas condições descritas anteriormente. O anticorpo ativado foi separado dos reagentes passando-se a amostra por uma coluna de filtração em gel do tipo Econo-Pac 10DG equilibrada com uma solução tampão a pH 8,45 contendo 0,773 g de ácido bórico, 0,417 g de borato de sódio e 1,753 g de NaCl dissolvidos em 250 ml de água deionizada (solução tampão bórax-borato). Após essa etapa, adicionou-se o anticorpo ativado eluído (cerca de 3 ml, a aproximadamente 0,3 mg/ml) a 1 ml de lipossomas a uma concentração aproximada em lipídios de 2,5 mM. Ao longo da reação, o pH da mistura foi mantido em 8,45 pela adição de solução de NaOH a 0,1 N. A mistura foi incubada por 2 horas, a 25°C, com agitação suave. Ao final desse período, adicionou-se à mistura 50  $\mu\text{l}$  de solução de  $\text{NaCNBH}_3$  a 100 mg/ml diluído na solução tampão de bórax-borato. A mistura final foi mantida em geladeira a 4°C por 16 a 18 horas. A amostra resultante foi, então, aplicada em uma coluna de 75 cm x 1,5 cm recheada com Sepharose CL-6B e equilibrada com solução tampão II. As frações coletadas (com volume de cerca de 1,5 ml cada) foram analisadas por medida de absorvância a 300 nm e de radioatividade ( $^{14}\text{C}$ ). As amostras ricas em lipossomas foram combinadas e devidamente caracterizadas.

### *3.2.7. Acoplamento de Anticorpos do Tipo IgM a Lipossomas Contendo DOX Encapsulada*

O método utilizado fundamenta-se na ligação covalente dos grupos maleimida disponíveis na superfície dos lipossomas com os grupamentos tiol presentes nas moléculas de anticorpo reduzidas, sendo uma adaptação da técnica descrita por Hashimoto et al. (1983). A Figura 12 ilustra as etapas do acoplamento, que são descritas a seguir. O mesmo procedimento foi utilizado tanto para o anticorpo IgM-C quanto para o IgM-H11.

Inicialmente, reduziu-se as moléculas de IgM de sua forma pentamérica (com peso molecular em torno de 900.000 dáltons) para a monomérica (peso molecular estimado em 180.000 dáltons) pela adição de cisteína à solução contendo de 0,6 a 1,6 mg de IgM marcada com  $^{14}\text{C}$ . A concentração final de cisteína foi mantida em 0,2 M. Após reagir por 10 minutos a 125 rpm e 27°C, a amostra foi resfriada em banho de gelo por 2 a 3 minutos e aplicada em uma coluna de dessalinização do tipo Econo-Pac 10DG pré-equilibrada com uma solução aquosa a pH 6,8 contendo 120 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM tampão fosfato e 2 mM EDTA, para a remoção da cisteína. O eluente contendo o anticorpo (1 ml) foi adicionado à suspensão de lipossomas (2 ml) encapsulando DOX e contendo de 0,5 a 2 mM em lipídios. Antes de serem misturados ao anticorpo, os lipossomas foram aplicados em uma coluna de dessalinização do tipo Econo-Pac 10DG pré-equilibrada com solução tampão II com pH corrigido para 6,8.

A mistura de lipossomas com a IgM reduzida foi mantida sob agitação suave (125 rpm) a 37°C por 1 hora, após o que os grupos maleimida não reagidos foram bloqueados pela adição de 0,166 mg de cisteína diluída em 0,2 ml de água deionizada. A solução resultante foi incubada nas mesmas condições por mais 30 minutos.

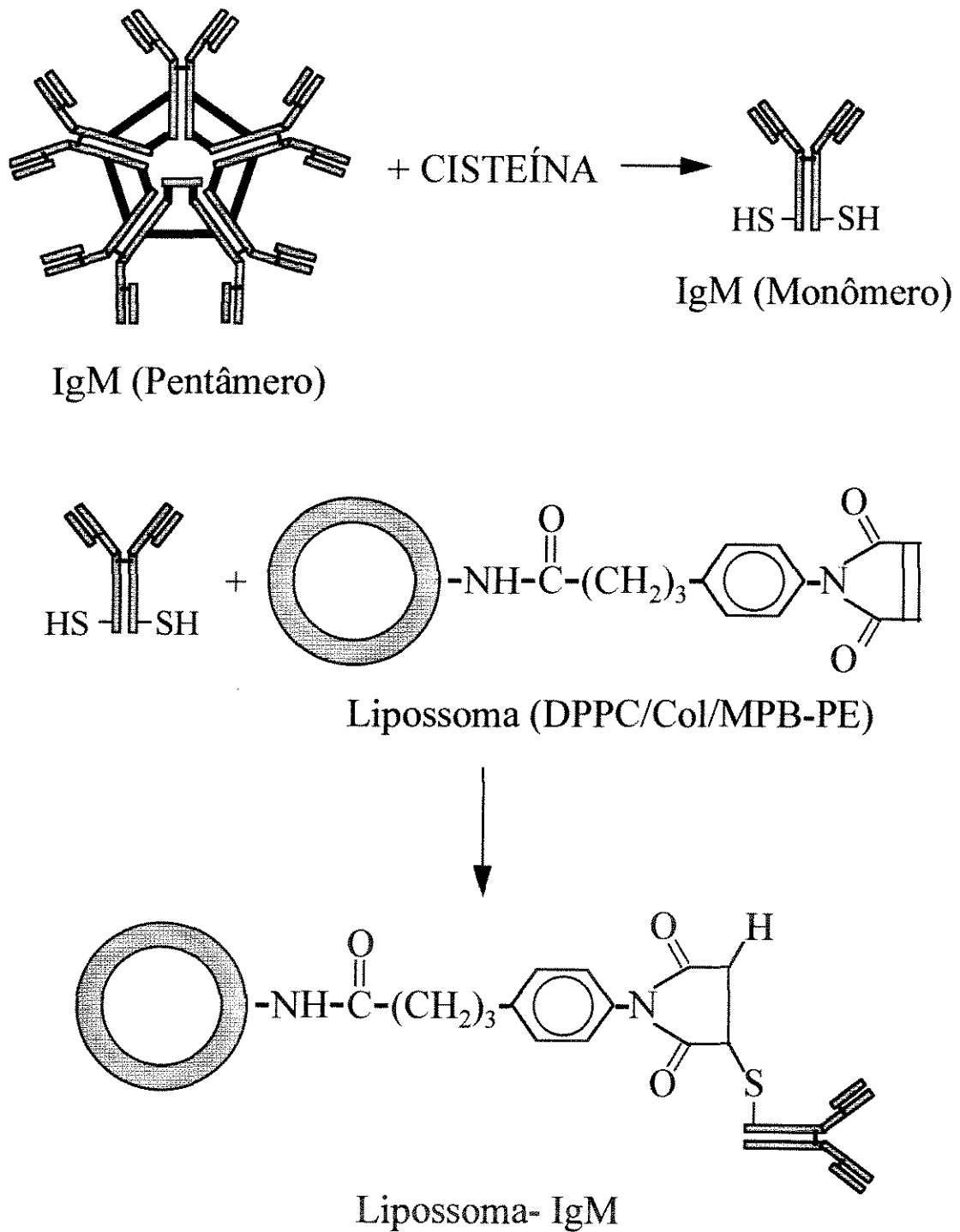


Figura 12 - Esquema da ligação de moléculas de IgM após redução com cisteína a lipossomas contendo o lipídio MPB-PE em sua composição.



A amostra foi, então, aplicada em uma coluna de 94 cm x 1,5 cm recheada com Sepharose CL-6B equilibrada com a solução-tampão II a pH 7,4. O material eluído da coluna foi coletado em frações de 1,5 ml. As frações foram analisadas e as amostras ricas em lipossomas foram combinadas e caracterizadas.

### 3.2.8. Caracterização dos Lipossomas

As frações coletadas após a remoção dos compostos terapêuticos não encapsulados e de anticorpos não reagidos tiveram suas absorvâncias monitoradas espectrofotometricamente a 300 nm, para a detecção das frações ricas em lipossomas. As frações contendo lipossomas em maiores concentrações foram combinadas e as vesículas obtidas puderam ser caracterizadas quanto ao diâmetro médio, conteúdo de lipídios, compostos terapêuticos encapsulados e anticorpos acoplados.

*Determinação do Diâmetro Médio das Vesículas* - O tamanho das vesículas foi determinado medindo-se seus raios hidrodinâmicos por espectroscopia de espalhamento de luz de frequência determinada obtida por incidência de raios laser (“quasi elastic light scattering”, QLS). Neste método, são medidas as flutuações da intensidade do espalhamento de luz com o tempo para a determinação do coeficiente de difusão da partícula em solução diluída (Ford, 1985). Para partículas esféricas em movimento Browniano, o raio hidrodinâmico médio,  $R_h$ , pode ser calculado da relação de Stokes-Einstein, dada pela equação 3:

$$R_h = \frac{kT}{6\pi D\mu} \quad (3)$$

onde  $k$  é a constante de Boltzmann,  $T$  a temperatura absoluta,  $D$  o coeficiente de difusão médio da vesícula e  $\mu$  a viscosidade do solvente.

*Estimativa dos Parâmetros Característicos das Cadeias de PEG Ligadas aos Lipossomas* - A inclusão de DMPE-PEG nos lipossomas resulta na formação de um recobrimento hidrofílico. A espessura dessa camada hidrofílica pode ser estimada a partir do cálculo do raio de giração, do raio de Flory, do comprimento das cadeias de PEG e da distância entre cadeias na superfície da vesícula (Israelachvili, 1994).

Quando em solução, um polímero de peso molecular  $M$ , com monômeros de peso molecular  $M_0$ , comprimento  $\ell$  e número de monômeros  $n$ , pode adotar diversas conformações de acordo com as forças de interação segmento-segmento. Se as interações são fracas, o polímero assume a forma de uma cadeia aleatória cujo raio de giração,  $R_g$ , pode ser calculado da seguinte equação:

$$R_g = \frac{\ell\sqrt{n}}{\sqrt{6}} = \frac{\ell\sqrt{M/M_0}}{\sqrt{6}} \quad (4)$$

O comprimento da cadeia completamente esticada é dado por:

$$L_e = n\ell \quad (5)$$

Em um bom solvente (onde o parâmetro de solubilidade do solvente é próximo do parâmetro de solubilidade das cadeias poliméricas, sendo este parâmetro igual à raiz quadrada da densidade da energia coesiva), os segmentos se repelem, resultando no inchamento e na expansão da cadeia, de

forma que o seu tamanho efetivo pode ser calculado pelo raio de Flory,  $R_f$ , definido como:

$$R_f = \ell n^{3/5} \quad (6)$$

Para uma distribuição de cadeias poliméricas na superfície da vesícula onde a distância entre cadeias é igual a  $s$ , o comprimento da cadeia de PEG,  $L$ , é dado por:

$$L = \frac{n\ell^{5/3}}{s^{2/3}} = \Gamma^{1/3} R_f^{5/3} \quad (7)$$

onde  $\Gamma$  representa o número de cadeias presentes por unidade de área, sendo definido como:

$$\Gamma = \frac{1}{s^2} \quad (8)$$

*Determinação da Concentração de Lipídios* - A concentração de lipídios nas amostras foi determinada pela quantificação de fosfato de acordo com a técnica sugerida por Chen Jr. et al. (1956). Este método basea-se na digestão do fosfolipídio a fosfato inorgânico e  $\text{CO}_2$  por  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O ortofosfato forma então um complexo com molibdato de amônio, que quando reduzido por ácido ascórbico, forma um complexo azul detectável espectrofotometricamente a 830 nm.

A aplicação do método foi feita nas seguintes etapas:

1) Preparou-se amostras-padrão com concentrações conhecidas de fosfato inorgânico e orgânico (para a comprovação da eficácia da digestão das

amostras reais por  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) na faixa de 0,2 mM a 2,7 mM.

2) Em tubos do tipo Pyrex®, contendo cada um duas pérolas de vidro, adicionou-se 100  $\mu\text{l}$  dos padrões (em duplicata) e da amostra (em triplicata) convenientemente diluída e 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 10N. A vidraria utilizada nos ensaios foi lavada com detergente sem fosfatos e exaustivamente enxaguada em água deionizada.

3) Aqueceu-se os tubos a uma temperatura entre 200 e 250°C por 20 minutos.

4) Removeu-se os tubos do digestor e após o seu resfriamento à temperatura ambiente, adicionou-se 150  $\mu\text{l}$  de água oxigenada a 30 % livre de fosfato. Retornou-se os tubos ao digestor, por mais 30 minutos.

5) Adicionou-se 4 ml de água deionizada e 500  $\mu\text{l}$  de uma solução aquosa de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  a 2,5 % (m/v) a todos os tubos, agitando-se vigorosamente.

6) Adicionou-se 500  $\mu\text{l}$  de uma solução aquosa de ácido ascórbico a 10 % (m/v) e agitou-se vigorosamente.

7) Aqueceu-se as amostras a 100°C em banho de água em ebulição por 7 minutos e após o seu resfriamento, mediu-se as absorbâncias contra água deionizada a 830 nm.

8) A concentração molar total em lipídios da amostra foi calculada dividindo-se a concentração de fosfolipídios determinada pela curva de calibração obtida a partir dos padrões utilizados pela fração molar de fosfolipídio presente na amostra, para levar em conta a presença do colesterol.

*Determinação das Concentrações de CPA e BPA* - A concentração dos compostos contendo boro incorporados em lipossomas foi avaliada por dois métodos diferentes. O primeiro método envolve a reação das amins primárias presentes nos compostos de boro em pH alcalino com o ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico (TNBS), sendo baseado no procedimento proposto

por New (1990) para a determinação de aminas primárias. O produto final da reação apresenta coloração amarela intensa, podendo ser monitorado espectrofotometricamente.

O método da reação com TNBS envolveu as seguintes etapas:

- 1) Preparou-se os padrões das aminas primárias que se desejava avaliar, em concentrações na faixa de 0,02 a 0,36 mM em aminas.
- 2) A 0,3 ml de amostras e padrões, adicionou-se 0,3 ml de uma solução aquosa de Triton X-100 a 100 mM. Incubou-se as soluções a temperatura ambiente por duas horas, para se assegurar o rompimento das vesículas
- 3) Adicionou-se 0,2 ml de solução de  $\text{NaHCO}_3$ , a pH 8,5 para se elevar o pH da mistura.
- 4) Adicionou-se a todos os tubos 20  $\mu\text{l}$  de solução aquosa de TNBS a uma concentração de 15 mg/ml. Agitou-se os tubos rapidamente e incubou-se as amostras no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente.
- 5) Interrompeu-se a reação pela adição de 0,4 ml de HCl a 1,5 N e mediu-se as absorvâncias a 410 nm contra água destilada dentro de uma hora.

Uma desvantagem dessa técnica é que o DMPE também reage com o TNBS, uma vez que este composto também possui uma amina primária. Tal problema foi contornado pelo estabelecimento de curvas-padrão para vesículas de mesma composição não encapsulando o composto terapêutico em estudo.

O segundo método empregado na determinação dos compostos de boro foi utilizado para a validação dos resultados obtidos com o TNBS. Este método fundamenta-se na formação de um complexo fraco de boro com 2-etil-1,3-hexanodiol. Esse complexo pode ser extraído de soluções aquosas com clorofórmio, podendo então ser convertido em outro complexo quando em contato com curcumina, ácido acético e ácido sulfúrico. O complexo formado apresenta cor avermelhada e tem elevada absorção a 554 nm (Ikeuchi e Amano, 1978).

A complexação com curcumina possibilitou a avaliação direta da quantidade de boro presente nas amostras, envolvendo as seguintes etapas:

- 1) Preparou-se as soluções-padrão contendo boro em concentrações na faixa de 2 a 18  $\mu\text{g/ml}$ , a partir de uma solução de ácido bórico a 0,38 mg/ml.
- 2) A 1,0 ml de amostras e padrões, adicionou-se 1,5 ml de uma solução aquosa de  $\text{KMnO}_4$  a 2% (m/v). A degradação oxidativa das amostras foi obtida pela incubação das soluções em tubos de Teflon em banho-maria a  $95^\circ\text{C}$  por uma hora (o uso de tubos de Teflon previne a contaminação das amostras por borossilicatos presentes em tubos de vidro).
- 3) Após o resfriamento até a temperatura ambiente, adicionou-se 2 ml de solução a 10% (v/v) de 2-etil-1,3-hexanodiol em clorofórmio às soluções, agitando-se por 3 minutos a 200 rpm. Centrifugou-se amostras e padrões a 2.000 rpm por 3 minutos. Removeu-se a fase aquosa contendo  $\text{MnO}_2$  precipitado por aspiração através de trompa de vácuo.
- 4) Em um frasco volumétrico de polipropileno, adicionou-se 100  $\mu\text{l}$  do extrato em clorofórmio, 200  $\mu\text{l}$  de solução de curcumina a 0,375% (m/v) diluída em ácido acético e 60  $\mu\text{l}$  de ácido sulfúrico concentrado. Agitou-se suavemente os frascos e incubou-se as amostras por 15 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Completou-se o volume de todas as amostras a 25 ml com etanol e mediu-se imediatamente as absorbâncias a 554 nm contra uma solução em branco contendo apenas solução tampão tratada similarmente.

*Determinação da Concentração de Doxorrubicina (DOX)* - Essa droga foi detectada espectrofotometricamente de acordo com a técnica sugerida por Mayer et al. (1990). O método é bastante rápido e simples, e através dele é possível determinar as concentrações da droga livre e encapsulada nos lipossomas. O procedimento tem por base a alteração pronunciada do máximo de absorbância quando se aumenta o pH de soluções contendo a droga de 7,4

para 10,5. Essa mudança pode ser acompanhada visualmente pela alteração da cor de vermelho-alaranjado para azul.

O método constou das seguintes etapas:

A - Determinação da Concentração Total de Doxorubicina

- 1) Diluiu-se as amostras de lipossomas contendo a droga com a solução tampão II, para se alcançar concentrações de DOX na faixa de 0,02 a 0,1 mM.
- 2) Adicionou-se 12 µl de uma solução aquosa a 20 % (m/v) de Triton X-100 a 1,2 ml da amostra.
- 3) Aguardou-se 15 minutos para que as membranas lipídicas dos lipossomas se desestabilizassem e a doxorubicina fosse liberada das vesículas.
- 4) Avaliou-se a absorvância da solução a 480 nm contra a solução tampão II contendo a mesma quantidade de detergente que a amostra, e descontou-se o valor de absorvância devido à presença das vesículas por si só (determinado utilizando-se a mesma concentração de vesículas, sem droga, e de Triton X-100). Calculou-se a concentração total de droga na amostra a partir de uma curva de calibração previamente obtida.

B - Determinação da Concentração de Doxorubicina Externa aos Lipossomas

- 1) Tomou-se três alíquotas de 1,2 ml cada de amostra de lipossomas contendo de 0,02 a 0,1 mM em droga (alíquotas A, B e C).
- 2) Nas alíquotas A e B, adicionou-se 24 µl de água deionizada.
- 3) Utilizando-se as alíquotas A e B, ajustou-se a absorvância a 600 nm para zero (com esta etapa, elimina-se a interferência causada pelo espalhamento de luz devido à presença das vesículas).
- 4) Na alíquota C, adicionou-se 24 µl de solução aquosa de NaOH a 1 M.
- 5) Mediu-se a absorvância da alíquota C contra A ou B a 600 nm, dentro de dois minutos (a absorvância da DOX a pHs elevados não é estável, e a solução transforma-se rapidamente de azulada para incolor). Calculou-se a

concentração externa da droga na amostra a partir de uma curva de calibração previamente estabelecida.

De posse dos dados de concentração de lipídios e de compostos terapêuticos de uma amostra, avaliou-se a efetividade de incorporação através de dois parâmetros: a razão molar final composto terapêutico/lipídio e a eficiência de encapsulação percentual,  $\varepsilon$ , definida como:

$$\varepsilon = 100 * \frac{(\text{moles composto terapêutico} / \text{moles lipídio})_{\text{Final}}}{(\text{moles composto terapêutico} / \text{moles lipídio})_{\text{Inicial}}} \quad (9)$$

O número de moléculas de composto terapêutico encapsulado por vesícula foi estimado utilizando-se o diâmetro médio final das vesículas e as concentrações finais de lipídio e de composto terapêutico encapsulado. A área da seção transversal de moléculas isoladas de fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina foram consideradas como  $71 \text{ \AA}^2$ ,  $19 \text{ \AA}^2$  e  $41 \text{ \AA}^2$ , respectivamente (Israelachvili e Mitchel, 1975). As áreas médias por molécula de lipídio para vesículas compostas por DSPC/DMPE/Col e por DPPC/Col/MPB-PE são  $44,2 \text{ \AA}^2$  e  $48,5 \text{ \AA}^2$ , respectivamente. As áreas médias por molécula de lipídio para vesículas contendo DMPE-PEG foram também estimadas em  $44,2 \text{ \AA}^2$ , com base no fato de que a presença das cadeias de PEG não afetam fortemente a estrutura da bicamada (Needham et al., 1992). Considerando-se que aproximadamente 60 % das moléculas de lipídio que compõem um lipossoma unilamelar estão localizadas na parte externa da bicamada lipídica (Powers et al., 1990), calculou-se o número de moléculas de lipídio por lipossoma de um determinado diâmetro, o volume correspondente de solução aquosa capturada e o número de moléculas de composto terapêutico encapsuladas por lipossoma. Para os lipossomas “stealth”, utilizou-se um diâmetro efetivo nos cálculos obtido pela subtração de um valor



correspondente à presença das cadeias de PEG na superfície da vesícula, dado pelo parâmetro L da equação 7. Estes valores foram 6 nm para vesículas contendo 6 % DMPE-PEG e 8 nm para vesículas contendo 12 % DMPE-PEG.

*Estimativa do Número de Anticorpos Ligados por Lipossoma* - A concentração de anticorpos foi determinada pela medida da radioatividade de 100  $\mu$  de amostra contendo lipossomas diluída em 10 ml de coquetel de cintilação CytoScint por 20 minutos no analisador de cintilação de líquidos. O número de anticorpos ligados por lipossoma foi estimado com base no número de lipossomas suspensos por mililitro de amostra, calculado a partir da concentração de lipídios da amostra, do diâmetro dos lipossomas e da área média ocupada por molécula de lipídio.

### ***3.2.9. Monitoramento de Gradientes de pH nos Lipossomas***

A quantificação dos gradientes de pH nos lipossomas antes e após a incorporação de CPA foi conduzida de acordo com a metodologia descrita por Mayer et al. (1990). Este método é baseado na redistribuição das moléculas de [ $^{14}$ C]-metilamina através da membrana do lipossoma, em resposta a gradientes de pH. As moléculas de metilamina acumuladas no interior das vesículas sequestram estequiometricamente prótons da solução tampão interna ao lipossoma e os níveis de radiação decorrentes da presença do [ $^{14}$ C] são monitorados antes e após a incorporação da metilamina. O protocolo experimental envolveu as seguintes etapas:

- 1) Adicionou-se [ $^{14}$ C]-metilamina (normalmente, 40  $\mu$ l de uma solução de metilamina dissolvida em etanol/água a uma proporção de 1:3 partes em volume, a uma concentração de 25  $\mu$ Ci/ml) à suspensão de lipossomas contendo até 10 mM em lipídios, alcançando-se um nível final de

aproximadamente 0,5  $\mu\text{Ci/ml}$  e um volume total de cerca de 2 ml, corrigido pela adição da solução tampão adequada.

2) Incubou-se as amostras por 15 minutos a 60°C e a 166 rpm.

3) Após o resfriamento das amostras a temperatura ambiente, a metilamina não encapsulada pelos lipossomas foi removida por cromatografia de filtração em gel, utilizando-se colunas do tipo Econo-Pac 10DG previamente equilibradas com solução tampão a pH 7,50 contendo 20 mM HEPES e 150 mM NaCl.

4) Determinou-se as concentrações de metilamina e de lipídios antes e após a separação da metilamina não encapsulada. As concentrações de metilamina foram quantificadas pela contagem de radiação das amostras no coquetel de cintilação CytoScint por 20 minutos em um analisador de cintilação em líquidos modelo Tri-Carb 1500, fabricado pela Packard Instrument Company.

5) A partir dos dados de diâmetro médio das vesículas e de concentração final em metilamina após o encapsulamento, calculou-se o volume de solução tampão encapsulado e a concentração interna de metilamina. O pH no interior da vesícula foi calculado a partir da seguinte equação:

$$[\text{H}^+]_{\text{in}} / [\text{H}^+]_{\text{ext}} = [\text{Metilamina}]_{\text{in}} / [\text{Metilamina}]_{\text{ext}} \quad (10)$$

onde [Metilamina] é a concentração da metilamina protonada no interior ou no exterior da vesícula e  $[\text{H}^+]$  é a concentração de próton interna ou externa.

### 3.2.10. Avaliação da Estabilidade dos Lipossomas em Soluções do Tensoativo Não-Iônico $\text{C}_{12}\text{E}_5$

A quantificação da estabilidade dos lipossomas em soluções de  $\text{C}_{12}\text{E}_5$  foi efetuada através da adição das vesículas a soluções tampão com concentrações variadas do tensoativo, em placas de microtitulação de

poliestireno com 96 poços de fundo redondo (Corning Incorporation), de acordo com o método descrito por Steffen (1993). O estado de dispersão dos lipossomas foi monitorado pela variação da turbidez das soluções resultantes em pseudo-equilíbrio, duas horas após a ação do tensoativo, a 340 nm, em uma leitora de placas modelo EL 340, da Biotek Instruments Inc. Esse método é baseado no princípio de que as soluções variam de transparentes a turvas à medida em que as vesículas interagem com o tensoativo e entre si, formando espécies de formas e tamanhos distintos dos originais, como um resultado do crescimento, fusão e desestruturação dos lipossomas em micelas.

Soluções estoque do tensoativo foram preparadas em concentrações variando de 3 a 100 mol %. A percentagem de tensoativo nas soluções foi definida com base nos números de moles de tensoativo e de lipídios presentes na amostra, de acordo com a seguinte equação:

$$\% C_{12}E_5 = 100 * \text{moles } C_{12}E_5 / (\text{moles } C_{12}E_5 + \text{moles lípidos}) \quad (11)$$

O volume total das amostra foi mantido em 200  $\mu$ l, constando de 120  $\mu$ l de solução de tensoativo a várias concentrações (de 0 a 50 mM) e de 80  $\mu$ l de suspensão de lipossomas a 2,5 mM em lipídios, sendo cada teste feito em triplicata. Como referência, utilizou-se soluções contendo apenas tensoativo e solução tampão (HEPES 10 mM, pH 7,4). A absorbância das amostras de referência foi subtraída da média das absorbâncias globais das amostras contendo lipossomas.

### *3.2.11. Avaliação dos Coeficientes de Partição Aparentes dos Compostos BPA e CPA em Sistemas Octanol-Soluções Aquosas*

Inicialmente, CPA ou BPA foram dissolvidas nos seguintes solventes

aquosos, em concentrações finais de 0,8 e 0,4 mM, respectivamente: água deionizada, solução de ácido cítrico a 300 mM (pH 4,0), soluções contendo 20 mM HEPES + 150 mM NaCl a pH 7,5 e a pH 13. Como a BPA apresenta solubilidade bastante limitada em soluções aquosas em comparação com a CPA, soluções de menor concentração foram empregadas para se evitar a presença de precipitados de BPA. Todas as soluções foram aquecidas a 60°C por cerca de 5 minutos, para facilitar a solubilização dos compostos de boro. Após o resfriamento a temperatura ambiente, as soluções foram filtradas através de filtros Acrodisc providos de membranas com poros de 0,45 µm de diâmetro.

Em um tubo de ensaio, uma alíquota de 2 ml de cada uma das soluções descritas foi misturada com 2 ml de octanol previamente saturado com água deionizada e pré-equilibrado a 8°C, 25°C, 37°C, 50°C ou 65°C (temperaturas iguais às utilizadas na incubação lipossomas/compostos de boro, exceto a temperatura de 8°C). Os tubos foram tampados e as amostras foram misturadas por inversões repetidas (30 vezes). As amostras foram incubadas na mesma temperatura em que foram misturadas, por 30 minutos, em repouso. Com a finalidade de se assegurar uma boa separação de fases após a incubação, todas as amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm por 3 minutos.

Coletou-se amostras da fase inferior (aquosa) para determinação das concentrações de CPA e BPA por reação com TNBS, após a devida correção do pH das soluções para 7,5. Em todas as situações, a concentração dos compostos de boro em octanol foi estimada como sendo a diferença entre a quantidade originalmente adicionada ao sistema e a quantidade determinada na fase aquosa. O coeficiente de partição aparente,  $P$ , foi definido como a razão entre as concentrações do composto na fase superior e na fase inferior após a incubação. Não foram feitas correções para a inclusão de material adsorvido nas paredes dos tubos ou nas interfaces ar/octanol e octanol/soluções aquosas.

O composto CPA quando suspenso em solução a pH 13, não se apresentou na forma solúvel e continuou exibindo precipitados mesmo após o aquecimento e também após dispersão por 10 minutos em sonificador de bancada, não se constituindo portanto, em uma solução adequada para o estudo de coeficientes de partição.

Esse tipo de teste não pode ser executado para a droga doxorubicina devido à forte adsorção deste composto às paredes de frascos tanto de vidro como de plástico, dificultando a sua detecção precisa.

### ***3.2.12. Determinação dos Parâmetros de Crescimento das Células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1***

O estudo da proliferação das células SK-MG-1 para determinação dos parâmetros de crescimento foi realizado de acordo com o procedimento descrito a seguir. Cerca de uma hora antes do início do experimento, colocou-se meio de cultura completo em placas de Petri descartáveis de poliestireno (5 ml/placa). As placas foram colocadas na estufa a 37°C e 5 % CO<sub>2</sub> para que atingissem o equilíbrio. Preparou-se, então, uma suspensão de células por tripsinização de culturas previamente inoculadas em frascos do tipo T-75 e incubados a 37°C e 5 % CO<sub>2</sub> por 3 a 4 dias.

A tripsinização constou da remoção do meio de cultura que banhava as células aderidas ao fundo do frasco, seguida da lavagem das células aderidas pela adição de 4 ml de solução salina balanceada de Hank (SSBH) e da adição de 4 ml de solução de tripsina suína a 0,05 % em SSBH suplementada com 0,02 % de EDTA-4Na. O frasco foi então colocado em estufa 7°C e 5 % CO<sub>2</sub> por 6 minutos, para que as células se desprendessem. Após a incubação, adicionou-se 4 ml de meio de cultura para neutralizar a tripsina e procedeu-se a homogeneização por agitação intensa seguida da contagem do número de

células viáveis utilizando o corante Trypan Blue.

A concentração de células viáveis, determinada visualmente por contagem em microscópio, foi então ajustada para  $5 \cdot 10^4$  células/ml e a seguir adicionou-se 1 ml da suspensão celular obtida em cada placa de Petri. Agitou-se as placas suavemente, para distribuir as células sobre a superfície de maneira homogênea e incubou-se as mesmas à 37°C e 5 % CO<sub>2</sub> por 9 dias. A cada dia, removeu-se um conjunto de 4 placas para a determinação do número de células por tripsinização e avaliação microscópica, utilizando-se de 1 a 2 ml de solução de tripsina e de meio de cultura.

O número de células foi plotado em função do tempo de cultivo, fornecendo dados a respeito do tempo de adaptação das células (período inicial onde não há multiplicação celular), taxa de crescimento na fase exponencial e número máximo de células obtidas.

### *3.2.13. Avaliação da Citotoxicidade in Vitro de Compostos Terapêuticos Livres e Encapsulados em Lipossomas*

A toxicidade dos veículos (soluções tampão I e II), da BPA livre e dos agentes terapêuticos CPA e DOX livres e encapsulados em lipossomas foi avaliada utilizando-se dois métodos distintos: exclusão de Trypan Blue e redução do reagente Alamar Blue. Cada teste envolveu de 4 a 12 réplicas.

O método de exclusão do corante Trypan Blue possibilitou a medida instantânea da viabilidade celular, sendo baseado na avaliação da integridade da membrana plasmática. As células viáveis são geralmente impermeáveis a corantes como o Trypan Blue, não se colorindo quando expostas a estas substâncias por curtos intervalos de tempo, como por exemplo, até 2 minutos (Freshney, 1994). Assim, através de microscopia ótica simples pode-se estimar a citotoxicidade de um dado agente. Os testes com Trypan Blue

foram realizados por equipe especializada da Divisão de Neurocirurgia da Universidade da Carolina do Norte, em Chapel Hill, NC, EUA.

No procedimento experimental, a etapa inicial dos testes de toxicidade por exclusão de Trypan Blue constou da tripsinização de culturas de células SK-MG-1 previamente inoculadas em frascos do tipo T-75 incubados a 37°C e 5 % CO<sub>2</sub> por 3 a 4 dias. A concentração de células viáveis foi então ajustada para 5\*10<sup>4</sup> células/ml. Aliquotas dessa suspensão de células foram adicionadas em placas de microtitulação (Falcon) com 96 poços de fundos chatos (0,2 ml por poço, equivalente a 10.000 células/poço). As placas inoculadas foram incubadas por 48 horas a 37°C e 5 % CO<sub>2</sub>. Ao final desse período, as células estavam aderidas ao fundo das placas, no estágio de crescimento logarítmico. O meio de cultura foi removido por aspiração e os agentes testados concentrados ou convenientemente diluídos em meio de cultura completo foram adicionados aos poços da placa (0,2 ml por poço). Após incubação em estufa à 37°C e 5 % de CO<sub>2</sub> por 24, 48 ou 72 h, uma gota de Trypan Blue foi adicionada por poço e em seguida, as células foram avaliadas por microscopia.

Os efeitos tóxicos de diversos agentes foram também testados utilizando-se linfócitos normais de sangue humano (células não aderentes) obtidos de dois doadores. Os linfócitos foram lavados três vezes e suspensos em RPMI 1640 suplementado com 10 % (v/v) de soro de feto bovino, 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml de streptomicina. Aliquotas de 0,3 ml de suspensão de linfócitos a 4,5\*10<sup>6</sup> células/ml foram misturadas com 0,3 ml do agente que se desejava testar, em tubos cônicos descartáveis. As células foram incubadas com os compostos terapêuticos por 24, 48 e 72 h à 37°C e 5 % de CO<sub>2</sub>, quando se avaliou a viabilidade das células após sua exposição ao Trypan Blue.

A avaliação da capacidade de proliferação de células SK-MG-1 após a exposição aguda ou crônica das mesmas a diversos agentes através da redução

de Alamar Blue é descrita a seguir. Esse método é indicado na literatura como uma alternativa à técnica de incorporação de timidina marcada com  $^3\text{H}$  para a avaliação de efeitos citotóxicos (Pagé et al., 1993). O ensaio é baseado na incorporação celular do indicador de óxido-redução Alamar Blue, que tanto fluoresce quanto muda de cor em resposta à redução química do meio de cultura resultante do crescimento celular. Com o crescimento das células, a atividade metabólica provoca também a redução química do Alamar Blue. A redução relacionada ao crescimento celular causa a mudança da forma oxidada do indicador (azul, não fluorescente) para a forma reduzida (vermelho, fluorescente). A metodologia utilizada nos testes baseou-se essencialmente no procedimento sugerido pelo fabricante do reagente. Assim como na avaliação da citotoxicidade pela técnica do Trypan Blue, inoculou-se alíquotas de 0,2 ml de suspensão de células SK-MG-1 a  $5 \times 10^4$  células/ml em placas de microtitulação (Falcon) com 96 poços de fundos chatos (0,2 ml por poço, equivalente a 10.000 células/poço). As placas foram incubadas por 48 horas a  $37^\circ\text{C}$  e 5 %  $\text{CO}_2$ . Ao final desse período, o meio de cultura foi removido por aspiração e os agentes testados concentrados ou convenientemente diluídos em meio de cultura completo ou incompleto (sem o soro de feto bovino, SFB) foram adicionados aos poços (0,2 ml por poço). O meio de cultura incompleto foi utilizado para evitar a desestabilização dos lipossomas por interação com as proteínas do SFB. As células ficaram em contato com o material em teste por 1 h, 2 h e 4 h (exposição aguda) ou por 48 h (exposição crônica) a  $37^\circ\text{C}$  e 5 %  $\text{CO}_2$ . Os poços com células incubadas por menos de 48 horas na presença dos agentes terapêuticos tiveram seus conteúdos aspirados após a exposição e foram lavados por duas vezes com 0,2 ml de SSBH e uma vez com 0,2 ml de meio de cultura completo. Após as lavagens, adicionou-se 0,2 ml de meio de cultura completo por poço e incubou-se a placa nas mesmas condições descritas anteriormente por 48 horas.



Tanto para os testes de exposição aguda quanto crônica, 48 horas após o início do teste adicionou-se 20 µl do reagente Alamar Blue em cada poço. As placas foram novamente incubadas, nas mesmas condições, por 4 horas, quando então mediu-se a fluorescência das mesmas (excitação a 530/25 e emissão a 590/35, fator de sensibilidade igual a 2) em um equipamento modelo Cytofluor 2350 fabricado pela Millipore.

Os resultados foram expressos em termos de percentual de inibição, calculado a partir da fluorescência das células expostas ao agente testado e da fluorescência de uma amostra controle tratada similarmente apenas com o meio de cultura:

$$\% \text{ Inibição} = 100 * \frac{\text{Fluorescência do Agente Testado}}{\text{Fluorescência do Controle}} \quad (12)$$

#### ***3.2.14. Avaliação da Sobrevivência das Células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1 Submetidas à Presença de CPA Livre***

A sobrevivência de células SK-MG-1 expostas a soluções de CPA diluída em solução tampão I foi avaliada pelo método de exclusão de Trypan Blue e pela capacidade de formação de clones a partir de células tratadas com este composto de boro.

Três dias antes do experimento, inoculou-se frascos descartáveis do tipo T-25 com  $2 * 10^5$  células viáveis suspensas em 6 ml de meio de cultura. Os frascos foram incubados por 3 dias em estufa à 37°C e 5 % CO<sub>2</sub>. Após este período, o meio de cultura foi removido e as monocamadas de células foram tratadas com soluções de CPA com concentrações variando de 1 mM a 10 µM (3 ml por frasco), incluindo-se também um tratamento apenas com o veículo

(solução tampão I). Após a incubação dos frascos em estufa por 2 h, as soluções de CPA foram transferidas para tubos de centrífuga. Os frascos foram lavados com 3 ml de meio de cultura completo para a remoção de células que tivessem se desprendido das paredes e esse material foi adicionado aos tubos, que foram centrifugados por 3 minutos em centrífuga de bancada, a alta velocidade. Descartou-se o sobrenadante dos tubos, mantendo-se o precipitado contendo as células. As células ainda aderidas aos frascos T-25 foram removidas por tripsinização (2ml de solução de tripsina e 2 ml de meio de cultura) e os 4 ml de suspensão resultante foram adicionados ao precipitado obtido na centrifugação, juntamente com 6 ml de meio de cultura fresco. A suspensão foi homogeneizada por agitação e a concentração de células foi avaliada com o auxílio do corante Trypan Blue, determinando-se os percentuais de células viáveis e não viáveis.

A suspensão de células proveniente de cada tratamento teve sua concentração ajustada serialmente de forma a conter de 100 a 18.000 células viáveis por mililitro. Aliquotas de 1 ml das amostras com diversas concentrações celulares foram inoculadas em placas de Petri descartáveis de 60 mm de diâmetro contendo 5 ml de meio de cultura (1 hora antes da inoculação, as placas com o meio de cultura foram colocadas em estufa à 37°C e 5 % CO<sub>2</sub>). Maiores concentrações celulares foram inoculadas para os tratamentos com CPA a elevadas concentrações. As placas foram incubadas imóveis em estufa por 12 dias.

Após esse período, removeu-se o meio de cultura e lavou-se cuidadosamente as placas com 2 a 5 ml de solução salina a 0,9 % (m/v) de NaCl. Adicionou-se cerca de 2 ml de uma solução contendo 2,5 g de cristal violeta diluído em uma mistura de 900 ml de metanol a 80 % e 100 ml de formaldeído e incubou-se à temperatura ambiente por 30 minutos para a fixação e coloração das colônias desenvolvidas na superfície das placas.

Removeu-se a solução de cristal violeta e lavou-se exaustivamente com água de torneira para remover o excesso de corante. Secou-se as placas à temperatura ambiente por 15 horas e determinou-se visualmente o número de colônias formadas por placa. Para ser considerada, cada colônia devia apresentar no mínimo 40 células, levando-se em conta apenas as placas com número de colônias entre 40 e 200.

Contagens de amostras provenientes de frascos tratados apenas com meio de cultura foram utilizadas para normalizar os resultados. Esta normalização foi feita dividindo-se o número de colônias obtidas em todos os tratamentos pela eficiência de plaqueamento, calculada como o percentual de clones formados a partir de um número conhecido de células saudáveis inoculadas. O percentual de células sobreviventes em cada tratamento foi determinado tomando-se o número de colônias formadas normalizadas e dividindo-se pelo número de células viáveis originalmente inoculadas na placa.

### ***3.2.15. Avaliação da Especificidade de Interação dos Anticorpos do Tipo IgM Livres e Acoplados a Lipossomas com Células SK-MG-1***

O estudo da interação células/anticorpos *in vitro* possibilita a constatação de alterações na especificidade do anticorpo após o processo de acoplamento do mesmo à superfície de lipossomas, bem como da existência de interações não específicas do material a ser testado com as células. Os testes foram baseados no procedimento adotado por Ahmad et al. (1992).

Inicialmente, inoculou-se placas de poliestireno com 6 poços de fundo chato e diâmetros iguais a 35 mm com  $3,3 \times 10^5$  células por poço (3 ml de suspensão celular/poço). As placas foram incubadas por 52 horas a 37°C e 5 % CO<sub>2</sub>, para que se obtivesse uma monocamada de células com alto grau de recobrimento da superfície. Após a incubação, removeu-se o meio de cultura e

adicionou-se 1 ml do agente que se desejava testar (IgM-C e IgM-H11 livres e ligadas covalentemente a lipossomas) suspenso em solução tampão II, em várias diluições no mesmo veículo. As placas foram incubadas por 1 h, seguida da aspiração do agente em teste. Cada poço foi lavado por 3 vezes com 2 ml de SSBH, para minimizar a retenção de anticorpos livres e de lipossomas que não estivessem ligados de maneira específica às células. Após a lavagem, adicionou-se 0,5 ml de solução de tripsina a 0,05 % (m/v) por poço, incubou-se por 6 minutos e adicionou-se 0,5 ml de meio de cultura completo. As células suspensas de cada poço foram então transferidas para frascos contendo 2 ml de água deionizada e 10 ml do coquetel de cintilação Universol (esse fluido permite a avaliação da radioatividade de suspensões de partículas). Cada poço foi enxaguado com 1 ml de SSBH e também este material foi transferido para os respectivos frascos de cintilação. Com esse procedimento, removeu-se praticamente todas as células originalmente aderidas nas placas.

Determinou-se a radioatividade resultante das amostras, em termos dos números de desintegrações por minuto e calculou-se o número de anticorpos e lipossomas ligados às células.

### *3.2.16. Avaliação da Toxicidade in Vivo de Doxorrubicina Livre e Encapsulada em Lipossomas*

Os efeitos da injeção intracraniana de doxorrubicina livre e encapsulada em vesículas foram avaliados em ratos Fisher 344 machos pesando de 150 a 175 g, obtidos da Charles River. Os ensaios foram conduzidos por uma equipe especializada da Divisão de Neurocirurgia da Universidade da Carolina do Norte, em Chapel Hill, NC, EUA.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais em ciclos noite/dia de 12 horas, tendo acesso livre à água e à ração alimentar padronizada. O

procedimento teve início com uma cirurgia para a implantação de cânulas no crânio dos animais, por onde se injetaria as amostras. Para tal, os ratos foram anestesiados profundamente por injeção intraperitoneal de pentobarbital de sódio, a uma concentração de 30 a 40 mg/kg de peso corpóreo.

A instalação das cânulas intracranianas foi feita basicamente como descrito por Morreale et al. (1993). Este procedimento consistiu da imobilização da cabeça do rato (já desprovida de pêlos) em um suporte e do afastamento de parte da pele do crânio. A seguir, fez-se um orifício a 3 mm da sutura sagital e a 2 mm da sutura coronal, onde uma cânula-guia número 22 (Plastic Products), de aço inoxidável, foi inserida, assim como 3 parafusos de 3/32'', também de aço inoxidável, para ancoragem. As peças inseridas foram imobilizadas pelo uso de cimento plástico. Inseriu-se então um estilete na cânula-guia a uma profundidade de 1 mm além da cânula, para a formação de um pequeno reservatório. Esse estilete serviu também para evitar o entupimento da cânula-guia e para proteger o orifício de ser infectado, funcionando como uma rolha. Imediatamente após o endurecimento do cimento plástico, retirou-se o estilete e inseriu-se uma cânula de injeção na cânula-guia. As amostras que se desejava testar foram, então, injetadas através de uma bomba seringa modelo Harvard (Harvard Apparatus) conectada à cânula de injeção. Após a injeção de 10 µl de amostra por rato, a uma vazão constante de 1 µl/minuto, os animais repousaram por 10 minutos, quando se removeu a cânula de injeção, recolocando-se o estilete. Retornou-se os animais às suas gaiolas, onde os mesmos permaneceram por 3 ou 14 dias para avaliação dos efeitos agudos e crônicos, respectivamente. Para cada tipo de teste utilizou-se 3 animais, em um total de 6 ratos por amostra.

Após os períodos de 3 ou 14 dias, os animais foram novamente anestesiados com pentobarbital via intraperitoneal. O peito dos ratos foi aberto cirurgicamente e realizou-se perfusão por 20 minutos com solução salina

contendo 0,3 % de heparina seguida por solução a 4 % em paraformaldeído. Os cérebros foram removidos e fixados por uma noite a 4°C em solução de sacarose a 30 % (m/v). Em seguida, os cérebros foram transferidos e mantidos por 24 a 48 h a 4°C em solução de paraformaldeído a 4 %. Os cérebros foram então congelados em gelo seco e cortados em fatias de 8 µm de espessura. Este material foi montado em lâminas e tratado com hematoxilina e eosina para avaliação microscópica.

### *3.2.17. Avaliação da Distribuição Ultraestrutural in Vivo de Boro Proveniente de CPA Livre e Encapsulada em Lipossomas*

A distribuição de átomos de boro em células normais e de tumores implantados no cérebro de ratos foi avaliada através de espectroscopia de perda de energia de elétrons acoplada à geração de imagens por espectroscopia eletrônica. Esses testes foram realizados por uma equipe especializada do Departamento de Patologia da Universidade da Califórnia, Davis, CA, EUA.

Essa técnica baseia-se na medida da perda de energia característica experimentada por um raio de elétrons primário ao interagir com elementos presentes em uma amostra de tecido celular (Aboagye et al., 1995). Cada elemento químico apresenta um espectro distinto de perda de energia. O monitoramento do espectro energético resultante na forma de uma seqüência de imagens com alta resolução fornece informações a respeito da perda de energia específica associada ao elemento de interesse. Perdas de energia não específicas (background) encontram-se sobrepostas à imagem gerada, devendo ser descontadas. A comparação da intensidade da perda de energia de dois elementos distintos pode fornecer dados semiquantitativos em uma escala local. Essa técnica tem uma resolução de cerca de 2 nm e um índice de detecção teórico de aproximadamente 500 átomos. Assim, o acoplamento da

espectroscopia de perda de energia de elétrons à geração de imagens por espectroscopia eletrônica possibilita a avaliação da distribuição intracelular de um dado elemento.

A etapa inicial do procedimento experimental constou da implantação intracraniana de tumores do tipo gliossarcoma 9L em ratos Fisher 344 machos (total de 53 animais). Treze dias após a implantação das células 9L, injetou-se nos animais 1 ml de CPA livre (160 ppm) ou encapsulada em lipossomas convencionais extrudados (20 ppm), suspensa em solução tampão I, por via intravenosa (femoral). Os efeitos em animais não injetados com CPA foram avaliados em testes controle.

Os ratos foram sacrificados 30 minutos ou 4 h após a injeção de CPA, quando se fez a remoção de tecidos cerebrais normais e cancerosos e de sangue. As amostras devidamente preparadas, com espessura entre 30 e 60 nm, foram avaliadas pelo uso de um microscópio de transmissão eletrônica modelo CEM 902, da Zeiss, operando a 80 kV. O microscópio foi equipado para espectroscopia de perda de energia de elétrons com um sistema de análise de imagens do tipo IBAS (Kontron Elektronik). Ampliações de 3.000 vezes foram utilizadas, gerando imagens com alta resolução que possibilitaram o mapeamento do boro em estruturas celulares.

## CAPÍTULO IV

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo faz-se a descrição e discussão dos resultados obtidos na preparação e caracterização de lipossomas encapsulando os compostos BPA, CPA e DOX. Os resultados do acoplamento de anticorpos em lipossomas contendo DOX e de testes *in vitro* e *in vivo* feitos com alguns dos sistemas preparados são também apresentados e analisados.

### **4.1. Preparação e Caracterização de Lipossomas com os Compostos de Boro BPA e CPA Encapsulados**

#### ***4.1.1. Caracterização Preliminar dos Compostos de Boro Utilizados***

As interações existentes entre a bicamada lipídica e o composto que se deseja encapsular dependem tanto das características da bicamada como das propriedades físico-químicas do agente. A avaliação de dados de solubilidade do composto e de seu coeficiente de partição em sistemas formados por octanol e soluções aquosas pode fornecer informações preliminares úteis para caracterizar, de maneira generalizada, seu comportamento quando em contato com lipossomas.

Os coeficientes de partição aparentes dos compostos BPA e CPA, definidos como a razão entre as concentrações do composto na fase contendo



octanol e na aquosa, foram avaliados em sistemas 1-octanol/soluções aquosas. O uso de soluções aquosas com diferentes pH e composições visou simular o cerne aquoso e a bicamada lipídica nas condições experimentais usadas posteriormente para o encapsulamento dos compostos.

*Partição de BPA em Sistemas 1-Octanol/Soluções Aquosas* - Para a BPA, a natureza da solução aquosa não apresentou um efeito pronunciado no coeficiente de partição aparente mesmo variando a temperatura, como se pode observar na Figura 13. As baixas variações dos coeficientes de partição com a temperatura já eram esperadas, uma vez que o 1-octanol não apresenta transição de fases na faixa experimental utilizada.

Dos resultados obtidos, pode-se concluir que praticamente toda a BPA se acumulou na fase aquosa, resultando em valores reduzidos de coeficientes de partição aparentes. Os valores do logaritmo natural dos coeficientes de partição de BPA em água variaram de -2,4 a -1,7, estando na mesma faixa dos valores citados na literatura (Hansch e Leo, 1979) para os aminoácidos fenilalanina (log P igual a -1,35) e tirosina (log P igual a -2,26), que apresentam estruturas químicas semelhantes às deste composto.

A partição reduzida de BPA na fase orgânica indica que provavelmente haverá baixo acúmulo desse composto nos lipossomas pelo uso da técnica de incorporação ativa. No entanto, se a solubilidade da BPA puder ser aumentada, a incorporação passiva poderia apresentar bons resultados quanto à retenção do composto nos lipossomas durante períodos de estocagem, devido ao baixo coeficiente de partição na fase orgânica.

*Partição de CPA em Sistemas 1-Octanol/Soluções Aquosas* - Como ilustrado na Figura 14, os coeficientes de partição da CPA foram significativamente influenciados pela natureza da solução aquosa, enquanto

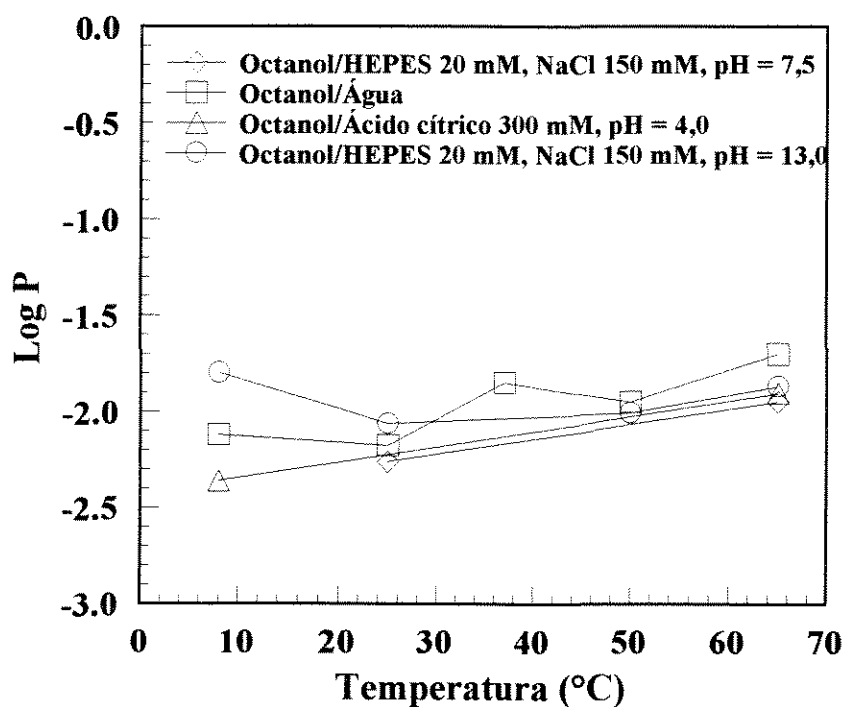


Figura 13 - Partição aparente da BPA entre 1-octanol e as seguintes soluções aquosas: 300 mM em ácido cítrico, pH 4,0; água deionizada; 20 mM em HEPES e 150 mM em NaCl, pH 7,5; e 20 mM em HEPES e 150 mM em NaCl, pH 13,0.

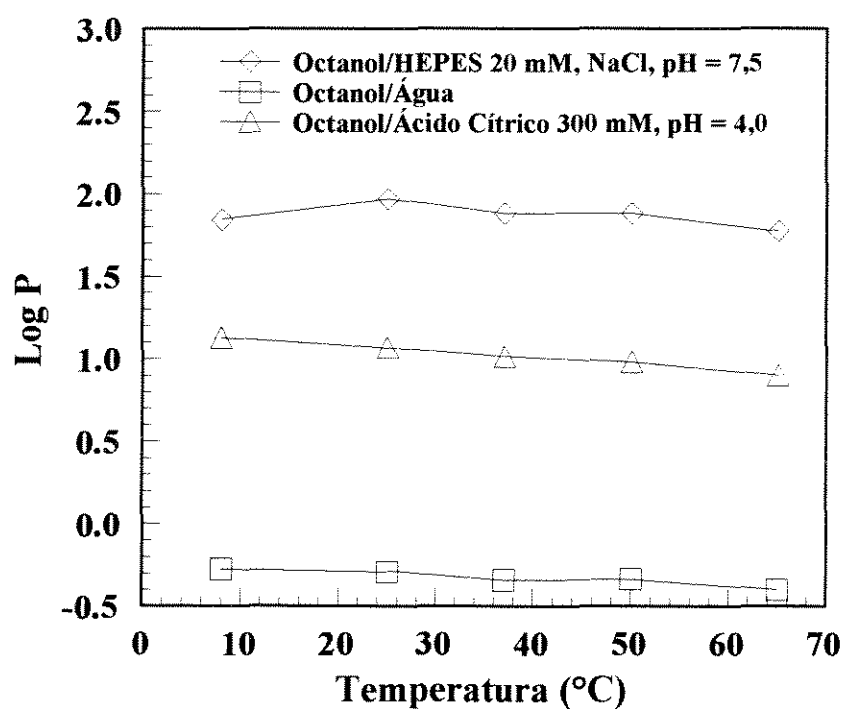


Figura 14 - Partição aparente da CPA entre 1-octanol e as seguintes soluções aquosas: 300 mM em ácido cítrico, pH 4,0; água deionizada; 20 mM em HEPES e 150 mM em NaCl, pH 7,5.

variações na temperatura de incubação afetaram muito pouco os coeficientes de partição deste composto em todos os sistemas testados. A discreta redução observada no logaritmo natural do coeficiente de partição com a temperatura em todas as situações pode ser devida a um aumento da solubilidade da CPA na fase aquosa, conduzindo a um menor acúmulo na fase oleosa.

Os resultados obtidos com octanol/solução tampão a pH 7,5 indicam que a base livre (CPA não carregada) apresenta um maior coeficiente de partição que a forma carregada. Para o sistema octanol/solução tampão a pH 4,0, a CPA na forma ionizada possivelmente sofreu partição como um par iônico, formado pela CPA carregada e pelo contra-íon (no caso, o citrato) fornecido pelo meio. No entanto, a espécie iônica se particionou apenas até uma certa extensão, quando pode ainda ser efetivamente neutralizada pelo citrato e solvatada pela fase fracamente polar constituída pelo octanol.

O comportamento sugerido para as formas livre e ionizada da CPA foi também confirmado quando se avaliou os dados obtidos para o sistema octanol/água, onde a fase aquosa não é capaz de fornecer contra-íons para a formação do par iônico com a CPA carregada. Nessa situação, o composto de boro permaneceria positivamente carregado, não sendo capaz de se acumular significativamente na fase orgânica. O mesmo comportamento foi observado por Murthy e Zografí (1970) para a partição de clorpromazina e de outros derivados de fenotiazina utilizando sistemas octanol/soluções aquosas.

Assim, é possível extrapolar essa avaliação para prováveis interações da CPA com a bicamada lipídica do lipossoma, em uma situação onde este composto estaria sujeito aos meios aquosos externo (pH 7,5) e interno (pH 4,0). As moléculas de CPA não carregadas (com elevado log P a pH 7,5) poderiam penetrar através da bicamada, se acumulando na fase aquosa interna. Se no cerne aquoso as moléculas de CPA são convertidas em cátions, o coeficiente de partição se reduziria e a droga perderia parcialmente sua

capacidade de atravessar a bicamada lipídica, acumulando-se no interior da vesícula. Tais suposições sugerem que o processo de incorporação ativa seria efetivo no encapsulamento deste composto, pois ambos os ambientes aquosos conduziram a um acúmulo preferencial de CPA na membrana lipídica. Se os coeficientes de partição obtidos a partir do sistema 1-octanol/água fossem utilizados para essa extrapolação, a predição seria de que não haveria acúmulo de CPA na bicamada lipídica.

#### ***4.1.2. Encapsulamento de BPA em Lipossomas***

*Incorporação Passiva* - A aplicação dessa técnica é limitada pela baixa solubilidade da BPA em soluções aquosas (máximo de 2,9 mg/ml água a 25°C). Assim, o encapsulamento deste composto foi testado utilizando-se a BPA suspensa (na forma de lama) em tampão a pH 7,4 (10 mM HEPES) e também em uma forma mais solúvel, obtida pela complexação com frutose, de acordo com a técnica de Matalka et al. (1993). O procedimento consta simplesmente da mistura de soluções aquosas equimolares de BPA e frutose, seguida de correção do pH para 8,9, o que permite que a solubilidade da BPA alcance valores de até 60 mg/ml.

A incorporação de BPA foi testada em lipossomas sonicados e extrudados, e os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 3.

Devido à reduzida solubilidade da BPA em 10 mM HEPES, não houve acúmulo do composto nos lipossomas convencionais sonicados. Entretanto, a presença do PEG nos lipossomas “stealth” sonicados aparentemente causou um aumento na solubilidade da BPA, possivelmente através de interações deste composto com as cadeias de PEG, resultando em um acúmulo da BPA. O encapsulamento do complexo frutose/BPA em lipossomas por sonicação não foi possível devido à degradação do material por oxidação.

Tabela 3 - Incorporação passiva de BPA em lipossomas, realizada a razões molares iniciais BPA/lipídios igual a 50:5.

Caracterização do Sistema	Composição das Vesículas			
	A	A	B	C
Meio de Suspensão da BPA	10 mM HEPES	50 mM Frutose	50 mM Frutose	10 mM HEPES
Método de Preparação	Sonicação	Extrusão	Extrusão	Sonicação
Razão Molar Final BPA/Lipídio	0	0,0518	0,0543	0,0256
Diâmetro Médio de Vesícula (nm)	72,6	118,2	134,4	92,3
Eficiência de Encapsulação (%)	0,0	0,5	0,5	0,3
Moléculas de BPA/Vesícula	0	8.572	10.221	2.051
Concentração Interna de BPA (mM)	0,0	30,3	24,5	21,5

A: DSPC/DMPE/Col

B: DSPC/Col

C: DSPC/DMPE/Col/12%DMPE-PEG

O uso do procedimento de Matalka et al. (1993) resultou em lipossomas convencionais com concentrações internas de BPA similares às obtidas para os lipossomas “stealth”. Em todos os casos, as eficiências de encapsulação foram bastante reduzidas e, no entanto, a percentagem de soluto capturado em relação à concentração inicial de BPA adicionada foi de, no mínimo, 43 %.

Como os diâmetros médios apresentados pelas vesículas convencionais de ambas as composições foram maiores que o obtido para os lipossomas “stealth”, os números estimados de moléculas de BPA retidas por vesícula foram também superiores, indicando que os lipossomas convencionais extrudados seriam possivelmente mais indicados para carrear este agente para tumores.

A estocagem dos lipossomas convencionais por 50 dias a 4°C resultou em menos que 4 % de liberação da BPA, podendo-se concluir que os sistemas são adequadamente estáveis do ponto de vista de estocagem (dados não apresentados).

*Incorporação Ativa* - A encapsulação ativa da BPA foi testada apenas para lipossomas sonicados, de composição DSPC/DMPE/Col, que podem ser facilmente convertidos em imunolipossomas pela ligação covalente de anticorpos aos grupos fosfatidiletanolamina presentes na superfície das vesículas. Razões molares iniciais BPA/lipídio de 0,4:2 foram utilizadas. Este valor foi selecionado de tal forma que aproximadamente 50 % do composto de boro seria acumulado nas vesículas (Madden et al., 1990). As vesículas foram incubadas com BPA em diferentes condições de tempo e temperatura, e os resultados estão ilustrados nas Figuras 15 e 16.

O estabelecimento de gradientes de pH não resultou em acúmulos apreciáveis de BPA nos lipossomas. Aumentos no tempo de incubação e na temperatura não conduziram a encapsulamentos mais efetivos, como é

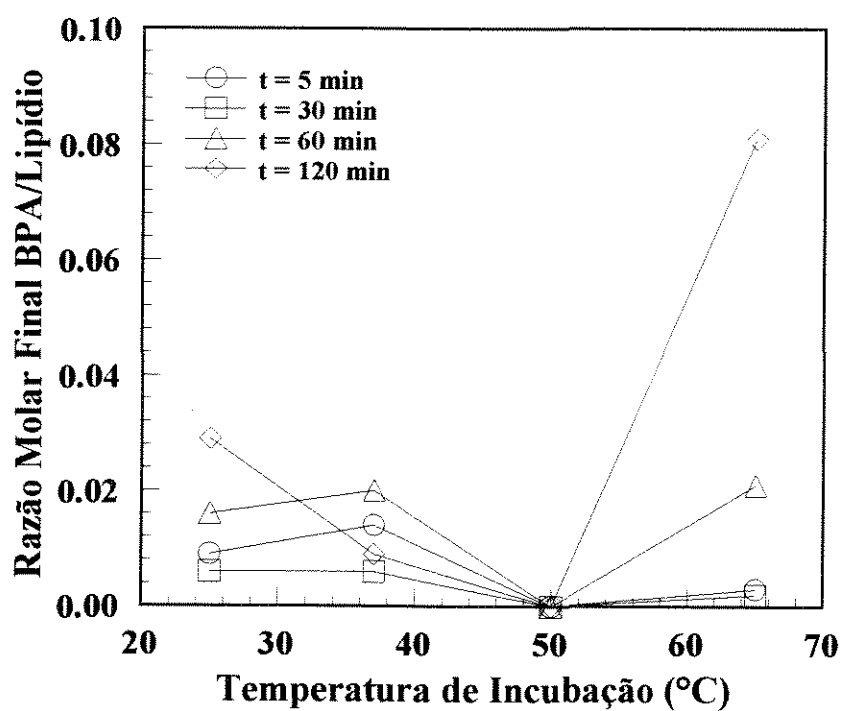


Figura 15 - Efeito da variação do tempo e da temperatura de incubação BPA/lipossomas na razão molar final BPA/lipídio. Razão molar inicial BPA/lipídio igual a 0,2.



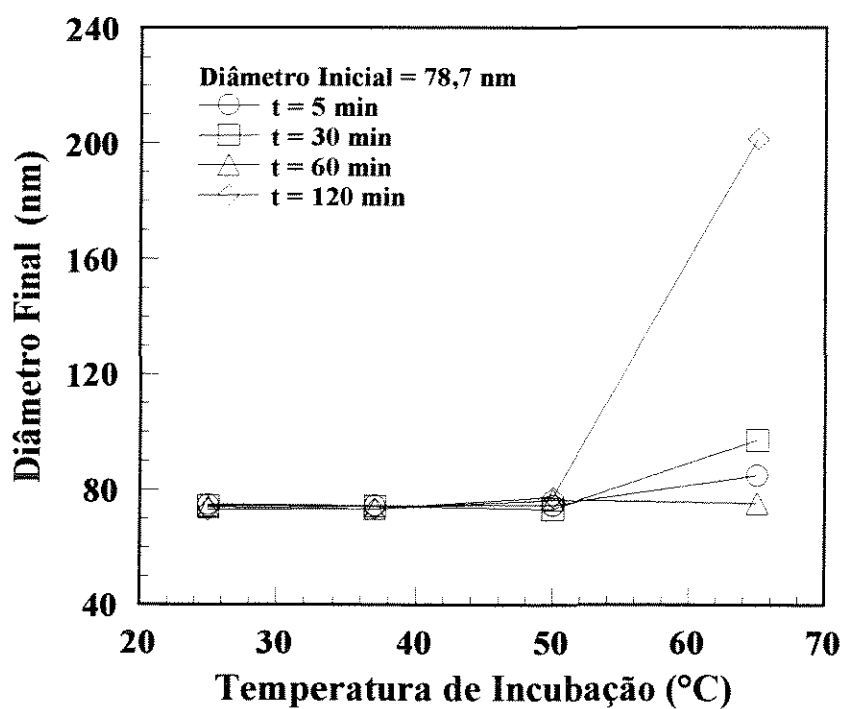


Figura 16 - Efeito da variação do tempo e da temperatura de incubação BPA/lipossomas no diâmetro final das vesículas. Razão molar inicial BPA/lipídio igual a 0,2.

ilustrado na Figura 15. Maiores quantidades de BPA foram encapsuladas apenas após duas horas de incubação a 65°C e, ainda assim, a concentração final de BPA foi reduzida. Nessas condições, notou-se o aparecimento de agregados de vesículas, indicado pelo aumento no diâmetro médio dos lipossomas, como pode ser observado na Figura 16.

A BPA provavelmente não se acumulou nos lipossomas em decorrência do gradiente de pH devido à sua pouca habilidade de atravessar membranas orgânicas, como ilustrado pelos baixos valores dos coeficientes de partição em sistemas 1-octanol/soluções aquosas.

Na temperatura de 50°C, a permeabilidade da membrana lipídica à BPA foi aparentemente ainda menor. Isso pode ter ocorrido em decorrência da presença do DMPE, que apresenta transição de fases nessa temperatura (New, 1990), podendo ter alterado a estrutura da bicamada, dificultando a penetração da BPA.

Outro fator que pode ter contribuído para as baixas eficiências de encapsulação é a distribuição de cargas da BPA. A Figura 17 ilustra as mudanças que podem ocorrer na BPA em soluções com diferentes valores de pH, assumindo-se que o grupo hidroxila não se ionize. A pH menor que o  $pK_{a1}$  do grupo carboxila (provavelmente em torno de 2), o composto apresentaria uma carga positiva devido à protonação da amina. Em valores de pH entre  $pK_{a1}$  e  $pK_{a2}$  (possivelmente em torno de 9), o composto apresentaria uma carga líquida neutra, pois tanto o grupo carboxila como o amina estariam ionizados. Em pHs maiores que  $pK_{a2}$ , a BPA estaria negativamente carregada. Assim, a baixa eficiência de encapsulação sugere que a membrana lipídica não é permeável ao composto neutro. A presença do grupo hidroxila na BPA pode também ter diminuído o acúmulo deste composto nos lipossomas, por reduzir a permeabilidade em bicamadas lipídicas, como observado por Nichols e Deamer (1976) no encapsulamento ativo de catecolaminas.

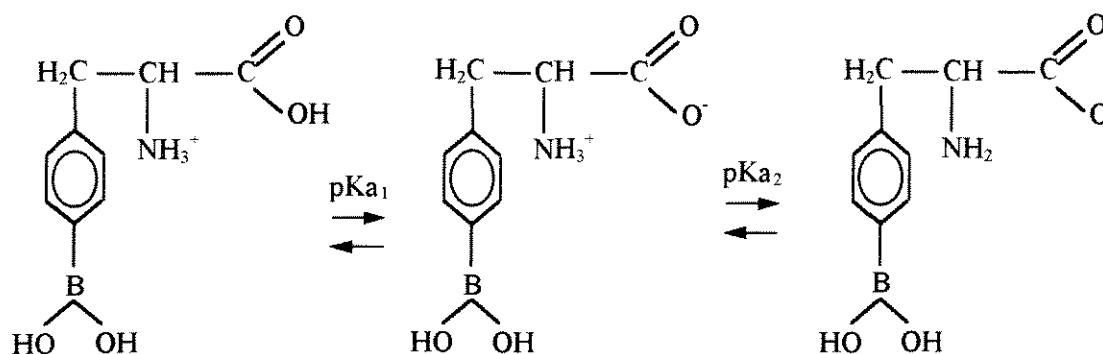


Figura 17 - Formas iônicas predominantes durante a titulação teórica da BPA. Para efeitos comparativos, os valores para  $pK_{a1}$  e  $pK_{a2}$  para o aminoácido fenilalanina em solução aquosa a  $25^{\circ}\text{C}$  são 2,2 e 9,3, respectivamente (Dawson et al., 1986).

#### 4.1.3. Encapsulamento de CPA em Lipossomas

*Incorporação Passiva* - A encapsulação passiva da CPA em lipossomas extrudados contendo DSPC/DMPE/Col foi testada utilizando-se uma razão molar inicial CPA lipídio igual a 50:7,5. Após a remoção do material não encapsulado, uma razão molar final de 1,58:3,8 foi obtida, para vesículas com diâmetro médio de 97,7 nm. Embora a eficiência de encapsulação tenha sido de apenas 6,5 %, o número de átomos de boro estimado por vesícula foi de 470.064. Considerando-se que toda a CPA estaria na forma solúvel no cerne aquoso da vesícula, a concentração de CPA naquela região seria de 294 mM, ou seja, praticamente 6 vezes maior que a concentração utilizada durante a etapa da hidratação. Este fato sugere que parte da CPA incorporada poderia estar associada à membrana lipídica.

Imediatamente após a remoção do composto não encapsulado, os lipossomas mostraram-se bastante instáveis, com aumento visível da turbidez da suspensão e formação de precipitado, o que resultou na perda de 23 % da CPA originalmente encapsulada após 3 dias de estocagem a 5°C. Resultados semelhantes foram observados para lipossomas sonicados contendo CPA encapsulada passivamente. Estes resultados sugerem que técnicas alternativas de encapsulação devem ser utilizadas para a CPA.

*Incorporação ativa em lipossomas sonicados* - As Figuras 18 e 19 ilustram os efeitos das condições de incubação CPA/lipossomas no encapsulamento ativo do composto de boro e no diâmetro final das vesículas obtidas por sonicação, para razões molares iniciais CPA/lipídio iguais a 0,4:2.

Como indicado na Figura 18, o encapsulamento foi relativamente insensível a mudanças nas condições de incubação. As razões molares finais CPA/lipídio variaram de 0,086 a 0,161 (equivalentes a eficiências de encapsulação de 43 e 80,5 %, respectivamente). Os maiores valores foram obtidos para incubações por maiores períodos, embora se tenha observado agregação das vesículas após 1 hora de incubação a 37 e 65°C (Figura 19). Após 2h de incubação, a agregação foi tão extensa que possibilitou a visualização de flocos em suspensão. Desta forma, nos experimentos posteriores, as incubações foram realizadas a 50°C por 30 minutos, o que possibilitava elevada eficiência de encapsulação sem que houvesse agregação das vesículas.

Estabelecidas as condições de incubação, avaliou-se o efeito de variações na da razão molar inicial droga/lipídio nas características de encapsulação da CPA. Os ensaios foram feitos tanto para lipossomas convencionais (compostos por DSPC/DMPE/Col, a 40:20:40 mol%) como para “stealth” (compostos por DSPC/DMPE/Col/DMPE-PEG, a 40:14:40:6

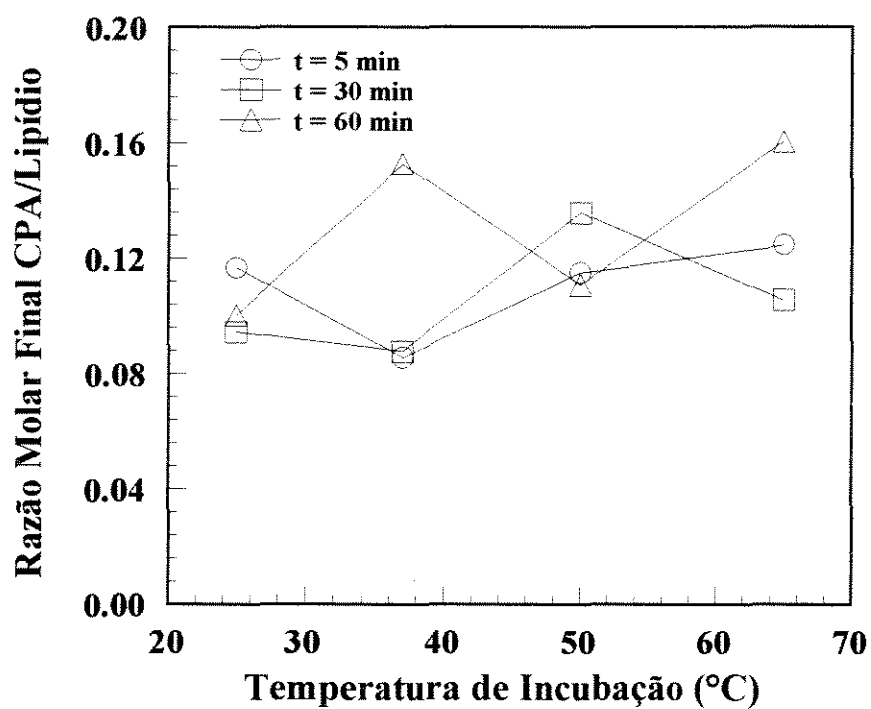


Figura 18 - Efeito da variação do tempo e da temperatura de incubação CPA/lipossomas na razão molar final CPA/lipídio. Razão molar inicial CPA/lipídio igual a 0,2.

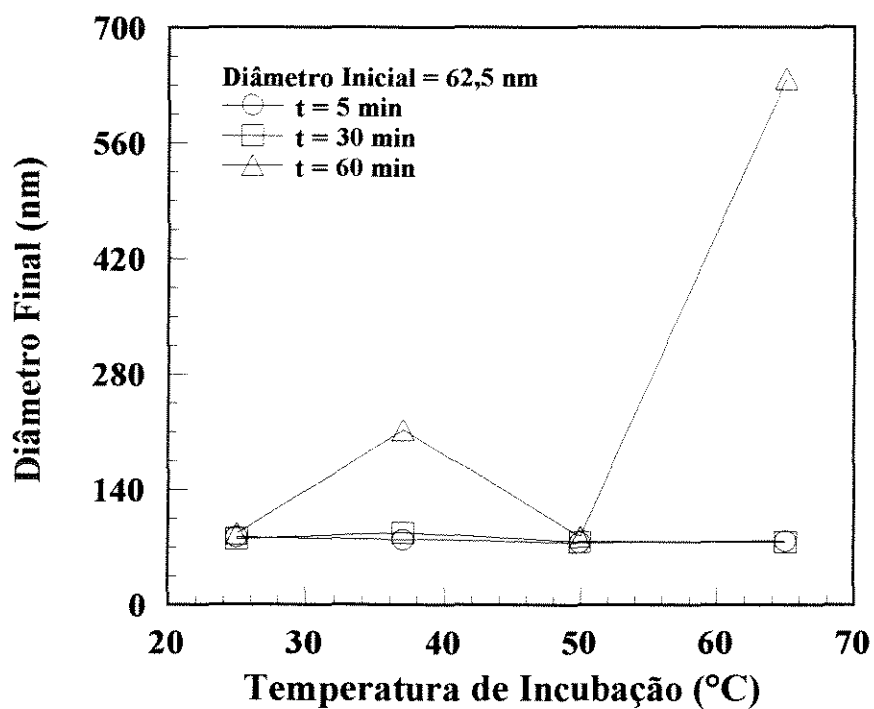


Figura 19 - Efeito da variação do tempo e da temperatura de incubação CPA/lipossomas no diâmetro final das vesículas. Razão molar inicial CPA/lipídio igual a 0,2.

mol% ou por DSPC/DMPE/ Col/DMPE-PEG, a 40:8:40:12 mol%). Os resultados estão ilustrados nas Figuras 20, 21 e 22.

Para vesículas convencionais, nota-se que a encapsulação de CPA é mais sensível à variação da razão inicial droga/lipídio que a alterações na temperatura ou no tempo de incubação. O aumento nas razões molares CPA/lipídio de 0,11 a 0,35 implicou na elevação da eficiência de encapsulação em até 181 nmol de CPA por mol de lipídio. Entretanto, para razões molares iniciais acima de 0,35, um equilíbrio aparente é alcançado, em torno de 160 nmol de CPA por mol de lipídio. Estes resultados indicam a existência de uma saturação no encapsulamento de CPA nos lipossomas e, conseqüentemente, a eficiência de encapsulamento decai com o aumento das razões molares iniciais CPA/lipídio. O diâmetro das vesículas sofreu aumentos de 3 a 32 % em decorrência da incubação com a CPA.

Os lipossomas contendo 6% de DMPE-PEG apresentaram um comportamento distinto do obtido com lipossomas convencionais. Para uma razão molar inicial droga/lipídio igual a 0,11, a incorporação de CPA é praticamente completa, resultando em elevada eficiência de encapsulação. No entanto, a concentração da CPA associada aos lipossomas decresce bastante para razões molares iniciais até 0,35, possivelmente devido a rearranjos na bicamada lipídica. Acima deste valor, as razões molares finais droga/lipídio aumentam novamente, alcançando um máximo na razão molar inicial de 1,56, onde praticamente se estabilizam. Nestas condições, a encapsulação de CPA em lipossomas com esta proporção de DMPE-PEG é próxima da obtida para vesículas convencionais, embora a eficiência de encapsulação não ultrapasse o valor de 10 %. Os lipossomas contendo 6% em DMPE-PEG, antes da incubação com a CPA, apresentaram um diâmetro médio de 98,2 nm, ou seja, 28,3 nm maiores que as veículas convencionais. Isto pode ser facilmente explicado pela presença das cadeias de polietileno glicol. Após a incubação,

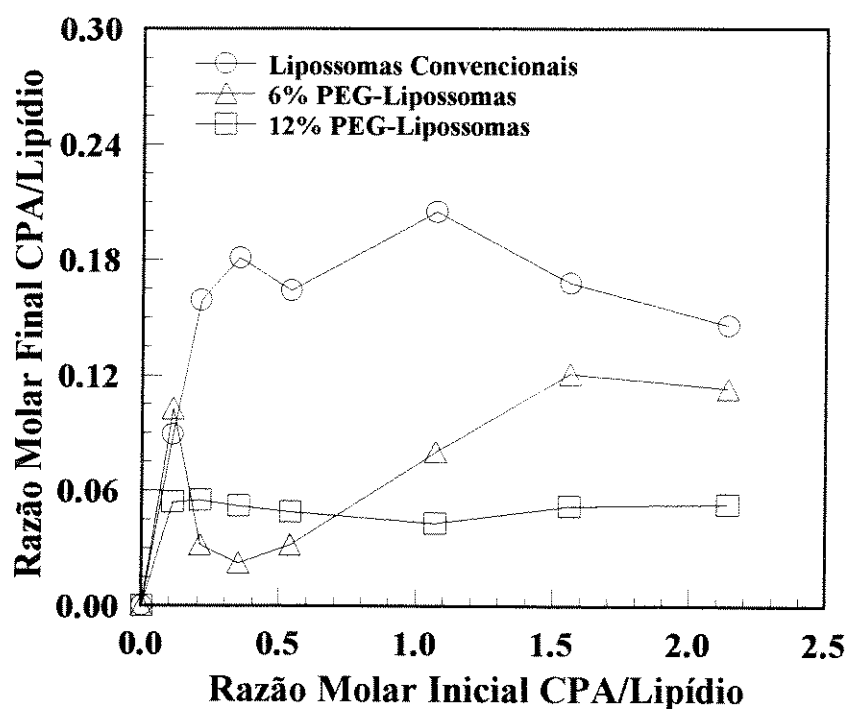


Figura 20 - Efeito da razão molar inicial CPA/lipídio na razão molar final CPA/lipídio para vesículas convencionais e “stealth” incubadas a 50°C, por 30 minutos, em presença de CPA.



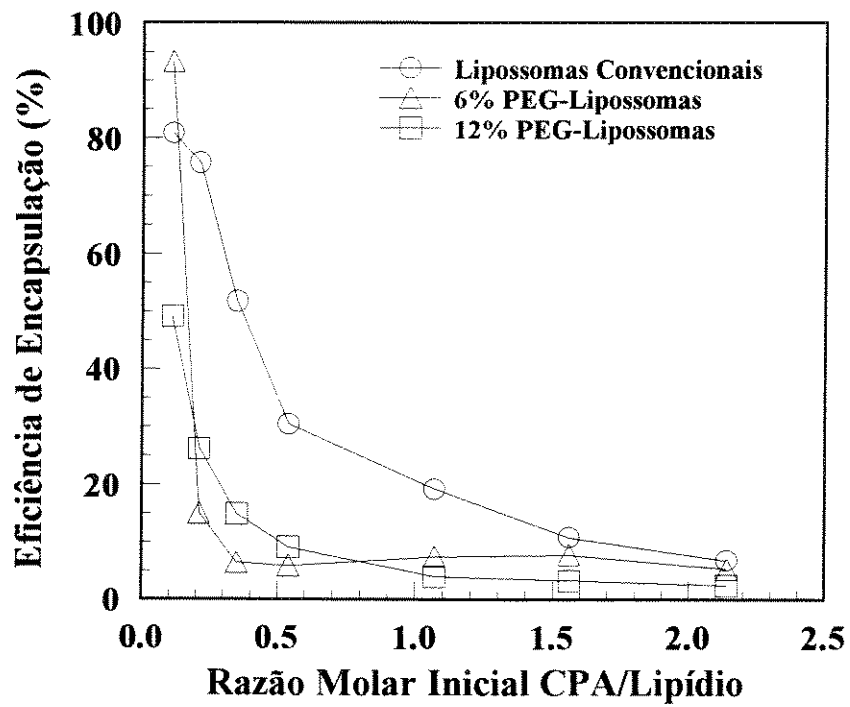


Figura 21 - Efeito da razão molar inicial CPA/lipídio na eficiência de encapsulação de CPA em vesículas convencionais e “stealth” incubadas a 50°C, por 30 minutos, em presença do composto de boro.

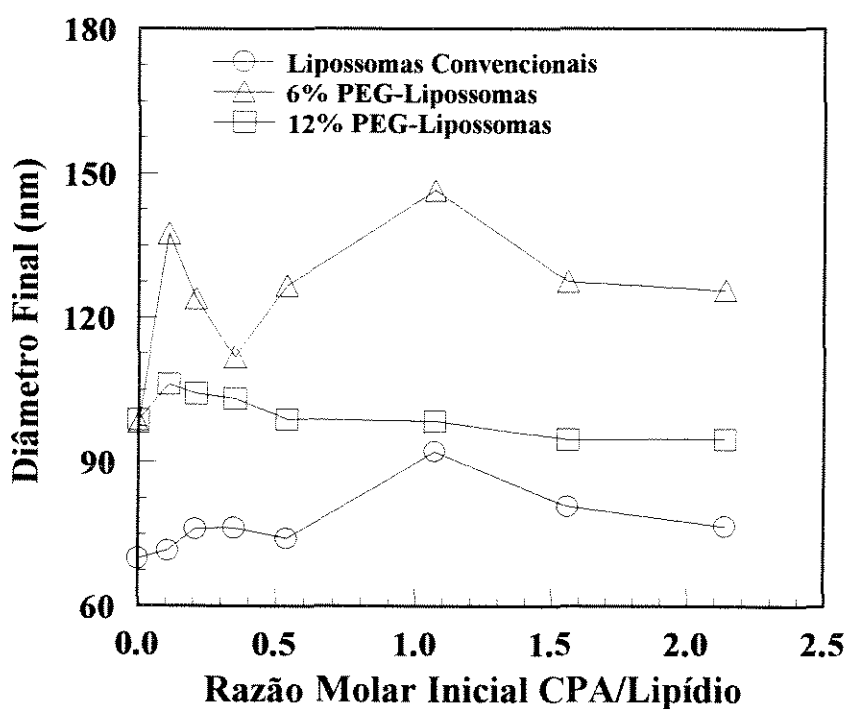


Figura 22 - Efeito da razão molar inicial CPA/lipídio no diâmetro hidrodinâmico final de vesículas convencionais e “stealth” incubadas a 50°C, por 30 minutos, em presença de CPA.

essas vesículas tiveram seus diâmetros aumentados de 14 a 49%, em decorrência da incorporação da CPA.

Lipossomas contendo 12% DMPE-PEG em sua composição apresentaram razões molares finais CPA/lipídio muito menores que os sistemas anteriormente descritos. Nesse caso, o encapsulamento máximo foi de 50 nmol de CPA por mol de lipídio, cerca de 2 a 3 vezes menor que os máximos obtidos para os outros sistemas. Ao longo de toda a faixa de razões molares iniciais CPA/lipídio, as eficiências de encapsulação foram reduzidas. Antes da incubação com a CPA, o diâmetro médio das vesículas contendo 12% DMPE-PEG era de 98,8 nm, comparável ao das vesículas contendo 6% DMPE-PEG (98,2 nm), e 28,9 nm, maiores que o dos lipossomas convencionais. Após a incubação, os lipossomas com 12% DMPE-PEG tiveram seus diâmetros aumentados no máximo em 7%, o que é consistente com o fato de que uma menor quantidade de CPA foi encapsulada nestas vesículas em comparação com os outros sistemas.

Como observado anteriormente, as vesículas convencionais puderam incorporar CPA de maneira mais eficiente, resultando em maiores razões molares finais CPA/lipídios. Entretanto, como as vesículas contendo 6 % de DMPE-PEG apresentaram maiores diâmetros, o número de moléculas de CPA e, conseqüentemente o número de átomos de boro associados por vesícula se equiparou ou mesmo superou o valor obtido para vesículas convencionais a razões molares iniciais de 0,11 e acima de 1,1, como se pode observar na Figura 23. Embora os diâmetros finais das vesículas contendo 12 % de DMPE-PEG fossem maiores que os medidos para as vesículas convencionais, a razão molar final foi, neste caso, reduzida, o que conduziu a baixos valores de números de átomos de boro encapsulados por lipossoma.

Estes resultados sugerem ser possível o emprego terapêutico de lipossomas “stealth” contendo 6% de DMPE-PEG ao invés de vesículas

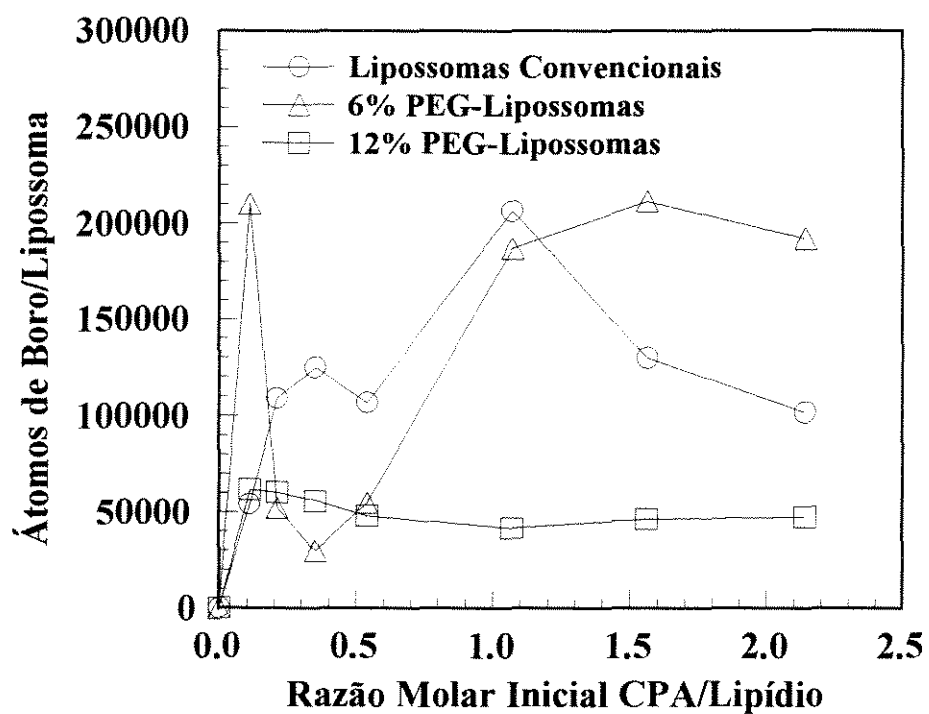


Figura 23 - Efeito da razão molar inicial CPA/lipídio no número de átomos de boro encapsulados em vesículas convencionais e "stealth" incubadas a 50°C, por 30 minutos, em presença de CPA.

convencionais, sem uma perda substancial com relação ao encapsulamento específico da CPA. Pode-se, por exemplo, calcular o número teórico de vesículas que deveriam ser administradas no tratamento de um paciente com um tumor pesando cerca de 1 g, por exemplo. A concentração mínima de  $^{10}\text{B}$  necessária para o tratamento efetivo é, de acordo com Hawthorne (1993), próxima de 30  $\mu\text{g}$  de  $^{10}\text{B}$  por grama de tumor, se o  $^{10}\text{B}$  estiver ligado às paredes celulares. Com base nos dados experimentais obtidos, uma suspensão de lipossomas com 6% de DMPE-PEG em sua formulação apresentando diâmetros médios de 120 nm e concentrações finais de lipídios e de CPA iguais a 1,5 mM e 0,15 mM, respectivamente, teria cerca de 150.000 átomos de boro encapsulados por vesícula. A concentração de vesículas em solução, estimada a partir da concentração total de lipídios, do diâmetro das vesículas e dos valores de área ocupada por molécula de lipídio seria de cerca de  $6 \cdot 10^{12}$  lipossomas/ml, significando que uma dose contendo 2 ml de suspensão seria suficiente para proceder o tratamento, se todos os lipossomas se acumulassem especificamente no tumor.

#### *4.1.4. Estabilidade de Lipossomas Sonicados Contendo CPA em Soluções de $\text{C}_{12}\text{E}_5$*

A avaliação da estabilidade dos lipossomas em soluções de tensoativos não-iônicos pode indicar o provável comportamento das vesículas quando expostas a fluidos fisiológicos, como por exemplo, o sangue. A adição de baixas concentrações de agentes com atividade superficial a dispersões de lipossomas pode afetar profundamente a membrana lipídica das vesículas, provocando variações na turbidez da solução. Desta forma, a avaliação da absorbância após a adição do tensoativo refletirá a estabilidade dos

lipossomas. A absorbância normalizada em equilíbrio, definida como  $(A - A_0)/A_0$ , onde  $A$  é a absorbância a diferentes concentrações de tensoativo e  $A_0$  é a absorbância na concentração de tensoativo igual a zero, pode ser plotada contra o percentual de tensoativo, definido como o número de moles de tensoativo dividido pelo total da soma do número de moles de tensoativo e de lipídios.

Os resultados comparativos obtidos para lipossomas convencionais e “stealth” sonicados contendo ou não CPA ativamente encapsulada expostos ao tensoativo  $C_{12}E_5$  são ilustrados na Figura 24. No caso de lipossomas com CPA encapsulada, o composto estava presente na razão de 0,085 mol CPA/mol lipídio para vesículas convencionais, de 0,041 mol CPA/mol lipídio para lipossomas contendo 12%DMPE-PEG e de 0,160 mol CPA/mol lipídio para lipossomas contendo 6%DMPE-PEG.

Pode-se observar que as vesículas convencionais e “stealth” contendo ou não CPA apresentaram modificações em suas absorbâncias após a exposição ao  $C_{12}E_5$ . Para os lipossomas convencionais, as variações na absorbância seguiram o padrão clássico de três estágios descrito para a solubilização de vesículas por tensoativos (Edwards e Almgren, 1990) mencionado no capítulo 2 deste trabalho.

A absorbância normalizada dos lipossomas convencionais sem CPA alcançou um máximo de 2,5 a 75% de tensoativo, ao passo que vesículas convencionais com CPA apresentaram um aumento máximo de 12 a 45% de tensoativo. Este valor manteve-se constante até 60% de  $C_{12}E_5$ , e a partir deste ponto, as absorbâncias diminuíram com a adição do tensoativo.

O tipo de interação obtido para lipossomas “stealth” difere do observado para lipossomas convencionais que, quando contêm CPA encapsulada são bastante instáveis. As variações em absorbância foram bem menores para lipossomas contendo PEG, indicando a maior estabilidade destas

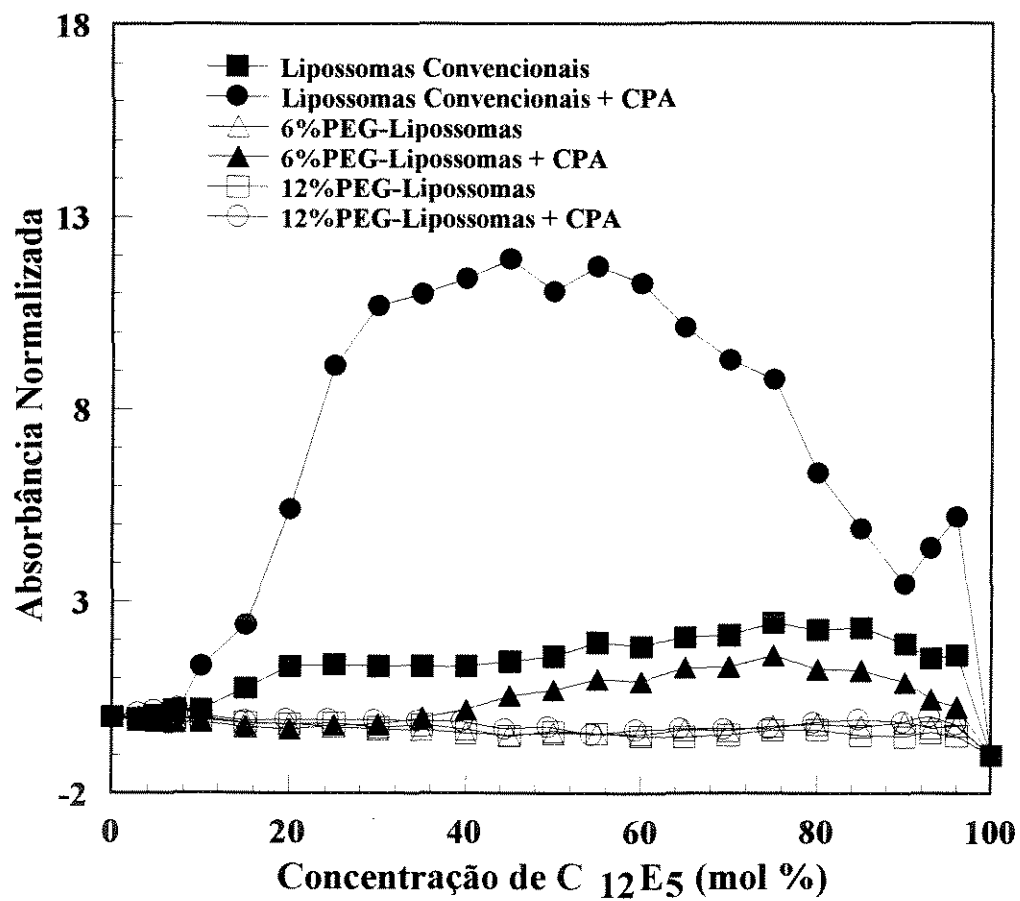


Figura 24 - Estabilidade de lipossomas convencionais e “stealth” em soluções do tensoativo não-iônico C<sub>12</sub>E<sub>5</sub>. Condições de incubação: concentração inicial em lipídios de 1 mM; 25°C; 2 horas.

vesículas. Lipossomas contendo 12%PEG e CPA comportaram-se de maneira semelhante aos lipossomas “stealth” sem o composto de boro, possivelmente devido à baixa concentração de CPA na amostra e ao eficiente recobrimento protetor fornecido pelas cadeias de polietileno glicol. Lipossomas contendo 6%PEG sem CPA comportaram-se similarmente aos lipossomas contendo 12%PEG, no entanto a adição de CPA a estes lipossomas fez com que o seu comportamento se assemelhasse ao de lipossomas convencionais não contendo CPA encapsulada, embora maiores concentrações de  $C_{12}E_5$  sejam necessárias para alterar as absorvâncias. Portanto, a estabilidade destas vesículas é maior que a dos lipossomas convencionais com CPA.

A partir desses resultados, supõe-se que durante a encapsulação a CPA localize-se preferencialmente na membrana lipídica. A solubilidade da CPA na membrana lipídica é possivelmente afetada por restrições geométricas, devido ao espaço disponível limitado e à orientação fixa dos constituintes da bicamada. Se toda a CPA estivesse acumulada na região aquosa interna da vesícula, haveria apenas a liberação do composto encapsulado de acordo com o aumento da concentração de tensoativo. Essa liberação não implicaria em aumentos de absorvância no comprimento de onda monitorado durante o ensaio pois a CPA não apresenta absorção de luz mensurável a 340 nm, nas concentrações utilizadas no experimento. Essa consideração é também confirmada quando se avalia dados da incubação de CPA com vesículas em diferentes razões molares iniciais CPA/lipídio. Em todos os casos, obtém-se um encapsulamento máximo bem definido. Estes máximos podem resultar do acomodamento de um número máximo de moléculas de CPA dentro da bicamada lipídica, dependendo tanto da composição em lipídios como da presença das cadeias externas de PEG, que tenderiam a reduzir a permeabilidade da membrana à CPA por impedimento estérico. A avaliação dos resultados da determinação dos coeficientes de partição da CPA no



sistema 1-octanol/solução tampão a pH 7,5, que resultou em um acúmulo praticamente total da CPA na fase orgânica, também confirma a localização preferencial da CPA na membrana lipídica.

Pode-se então sugerir que quando lipossomas “stealth” e convencionais contendo CPA são expostos ao tensoativo  $C_{12}E_5$ , o composto de boro provavelmente desorganiza o padrão de empacotamento dos lipídios na bicamada.

Possivelmente, a baixas concentrações de  $C_{12}E_5$  as moléculas de tensoativo não conseguiriam penetrar significativamente na bicamada. A concentrações suficientemente altas, o acomodamento de algumas poucas moléculas de  $C_{12}E_5$  já levaria a uma grande desestabilização da bicamada, tanto pelo aparecimento de buracos na membrana lipossômica, abrindo ainda mais espaço para a entrada de novas moléculas de tensoativo, como pela agregação dos lipossomas. Este processo de agregação poderia ocorrer tanto com os lipossomas convencionais como com os “stealth”.

#### ***4.1.5. Estabilidade de Lipossomas Convencionais Estocados a 5°C***

O estudo da estabilidade de sistemas de lipossomas contendo compostos terapêuticos encapsulados é de grande importância do ponto de vista de estocagem do produto para aplicações farmacológicas. Os lipossomas podem ser instáveis devido a fatores físicos ou químicos. A instabilidade física está normalmente associada à liberação indesejada da droga, enquanto a integridade química relaciona-se à degradação da droga ou dos lipídios. Os resultados obtidos nos testes de solubilização de lipossomas convencionais contendo CPA com o tensoativo  $C_{12}E_5$  indicaram uma certa instabilidade do sistema, a qual pode ser examinada pelo monitoramento de possíveis modificações estruturais e da retenção de CPA encapsulada com o tempo de

estocagem. Estas variáveis podem ser avaliadas, respectivamente, pela medida dos diâmetros médios das vesículas e das razões molares finais droga/lipídio após a remoção da droga liberada dos lipossomas por cromatografia de permeação em gel.

Os resultados obtidos no estudo da estabilidade de lipossomas contendo CPA encapsulada a uma razão inicial CPA/lipídio de 0,56 podem ser avaliados nas Figuras 25 e 26. Os lipossomas foram estocados a 5°C, suspensos na solução tampão em que foram preparados.

Pode-se observar que ocorreram aumentos nos diâmetros de vesícula de 69,4 para 108,9 nm, o que sugere que houve re-estuturação ou talvez agregação dos lipossomas com o passar do tempo.

As razões molares CPA/lipídio apresentaram um comportamento oscilante, onde nota-se que praticamente 60% da CPA é liberada dos lipossomas na primeiras 24 horas de estocagem. A partir do segundo dia ocorreu uma re-associação do composto de boro liberado com os lipossomas, o que levou a um aumento da razão CPA/lipídio até níveis próximos ao obtido imediatamente após o encapsulamento. A partir do décimo sexto dia, a concentração de CPA associada aos lipossomas caiu novamente e apenas cerca de 50% da droga permaneceu encapsulada.

Tais resultados indicam que a concentração final de CPA nos lipossomas imediatamente após a encapsulação é provavelmente muito elevada. Se grande parte da CPA se particiona entre a membrana e o meio aquoso interno, o número de moléculas de lipídio presentes na bicamada pode não ser suficiente para manter a estrutura do lipossomas, havendo a necessidade de re-estuturação das vesículas ao longo do tempo, com a possível expulsão de algumas moléculas de CPA.

Assim, se toda a CPA estivesse localizada na membrana lipídica, cerca de 17% desta estaria ocupada pela CPA, o que poderia ser suficiente para

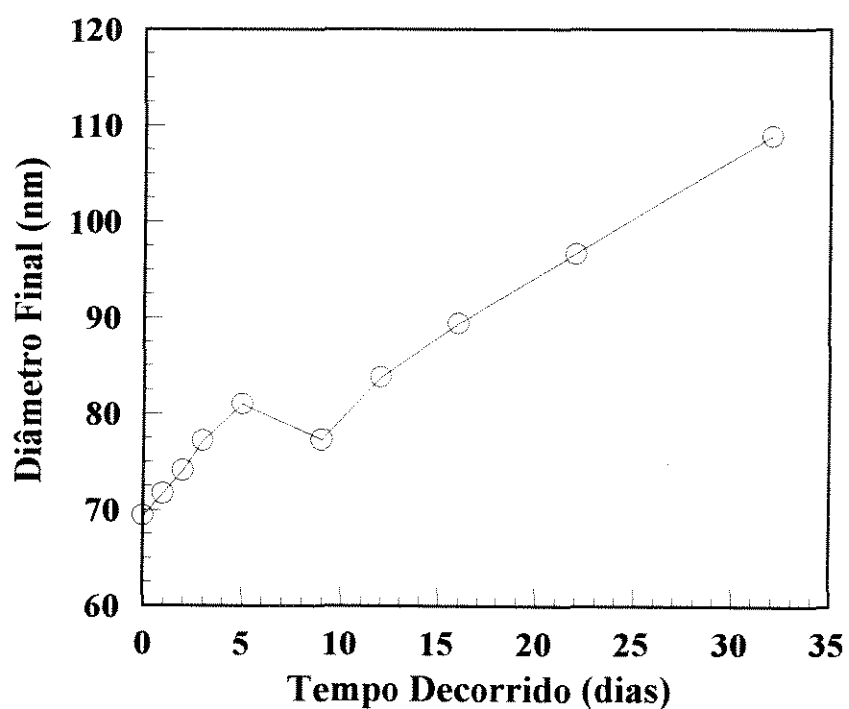


Figura 25 - Variações no diâmetro hidrodinâmico de lipossomas convencionais contendo uma razão molar final CPA/lipídio de 0,17 e uma concentração de lipídios de 1,04 mM com o tempo de estocagem a 5°C. Os lipossomas foram incubados a uma razão molar inicial CPA/lipídio de 0,56, por 30 minutos a 50°C.

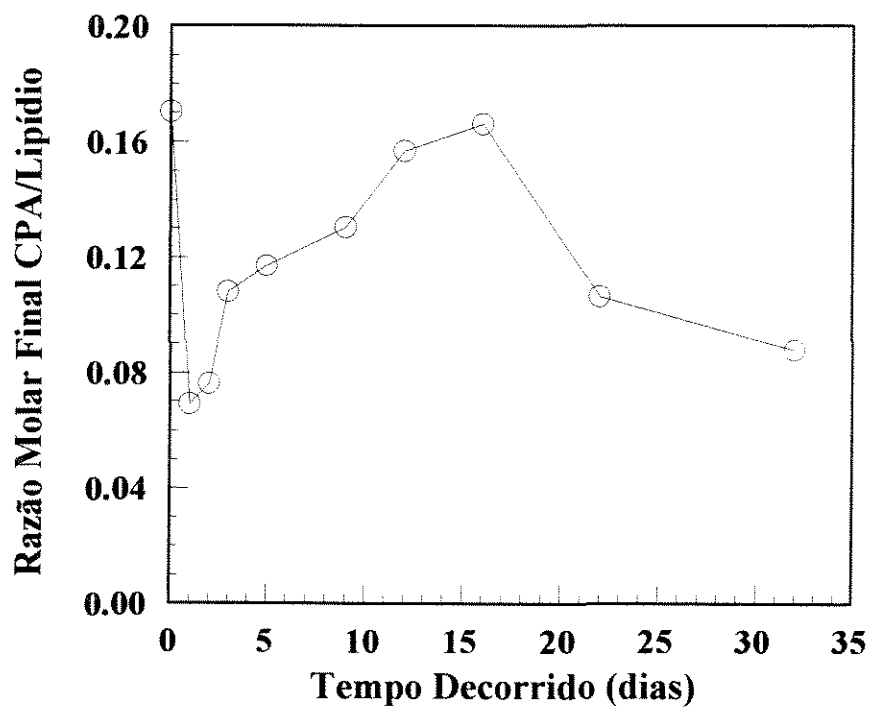


Figura 26 - Variações na razão molar final CPA/lipídio após a remoção da CPA liberada com o tempo de estocagem a 5°C para lipossomas convencionais contendo inicialmente uma razão molar CPA/lipídio de 0,17 e uma concentração de lipídios de 1,04 mM. Os lipossomas foram incubados com a CPA a uma razão molar inicial CPA/lipídio de 0,56, por 30 minutos a 50°C.

desestruturá-la. A elevada liberação do composto de boro sugere que a redução do número de moléculas de CPA inicialmente encapsuladas e o aumento do número de moléculas de lipídio por vesícula pode diminuir ou mesmo eliminar este problema.

A redução do número de moléculas de CPA encapsuladas inicialmente pode ser obtida utilizando-se razões molares iniciais droga/lipídio menores que 0,17, enquanto que o número de moléculas de lipídio por vesícula pode ser aumentado pelo aumento do diâmetro dos lipossomas.

A estocagem de lipossomas incubados a razões molares iniciais CPA/lipídio iguais a 0,05 e a 0,11 por um mês a 5°C resultou em um aumento no diâmetro de 6 nm para o primeiro caso e na diminuição de 1 nm para o segundo. Tais variações são pouco significativas quando comparadas com o sistema incubado a uma razão molar inicial de 0,56, onde foi observado um aumento de 39,5 nm após 32 dias de estocagem nas mesmas condições, indicando de fato maior estabilidade estrutural para sistemas incubados a menores razões molares iniciais.

#### *4.1.6. Encapsulamento Ativo de CPA em Lipossomas Convencionais Extrudados*

Como mencionado anteriormente, o uso de vesículas com diâmetros maiores que 60 a 70 nm pode ser vantajoso na incorporação da CPA do ponto de vista da estabilidade. Os resultados da encapsulação ativa de CPA em lipossomas extrudados com diâmetros iniciais de 101 nm podem ser observados na Figuras 27 e 28. Neste conjunto de experimentos, as variações de pH no cerne aquoso da vesícula foram também monitoradas imediatamente após a remoção da CPA não encapsulada e os resultados estão ilustrados na Figura 29.

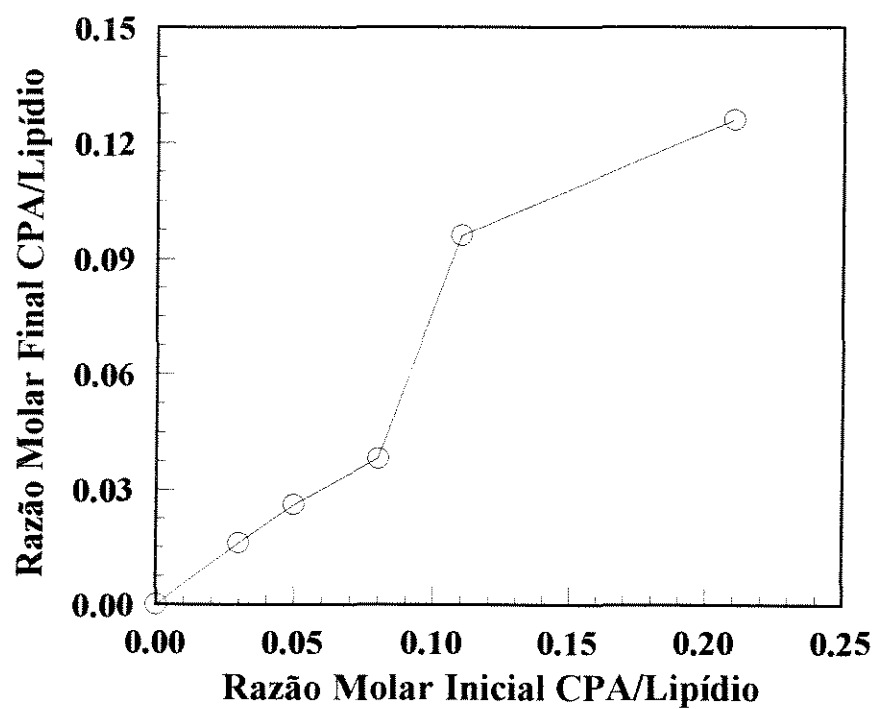


Figura 27 - Efeito da razão molar inicial CPA/lipídio na razão molar final CPA/lipídio para vesículas convencionais obtidas por extrusão e incubadas a 50°C, por 30 minutos, em presença da CPA.

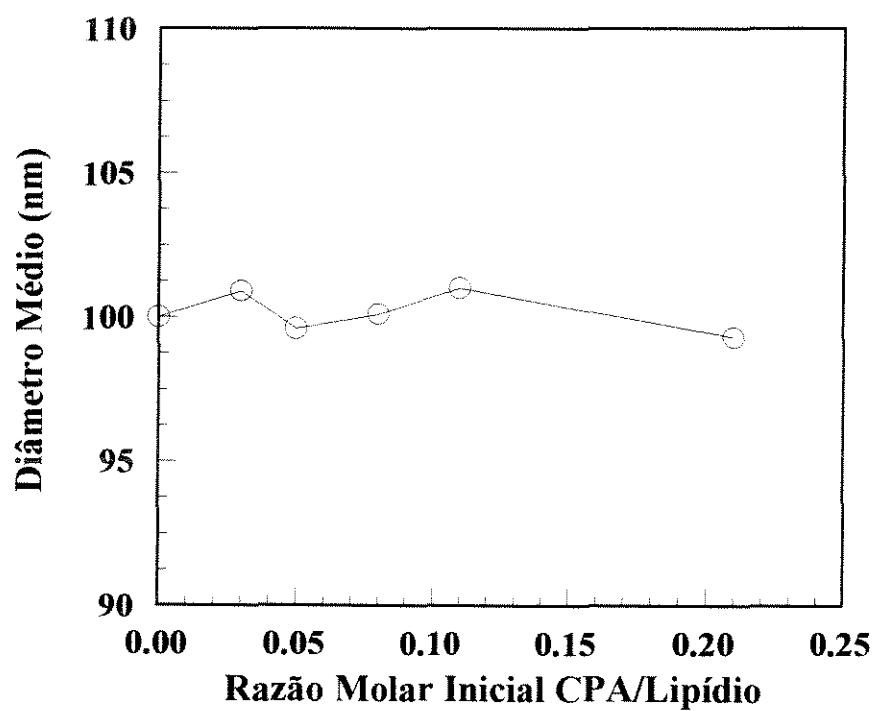


Figura 28 - Efeito da razão molar inicial CPA/lipídio no diâmetro hidrodinâmico final de vesículas convencionais obtidas por extrusão e incubadas a 50°C, por 30 minutos em presença de CPA.

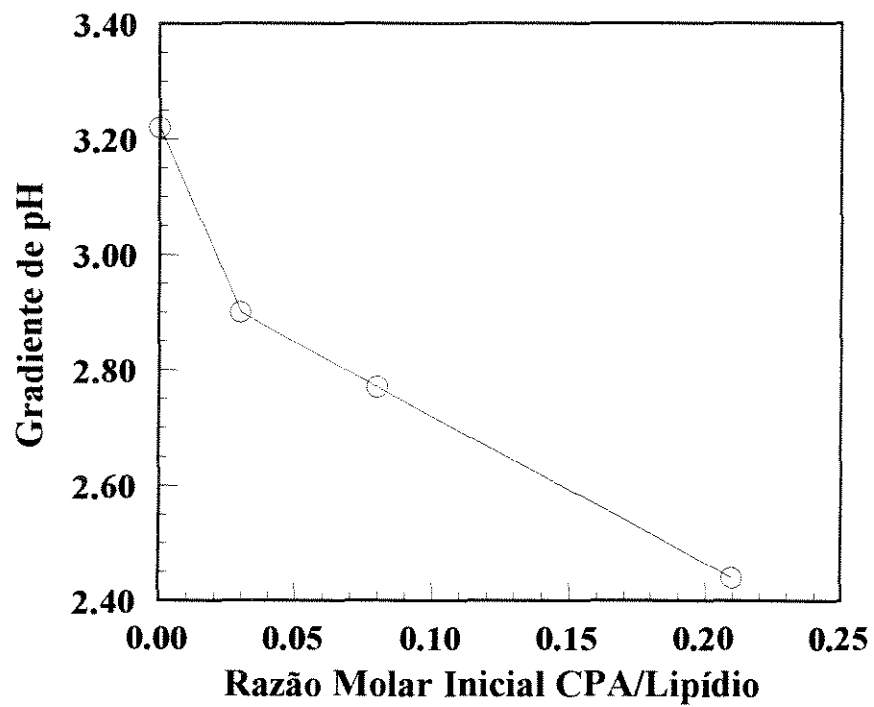


Figura 29 - Efeito da razão molar inicial CPA/lipídio no gradiente de pH de vesículas convencionais obtidas por extrusão e incubadas a 50°C, por 30 minutos, em presença de CPA.



Assim como para lipossomas sonicados apresentando diâmetros finais de cerca de 70 nm, as razões molares finais CPA/lipídio aumentaram com o aumento das razões molares iniciais para lipossomas extrudados. No entanto, as eficiências de encapsulação foram menores para as vesículas extrudadas. Possivelmente, lipossomas com menores diâmetros têm uma maior tendência de acomodar moléculas de CPA, como uma maneira de aliviar a tensão originada pela maior curvatura da membrana lipídica. Nestes experimentos, os diâmetros médios de vesícula permaneceram aproximadamente constantes, devido à reduzida incorporação de CPA.

Os gradientes de pH, medidos para vesículas sem CPA como iguais a 3,22, apresentam boa concordância com o valor previamente estabelecido de 3,5 unidades. Como pode ser observado na Figura 29, após a incorporação de CPA os gradientes de pH diminuíram com o aumento das razões molares iniciais CPA/lipídio utilizadas na incubação, como consequência da remoção dos íons  $H^+$ . Esse comportamento é equivalente ao observado para a incorporação ativa de diversas aminas lipofílicas em lipossomas (Madden et al., 1990; Mayer et al., 1990).

O aumento imediato no pH interno pode ser parcialmente devido ao reprotonamento da CPA no interior da vesícula, bem como a um aumento na permeabilidade da bicamada lipídica a íons causada pela incorporação de algumas moléculas de CPA na membrana, alterando seu arranjo estrutural.

#### *4.1.7. Estabilidade de Lipossomas Extrudados Contendo CPA*

As Figuras 30 e 31 mostram os resultados da estocagem a 5°C de lipossomas obtidos por extrusão e incubados com CPA a uma razão molar inicial CPA/lipídio de 0,44:4. No período de 24 horas após a incorporação, menos que 30 % da CPA foi liberada, sendo que este valor permaneceu

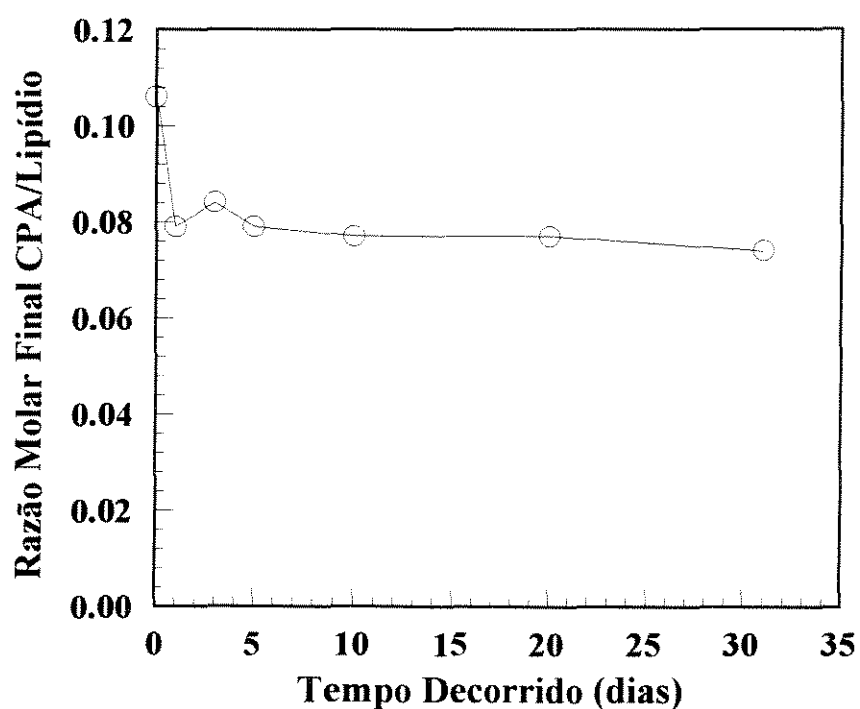


Figura 30 - Variações na razão molar final CPA/lipídio após a remoção da CPA liberada com o tempo de estocagem a 5°C para lipossomas convencionais extrudados apresentando inicialmente uma razão molar CPA/lipídio de 0,107. Os lipossomas foram incubados com a CPA a uma razão molar inicial CPA/lipídio de 0,11, por 30 minutos a 50°C.

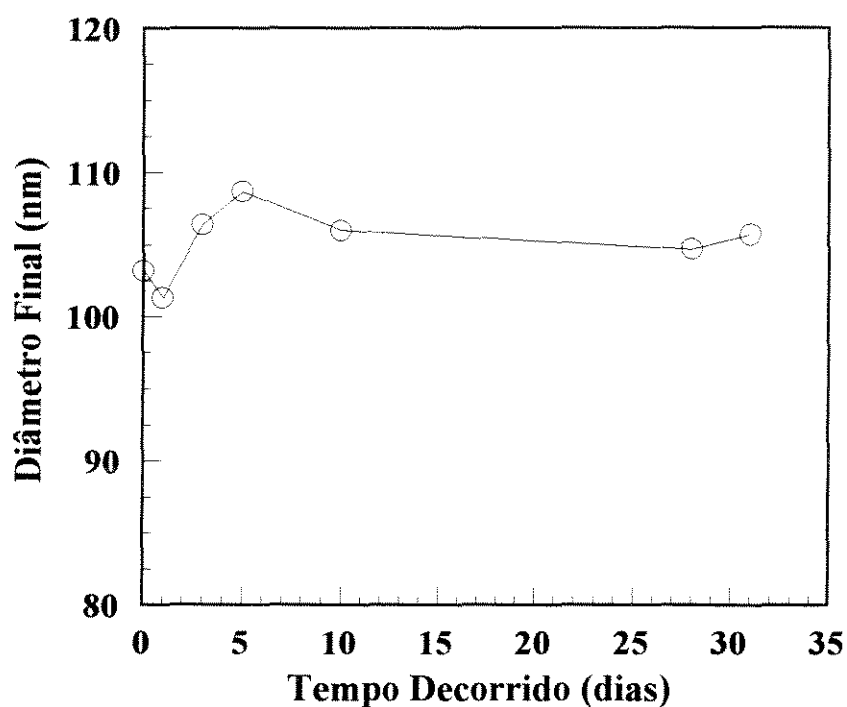


Figura 31 - Variações no diâmetro hidrodinâmico de lipossomas convencionais extrudados (contendo uma razão molar final CPA/lipídio de 0,107) com o tempo de estocagem a 5°C. Os lipossomas foram incubados a uma razão molar inicial CPA/lipídio de 0,11, por 30 minutos a 50°C.

praticamente constante ao longo de um mês. Estes resultados indicam que a retenção de gradientes de pH maiores que 2 unidades após o encapsulamento é suficiente para reduzir a liberação do composto encapsulado. O diâmetro médio das vesículas também apresentou pouca variação, sugerindo que este sistema é potencialmente mais estável que o obtido com lipossomas sonicados.

Como os lipossomas extrudados possibilitaram a retenção estável de CPA em seu interior por até 30 dias, avaliou-se se estas vesículas também apresentariam maior estabilidade em soluções contendo o tensoativo não-iônico  $C_{12}E_5$  que lipossomas sonicados. A Figura 32 ilustra os resultados obtidos, onde se utilizou, além de vesículas extrudadas encapsulando CPA, vesículas sem este composto de boro, também preparadas por extrusão e apresentando a mesma composição em lipídios. Pode-se observar que estas vesículas praticamente não foram afetadas pela presença da CPA, pois as curvas de variação de absorvância quase que se sobrepõem ao longo de toda a faixa de concentração do  $C_{12}E_5$ . Embora as variações de absorvância tenham sido um pouco maiores que as observadas para vesículas convencionais sonicadas sem o composto de boro (Figura 24), estas variações são pequenas quando comparadas às obtidas para vesículas sonicadas encapsulando CPA, indicando, mais uma vez, maior estabilidade para os lipossomas extrudados.

## **4.2. Preparação e Caracterização de Lipossomas Encapsulando Doxorrubicina**

### **4.2.1. Encapsulamento de Doxorrubicina em Lipossomas Sonicados Compostos por DSPC/DMPE/Col**

A incorporação de DOX é descrita na literatura para vesículas

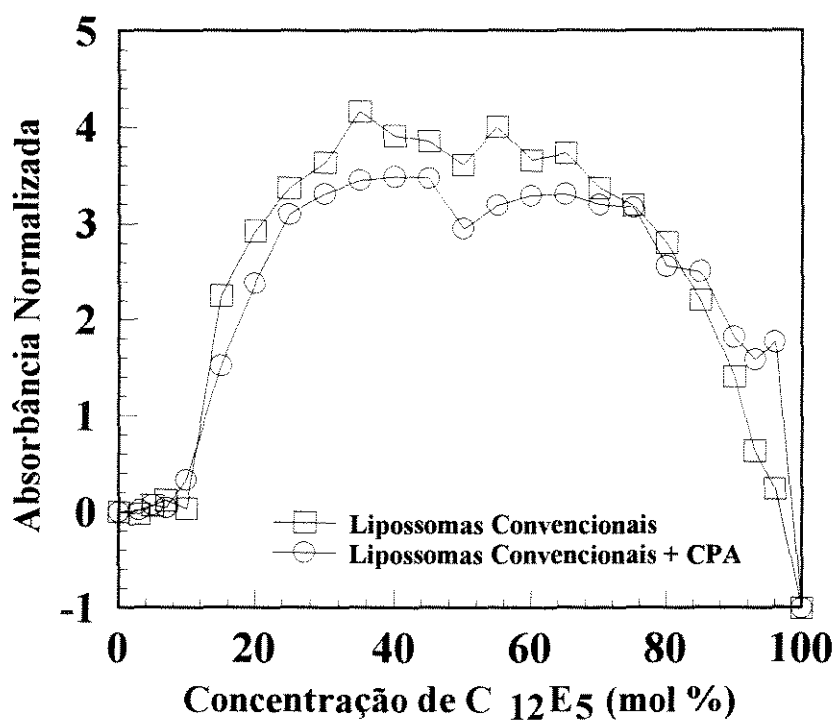


Figura 32 - Estabilidade de lipossomas convencionais extrudados em soluções do tensoativo não-iônico C<sub>12</sub>E<sub>5</sub>. Condições de incubação: concentração inicial em lipídios de 1 mM; 25°C; 2 horas.

apresentando diversas composições distintas e em diferentes condições de incubação droga/lipossomas (Mayer et al., 1986; Mayer et al. 1989; Storm et al., 1989; Goren et al., 1990; Mayer et al., 1990; Madden et al., 1990; Horowitz et al., 1992; Haran et al., 1993; Mayer et al., 1993; Vaage et al., 1994; Uyama et al., 1994). Um grande número de autores sugere o uso de técnicas de incorporação ativa para o encapsulamento eficiente deste composto. Segundo Mayer et al. (1986), pode-se encapsular DOX ativamente em vesículas de fosfatidilcolina de ovo apresentando um gradiente de pH de 2,9 unidades tanto a 20 como a 37°C, sendo que a 37°C o processo é mais rápido. A eficiência de encapsulamento pode chegar a 100 % por períodos de incubação de apenas 5 a 10 minutos a uma temperatura de 60°C, se se utilizar vesículas apresentando um gradiente de pH de 3,8 unidades (Mayer et al., 1990).

Assim, optou-se pela técnica de incorporação ativa para o encapsulamento da DOX em lipossomas. Como nos experimentos preliminares ainda não se havia estabelecido se o encapsulamento da DOX deveria ser feito antes ou após o acoplamento dos anticorpos na superfície dos lipossomas, avaliou-se o efeito da variação das condições de incubação na eficiência de incorporação da droga em lipossomas compostos por DSPC/DMPE/Col. Vesículas com esta composição podem ser facilmente convertidas a imunolipossomas através da ligação covalente dos grupamentos amina do DMPE com os resíduos OH de glicoproteínas.

A Tabela 4 ilustra os resultados obtidos para a incubação de DOX em lipossomas sonicados com diâmetro médio em torno de 70 nm a uma razão molar inicial droga/lipídio constante e igual a 0,25, utilizando várias condições de incubação distintas.

Como se pode observar, a 25°C o encapsulamento da DOX é pouco

significativo, mesmo para períodos de incubação de 30 minutos. A 37°C, no entanto, o encapsulamento passa a ser expressivo, aumentando até 80 % com a elevação do tempo de incubação. Nesta temperatura, incubações por intervalos maiores que 60 min resultaram em visível agregação dos lipossomas (resultado não incluído na Tabela 4). Assim como para as vesículas utilizadas por Mayer et al. (1990), a eficiência de encapsulação de DOX a 60°C por apenas 10 minutos foi bastante elevada, suplantando o maior valor obtido para a incubação a 37°C. Essas condições experimentais foram adotadas nos ensaios posteriores. Uma desvantagem do uso da temperatura de 60°C é que, necessariamente, a encapsulação da DOX deve preceder o acoplamento de anticorpos aos lipossomas, pois a exposição dos imunolipossomas a esta temperatura poderia causar a desnaturação das proteínas, alterando as características do anticorpo.

Tabela 4 - Efeito das condições de incubação no encapsulamento ativo de DOX em lipossomas sonicados compostos por DSPC/DMPE/Col.

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Eficiência de Encapsulação (%)
25	10	3,1
	30	3,3
37	10	14,8
	30	64,8
	60	80,0
60	10	95,0

Em geral, a incorporação ativa de aminas lipofílicas em lipossomas é também dependente da razão molar inicial droga/lipídio utilizada durante a incubação. O acúmulo do composto terapêutico nos lipossomas além de um valor crítico específico para cada sistema pode levar à diminuição da capacidade tamponante da solução presente no cerne aquoso da vesícula, provocando uma redução no gradiente de pH e uma conseqüente queda na eficiência de encapsulamento. Este fato foi verificado através de experimentos onde se variou a concentração inicial de DOX adicionada à mistura, mantendo-se a concentração de lipídios constante. Os resultados obtidos podem ser avaliados nas Figuras 33 e 34 para lipossomas apresentando diâmetros médios variando de 60 a 70 nm.

Pode-se observar que ocorreu um aumento linear da razão molar droga/lipídio final com a elevação da razão molar inicial na faixa de 0,11 a 0,6. Nessas condições, obteve-se eficiências de encapsulação superiores a 90 %. Para razões molares iniciais superiores a 0,6, ocorreu um decréscimo significativo na eficiência de encapsulação, uma vez que se alcançou um patamar nas razões molares finais obtidas.

Este patamar indicou a obtenção de uma incorporação máxima nestas vesículas, provavelmente decorrente da redução do número de prótons disponíveis no cerne aquoso da vesícula, causada pela reprotonação das moléculas de DOX que se acumularam no interior do lipossoma. A incorporação máxima de DOX nestes lipossomas foi estimada em cerca de 32.000 moléculas de droga por vesícula, como ilustrado na Figura 35.

O comportamento é comparável ao observado por Mayer et al. (1990) para o encapsulamento da mesma droga em lipossomas, embora os valores provenientes dos experimentos aqui descritos sejam um pouco menores. Os autores mencionados relatam a obtenção de uma razão molar droga/lipídio máxima igual a 1. Este fato pode ser facilmente explicado pela diferença nos



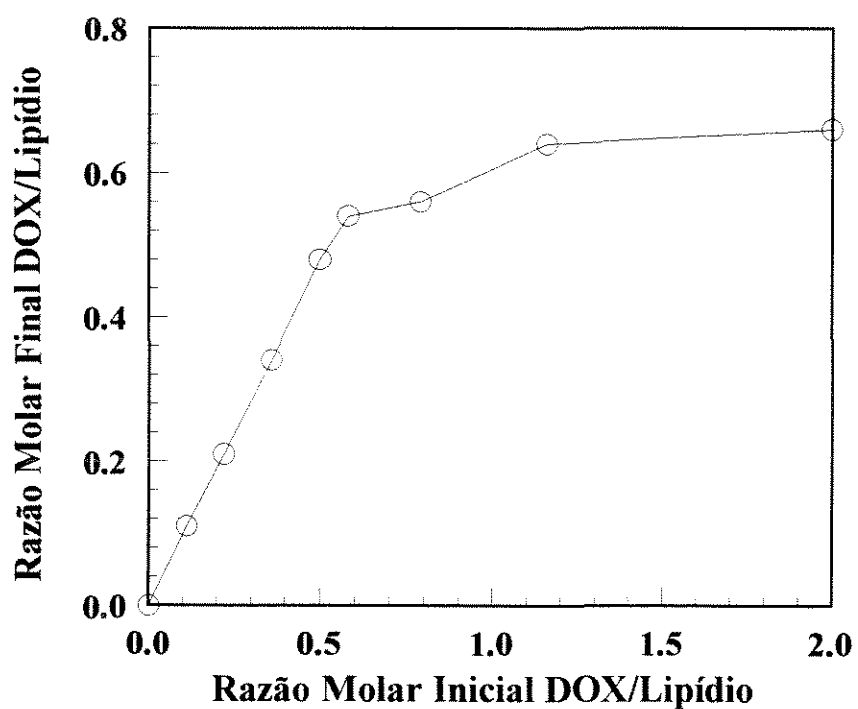


Figura 33 - Efeito da razão molar inicial DOX/lipídio na razão molar final DOX/lipídio para vesículas sonicadas compostas de DSPC/DMPE/Col incubadas a 60°C, por 10 minutos, em presença da droga.

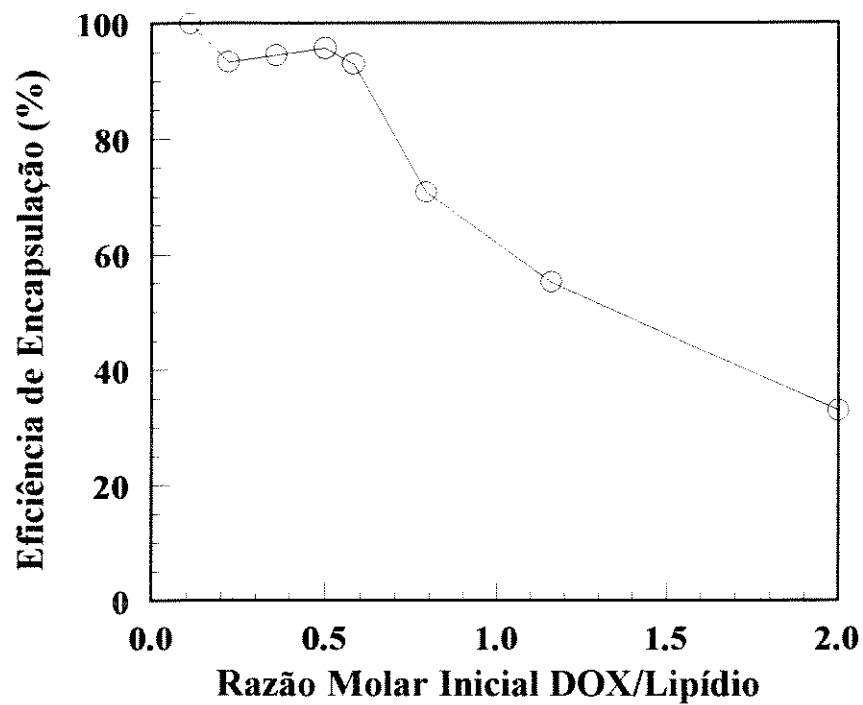


Figura 34 - Efeito da razão molar inicial DOX/lipídio na eficiência de encapsulação de DOX em vesículas sonificadas compostas de DSPC/DMPE/Col e incubadas a 60°C, por 10 minutos, em presença da droga.

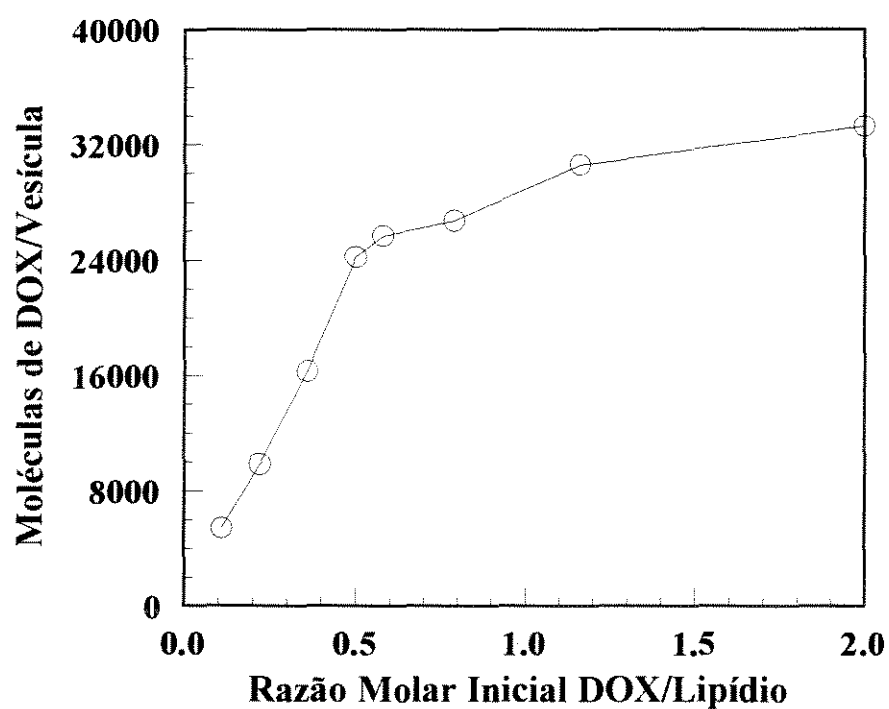


Figura 35 - Efeito da razão molar inicial DOX/lipídio no número de moléculas de DOX encapsuladas por vesícula. Lipossomas sonicados compostos de DSPC/DMPE/Col foram incubados com a droga por 10 minutos a 60°C.

tamanhos de vesícula. Mayer et al. (1990) utilizaram vesículas com diâmetro médio de 175 nm, o que resulta em maior volume e melhor capacidade tamponante no interior dos lipossomas. Além disto, a composição das vesículas utilizadas também apresenta diferenças (fosfatidilcolina de ovo/colesterol), o que pode ter acarretado em alterações nas propriedades da membrana lipídica, principalmente no tocante à permeabilidade.

#### ***4.2.2. Estabilidade à Estocagem de Lipossomas Sonicados Compostos por DSPC/DMPE/Col Encapsulando Doxorrubicina***

Um aspecto importante da liberação de drogas mediada por lipossomas é a capacidade de se manter o composto terapêutico no interior da vesícula até que a célula-alvo seja atingida. O uso da técnica de incorporação ativa auxilia na manutenção do encapsulamento, mas não previne a eventual liberação não controlada da droga. A liberação não intencional da droga encapsulada pode ocorrer tanto durante a estocagem como após o contato das vesículas com o ambiente fisiológico.

O comportamento de vesículas de DSPC/DMPE/Col encapsulando DOX foi avaliado, então, a duas temperaturas distintas por 30 dias. O estudo da estabilidade durante a estocagem foi conduzido a 4°C, enquanto que o efeito da exposição dos lipossomas a temperaturas fisiológicas foi examinado a 37°C. As razões molares iniciais DOX/lipídio foram de 0,32 para a amostra estocada a 4°C e de 0,55 para a amostra submetida a 37°C. Utilizando-se a técnica de Mayer et al. (1990) para a determinação da concentração de DOX externa aos lipossomas, descrita em detalhes na seção 3.2.8 do capítulo de Materiais e Métodos, avaliou-se periodicamente alíquotas de ambas as amostras. Os resultados estão ilustrados na Figura 36, em termos do percentual de droga liberada.

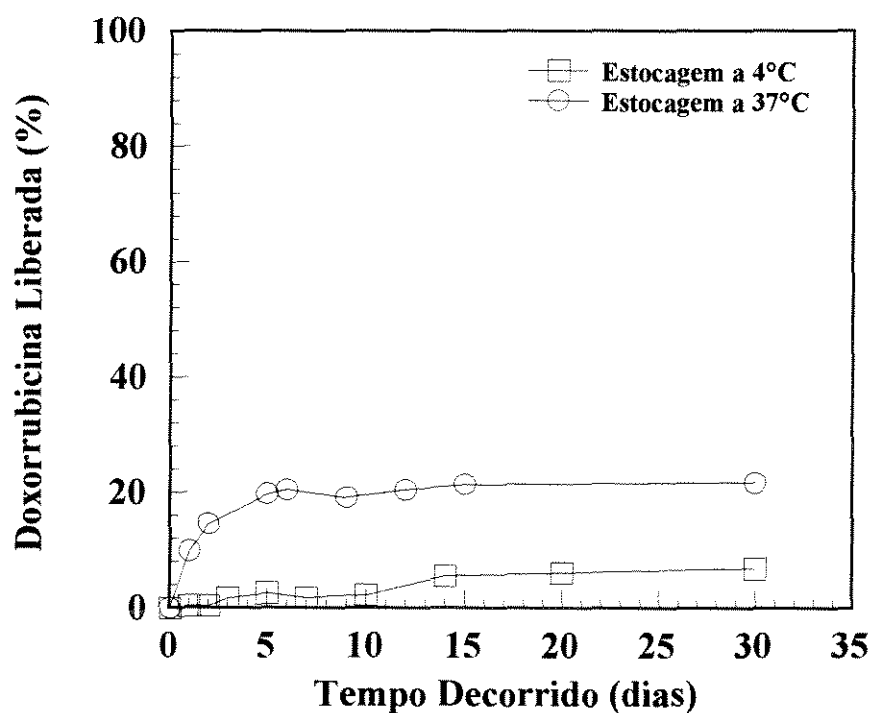


Figura 36 - Efeito da temperatura e do tempo de estocagem na estabilidade de vesículas sonicadas de DSPC/DMPE/Col contendo doxorrubicina. Os lipossomas foram incubados com a DOX a 60°C, por 10 minutos.

Pode-se observar que ao longo de um mês a 4°C ocorreu uma perda de menos de 10 % do total da droga encapsulada, enquanto que a temperatura de 37°C resultou na liberação de até 20 % da DOX incorporada. A estocagem a 4°C por mais 30 dias (em um total de 2 meses) resultou na liberação de apenas 11 % da droga originalmente encapsulada, indicando que esta temperatura propiciaria uma estocagem considerada como satisfatória. Na temperatura mais elevada, a maior parte da liberação ocorreu nos cinco primeiros dias após a encapsulação, enquanto a 4°C este processo foi bem mais lento, levando cerca de 15 dias. Esta diferença nas taxas de liberação pode ter sido causada por um aumento na permeabilidade da membrana do lipossoma com o aumento da temperatura. Outro motivo provável seria a maior razão molar inicial droga/lipídio das vesículas estocadas a 37°C. Segundo Mayer et al. (1990), com o encapsulamento de concentrações elevadas de DOX, ocorre uma conseqüente diminuição no gradiente de pH, resultando no aumento da concentração interna de droga na forma neutra (não protonada), à qual a membrana lipídica é mais permeável.

#### *4.2.3. Encapsulamento de Doxorrubicina em Lipossomas Sonicados Compostos por DPPC/Col/MPB-PE*

Variações no tipo e proporção de lipídios utilizados no preparo de lipossomas podem afetar variáveis como a taxa de encapsulamento de um composto de interesse, a concentração máxima deste composto nos lipossomas e o pH interno das vesículas.

Lipossomas compostos por DPPC/Col/MPB-PE podem ser utilizados para se obter uma ligação covalente bastante estável entre os resíduos maleimida dos lipossomas e os grupamentos tiol de anticorpos (Hashimoto et

al., 1983; Martin e Papahadjopoulos, 1982). Entretanto, a presença de MPB-PE pode interferir na incorporação ativa de DOX, diminuindo a taxa de encapsulação (Allen et al., 1995). Este fato deve-se tanto ao caráter hidrofóbico do grupo fenilbutirato do MPB-PE quanto à carga resultante negativa deste lipídio. Ambos os motivos tenderiam a retardar o encapsulamento, por possibilitarem interações da DOX com o lipídio, impedindo o acúmulo deste composto no interior das vesículas.

Este comportamento foi avaliado experimentalmente utilizando-se lipossomas contendo percentuais molares de MPB-PE 1 a 5,2 %. A adição de DOX a lipossomas sonicados com 5,2 % de MBP-PE conduziu à imediata agregação e precipitação das vesículas incubadas a 60°C, com a formação de flocos visíveis a olho nu. A incubação de DOX a 60°C por períodos de até 30 minutos com lipossomas sonicados contendo 2,5 % em MPB-PE não resultou na formação visível de flocos, mas em agregados de menores dimensões que ficaram retidos no topo da coluna de dessalinização utilizada para a remoção da droga não encapsulada. Neste caso, recuperou-se apenas cerca de 35 % dos lipossomas inicialmente injetados na coluna.

O uso de vesículas sonicadas contendo apenas 1 % em MPB-PE resultou no encapsulamento de DOX sem a associação de processos agregativos. Entretanto, a eficiência de encapsulação obtida para estas vesículas (13%), incubadas a uma razão molar inicial DOX/lipídio de 1,6, foi bem menor que o valor normalmente observado para vesículas sonicadas compostas por DSPC/DMPE/Col (em torno de 40%) incubadas com DOX na mesma razão molar inicial, mesmo extendendo-se os períodos de incubação por até 30 minutos. Os lipossomas com 1 % de MPB-PE apresentaram uma razão molar final máxima de 0,22, a qual é quase três vezes menor que a obtida para os lipossomas contendo DSPC/DMPE/Col (em torno de 0,6).

Esta observação experimental sugeriu a utilização de lipossomas com maiores diâmetros, capazes de incorporar um maior número de moléculas de droga por vesícula. Além disto, lipossomas com maiores diâmetros levariam a um maior número de MBP-PE por vesícula disponíveis para a ligação com anticorpos, possibilitando a ligação de um maior número de anticorpos por lipossoma. O uso de tempos de incubação mais longos poderia também conduzir a encapsulamentos mais eficientes da droga nos lipossomas.

#### ***4.2.4. Encapsulamento de Doxorrubicina em Lipossomas Extrudados Compostos por DPPC/Col/MPB-PE***

Seguindo as indicações dos experimentos descritos no item anterior, avaliou-se o uso de lipossomas extrudados com diâmetros em torno de 100 nm e de tempos de incubação mais longos. Para tal, vesículas extrudadas contendo 1 % de MPB-PE foram incubadas com DOX a uma razão molar inicial droga/lipídio de 1,6. O encapsulamento resultou em uma razão molar final de 0,5, ou seja, duas vezes maior que o valor obtido para vesículas sonicadas contendo 1 % de MPB-PE.

A fim de se assegurar que o encapsulamento de DOX nas vesículas extrudadas pudesse ser comparável ao obtido para vesículas sonicadas de DSPC/DMPE/Col, avaliou-se o efeito do aumento do tempo de incubação DOX/lipossomas de 10 para 30 minutos, a uma razão molar inicial de 0,81. A incubação mais longa resultou em um aumento na eficiência de encapsulação de 49 para 58 %, o que implicou em cerca de 20 % a mais de moléculas de DOX encapsuladas por vesícula. Desta forma, tempos de incubação de 30 minutos foram adotados nos experimentos subseqüentes, onde se avaliou o efeito da razão molar inicial droga/lipídio na eficiência de encapsulação da DOX em lipossomas extrudados. Os resultados podem ser observados nas



Figuras 37, 38 e 39.

As razões molares droga/lipídio finais e as eficiências de encapsulação foram comparáveis às obtidas para vesículas de DSPC/DMPE/Col sonicadas. Entretanto, o número máximo de moléculas associadas por lipossoma foi o dobro, uma vez que o volume aquoso interno das vesículas extrudadas é cerca de 3,7 vezes maior que o dos lipossomas sonicados, assumindo-se que a espessura da bicamada lipídica seja de cerca de 40 Å para ambos os casos.

Estes lipossomas apresentaram elevada estabilidade de estocagem a 4°C, perdendo, no período de um mês, menos que 5 % da droga originalmente encapsulada.

#### *4.2.5. Acoplamento de Anticorpos do Tipo IgG a Lipossomas*

Em testes preliminares, utilizou-se IgG2a extraída de camundongos para a avaliação da eficiência de acoplamento de imunoglobulinas G a lipossomas compostos por DSPC/DMPE/Col pela técnica do periodato.

A Tabela 5 mostra os resultados obtidos para lipossomas não encapsulando DOX anteriormente ao acoplamento, bem como para lipossomas contendo esta droga. Pode-se observar que o número de anticorpos ligados por lipossoma foi bastante reduzido em todos os casos, não ultrapassando duas moléculas por vesícula. Entretanto, aumentos nas razões molares iniciais IgG/lipídio conduziram a um aumento no número de anticorpos ligados por vesícula. A presença de DOX nos lipossomas aparentemente reduziu ainda mais o número de anticorpos ligados.

O monitoramento da concentração de DOX nos lipossomas mostrou que a droga encapsulada permaneceu no interior das vesículas, indicando que a presença dos reagentes não causou um aumento na permeabilidade da membrana lipídica à DOX. Por outro lado, a incubação de lipossomas

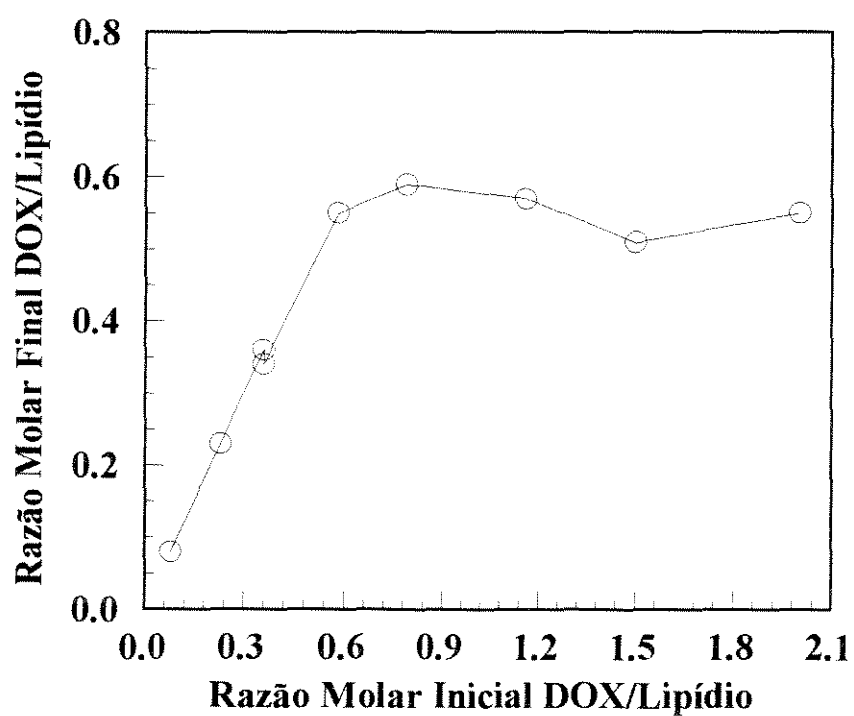


Figura 37 - Efeito da razão molar inicial DOX/lipídio na razão molar final droga/lipídio em vesículas extrudadas compostas de DPPC/Col/MPB-PE e incubadas a 60°C, por 30 minutos, em presença da droga.

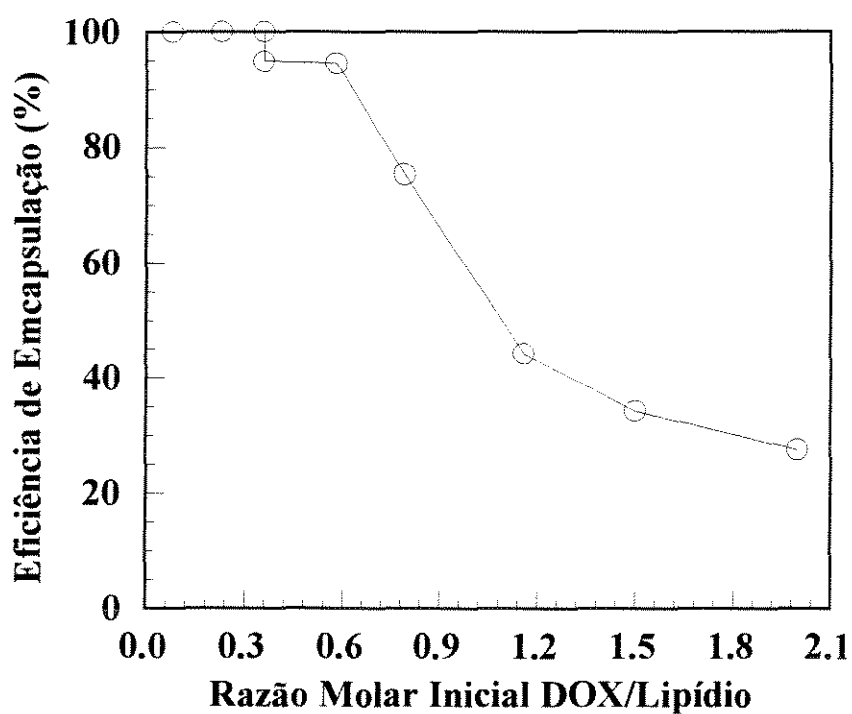


Figura 38 - Efeito da razão molar inicial DOX/lipídio na eficiência de encapsulação de DOX em vesículas extrudadas compostas de DPPC/Col/MPB-PE e incubadas a 60°C, por 30 minutos, em presença da droga.

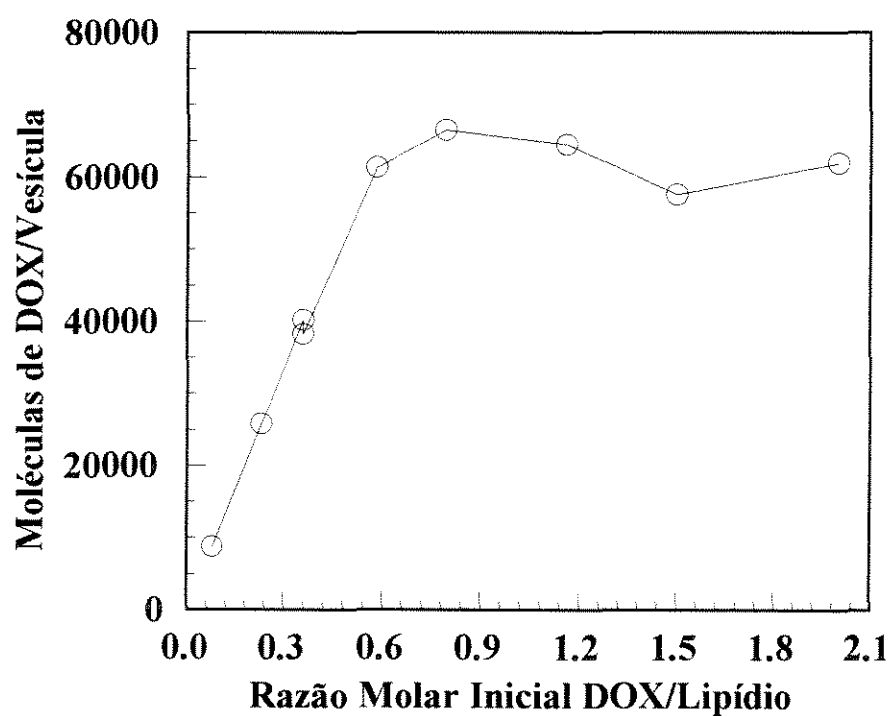


Figura 39 - Efeito da razão molar inicial DOX/lipídio no número de moléculas de DOX encapsuladas por vesícula. Lipossomas sonicados compostos de DPPC/Col/MPB-PE foram incubados com a droga por 30 minutos a 60°C.

previamente submetidos a esse protocolo de acoplamento de anticorpos com DOX a 37°C por 30 minutos não resultou na incorporação da droga nas vesículas, sugerindo que tenha ocorrido a diminuição ou mesmo a eliminação do gradiente de pH durante a reação com o anticorpo.

Como estes ensaios não conduziram a números elevados de anticorpos associados por lipossoma, investigou-se o efeito do tipo de anticorpo utilizado e da composição em lipídios das vesículas. Para tal, utilizou-se o anticorpo caprino IgG-C em vários acoplamentos. Este mesmo anticorpo já havia sido previamente acoplado com sucesso na superfície de lipossomas por outros autores (Singh et al., 1995), quando de 10 a 20 moléculas de proteína foram covalentemente ligadas por vesícula.

Tabela 5 - Resultados do acoplamento de IgG2a de camundongo a lipossomas compostos por DSPC/DMPE/Col via periodato.

Razão Molar Inicial IgG2a/Lipídio (mmol/mol)	Diâmetro Médio das Vesículas (nm)	Número de Anticorpos Ligados por Vesícula
1	74,0	0
3	65,4	1
4	72,9	2
3*	66,7	0

\* lipossomas encapsulando DOX

Na tentativa de tornar alguns dos grupamentos reativos do lipossoma mais disponíveis para a ligação com o anticorpo, minimizando impedimentos estéricos, incluiu-se o lipídio DMPE-CAP na composição dos lipossomas. Este lipídio permite que a amina primária seja afastada da superfície do lipossoma através das cadeias espaçadoras fornecidas pelos grupos caproil. A variação na composição dos lipossomas visou também o estudo do efeito de cargas na superfície dos lipossomas, pela inclusão do fosfolipídio negativamente carregado DMPA. Finalmente, o lipídio DPPE-FITC foi incorporado a lipossomas compostos por DSPC/Col/DMPE-CAP para que se pudesse avaliar, simultaneamente ao efeito de cadeias espaçadoras, a influência da presença de cargas negativas e de grupamentos hidrofóbicos na mesma molécula de fosfolipídio. Os resultados obtidos nestes testes estão descritos na Tabela 6.

Pode-se observar que foi possível ligar um maior número de moléculas de anticorpo quando se utilizou a IgG-C em comparação com a IgG2a. Nota-se também que não houve uma tendência estabelecida de comportamento, ou seja, a presença isolada de cargas negativas ou de cadeias espaçadoras aparentemente não resultou no aumento do número de anticorpos ligados por vesícula. No entanto, aumentos nos diâmetros das vesículas resultaram em maiores números de anticorpos ligados. Isto ocorreu devido ao fato de que o aumento do diâmetro das vesículas resulta em um maior número de moléculas de lipídio por lipossoma, elevando o número de grupamentos reativos disponíveis na superfície externa da vesícula.

#### *4.2.6. Acoplamento de Anticorpos do Tipo IgM a Lipossomas*

O procedimento utilizado para a ligação de anticorpos do tipo IgM a lipossomas compostos por DPPC/Col/MPB-PE foi baseado na metodologia

descrita por Hashimoto et al. (1983), onde foi empregado o aminoácido cisteína a uma concentração final de 0,05 M para romper as ligações dissulfeto responsáveis pela ligação dos monômeros da IgM em um pentâmero. Como a cisteína é um agente redutor relativamente fraco e o tempo de incubação IgM/cisteína utilizado pelos referidos autores foi de apenas 10 minutos, foram obtidas conversões de cerca de 50 % da IgM da forma pentamérica para a monomérica. As baixas conversões obtidas implicaram na necessidade de separação dos monômeros dos pentâmeros não reduzidos por cromatografia de filtração em gel, atrasando a obtenção dos imunolipossomas em 4 a 6 horas.

Tabela 6 - Resultados do acoplamento de IgG caprina a lipossomas com diferentes composições pelo método periodato a uma razão molar inicial anticorpo/lipídio de 3 mmol/mol.

Composição dos Lipossomas	Diâmetro Médio das Vesículas (nm)	Anticorpos Ligados por Vesícula
DSPC/Col/DMPE (40:40:20 mol %)	90,8	5
DSPC/Col/DMPE/DMPA (40:40:15:5 mol %)	74,1	3
DSPC/Col/DMPE/DMPE-CAP (40:40:15:5 mol %)	83,5	2
DSPC/Col/DMPE/DMPE-CAP/DPPE-FITC (40:40:5:15 mol %)	138,4	6

Com a finalidade de se diminuir o tempo dispendido no preparo dos imunolipossomas, aumentou-se a concentração de cisteína em solução em 4 vezes, mantendo-se o mesmo tempo de redução. Para a avaliação da efetividade de redução dos pentâmeros, injetou-se amostras da proteína controle (IgM não específica) e da proteína anti-glioma (IgM H11) reduzidas de acordo com este procedimento em colunas de 94 cm x 1,5 cm recheadas com Sepharose CL-6B. Os perfis de eluição das amostras foram analisados, mostrando que, nestas condições, menos que 1 % das moléculas de IgM permaneceram na forma de pentâmeros. Este fato indicou que se podia eliminar a etapa de separação dos monômeros do processo, bastando então remover a cisteína pelo uso de uma coluna de dessalinização do tipo Econo-Pac, cujo tempo de processamento da amostra está em torno de 10 minutos.

O acoplamento dos anticorpos controle e específico reduzidos de acordo com este protocolo foi avaliado utilizando-se diversas razões molares iniciais anticorpo/lipídio. De acordo com New (1990), este tipo de reação pode levar à formação de agregados se concentrações iniciais muito elevadas tanto de proteína como de lipossomas forem utilizadas. Durante a incubação da IgM controle com os lipossomas, observou-se o aparecimento de uma pequena quantidade de material agregado apenas para razões molares iniciais IgM/lipídio (calculadas em relação à concentração do anticorpo na forma de monômero) superiores a 1 mmol/mol. Para o acoplamento do anticorpo específico H11, no entanto, a presença de agregados tornou-se significativa a razões molares IgM/lipídio bem menores, em torno de 0,3 mmol/mol. Em geral, os agregados formados no acoplamento de ambos os tipos de anticorpos tendiam a desaparecer durante a etapa de bloqueamento dos grupos maleimida com cisteína, se o número de lipossomas em suspensão fosse suficientemente reduzido. A formação destes agregados pode ser devida a ligações cruzadas covalentes estabelecidas entre lipossomas através dos anticorpos, que atuariam



como pontes, podendo também ocorrer como o resultado da redução na repulsão mútua dos lipossomas, que teriam suas superfícies parcialmente estabilizadas pela ligação de monômeros de IgM.

A fim de se prevenir a formação de agregados durante os acoplamentos utilizou-se o artifício de variar tanto a concentração inicial de proteínas como a de lipídios, de forma a se obter perfis de comportamento para faixas relativamente amplas de razão molar inicial proteína/lipídio. Assim, para o acoplamento do anticorpo controle em razões molares iniciais de até 0,775 mmol/mol, manteve-se a concentração inicial de lipídios fixa em 1,33 mM e variou-se a concentração de proteína. Para razões molares iniciais acima deste valor, manteve-se fixa a concentração inicial de IgM-C em 0,22 mM e variou-se a concentração de lipídios.

Para o acoplamento do anticorpo específico IgM-H11 a razões molares iniciais de até 0,3 mmol/mol, manteve-se a concentração de lipídios fixa e variou-se a de proteína. Para razões molares iniciais de 0,3 a 0,8 mmol/mol, variou-se apenas o número de lipossomas adicionados. Para razões molares de IgM-H11/lipídio acima de 0,8 mmol/mol, a agregação foi tão intensa que levou à precipitação quase que total do material em suspensão, impossibilitando a etapa posterior de separação por cromatografia de filtração em gel.

A Figura 40 ilustra os resultados obtidos para o acoplamento de ambos os tipos de anticorpos nas condições descritas. Pode-se observar que o uso da técnica de acoplamento via maleimida resultou em números de anticorpos ligados por vesícula bem maiores que os obtidos pelo método do periodato.

Razões molares iniciais IgM-C/lipídio de até 1,13 mmol/mol levaram a um aumento quase que linear no número de monômeros ligados por vesícula. Para maiores razões molares, obteve-se um platô, indicando a ligação máxima de 40 anticorpos por vesícula. Para a proteína específica IgM-H11 observou-se o aumento do número de monômeros ligados com o aumento da razão molar

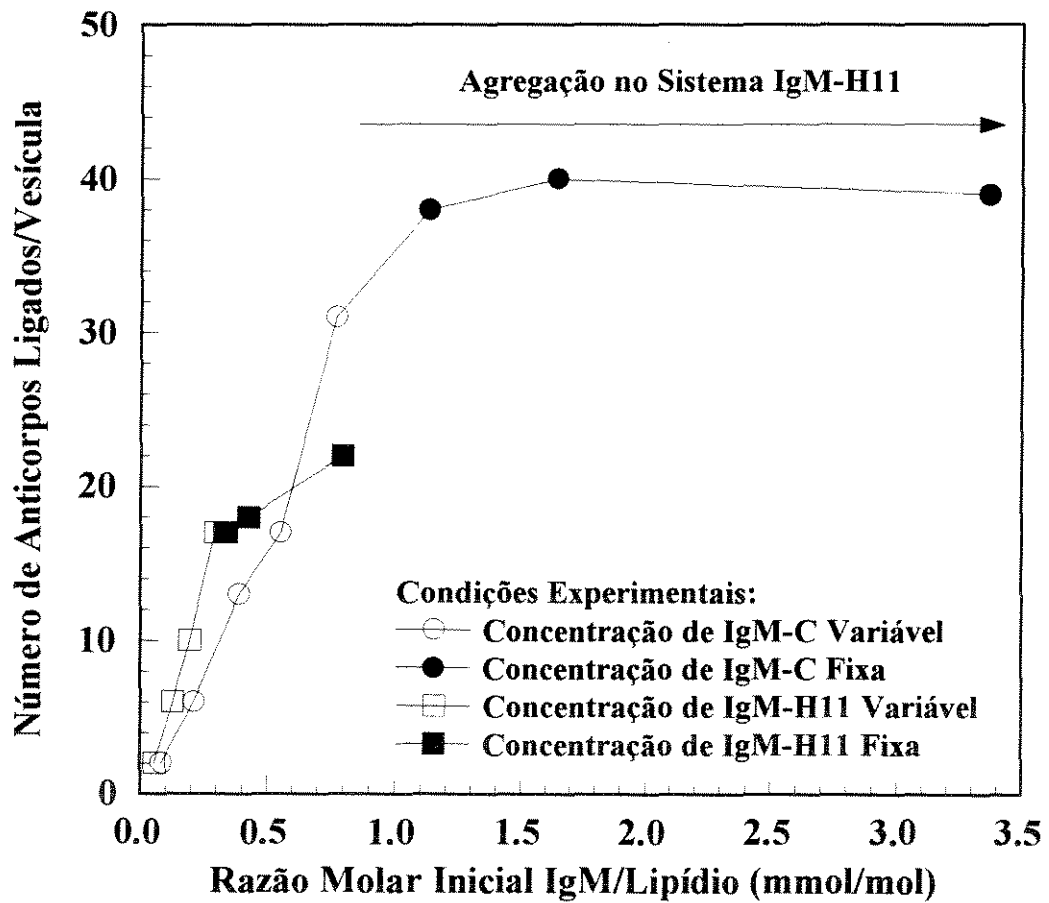


Figura 40 - Efeito da variação da razão molar inicial IgM (na forma de monômeros)/lipídio no número de moléculas de anticorpo ligadas por vesícula, para o acoplamento dos anticorpos IgM-C e IgM-H11 a lipossomas extrudados compostos por DPPC/Col/MPB-PE.

inicial anticorpo/lipídio em toda a faixa experimental testada, em um comportamento bastante similar ao obtido no acoplamento da IgM-C. No entanto, devido à pronunciada tendência de agregação observada neste sistema o número máximo de monômeros ligados por vesícula foi igual a 22.

O número teórico máximo de monômeros de IgM que poderiam ser ligados à superfície de lipossomas com diâmetro médio de 100 nm, em condições de alto empacotamento, pode ser calculado dividindo-se a área superficial do lipossoma ( $3.141.593 \text{ \AA}^2$ ) pela área da seção transversal de um monômero de IgM (estimada em  $11.310 \text{ \AA}^2$ , para monômeros com um diâmetro de cerca de 12 nm). A área máxima disponível por vesícula poderia então ser calculada multiplicando-se a área superficial total por um fator de empacotamento em torno de 0,3. Este fator de empacotamento consideraria que, se duas moléculas já estivessem em contato com a superfície do lipossoma, a probabilidade de uma terceira molécula se aproximar o suficiente para que ocorresse uma ligação química com o lipídio na superfície da vesícula seria proporcional à probabilidade de se encontrar uma área vazia disponível com diâmetro igual ou maior ao diâmetro da molécula. Esta probabilidade tenderia, então, a sofrer reduções significativas com o aumento da população de moléculas ligadas à superfície da vesícula. Desta forma, a área efetivamente disponível por vesícula poderia ser estimada em  $942.478 \text{ \AA}^2$  e o número teórico máximo de monômeros de IgM que poderiam ser acomodados nesta área seria igual a 83. O valor experimental máximo obtido para a IgM-C foi de 40 monômeros por vesícula, representando aproximadamente cerca de 50 % do valor teórico calculado. Para a IgM-H11, ligou-se um máximo de apenas 25 % do valor teórico. Estas diferenças podem ser devidas a muitos fatores, como por exemplo ao fato de que o lipídio MBP-PE não é muito estável (New, 1990). Ao longo de 9 dias, observou-se uma queda de cerca de 30 % na capacidade de acoplamento dos lipossomas.

Alterações nas condições de reação IgM/lipossomas poderiam aumentar o número de monômeros ligados. Notou-se, por exemplo, que o aumento do tempo de reação de 1 para 9 horas resultou na ligação de 30 % mais monômeros por vesícula. Outra condição que poderia ser alterada é a força iônica do meio, que poderia controlar a ocorrência de processos agregativos.

Os imunolipossomas obtidos apresentaram excelente estabilidade de estocagem a 4°C, liberando menos que 2,5 % da droga determinada imediatamente após o acoplamento dos anticorpos no intervalo de um mês.

#### **4.3. Especificidade de Interação dos Anticorpos do Tipo IgM Livres e Acoplados a Lipossomas com Células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1**

Inicialmente, utilizou-se as células SK-MG-1 cultivadas *in vitro* para a avaliação da especificidade de associação dos anticorpos não reduzidos IgM-C e IgM-H11 às células-alvo. As células pré-cultivadas (cerca de  $8 \cdot 10^5$  por placa) foram incubadas por 1 h a 37°C e 5 % CO<sub>2</sub> em presença de alíquotas de 1 ml de soluções contendo diferentes concentrações dos anticorpos radioativos suspensos em solução tampão II. Como ilustrado na Figura 41, o anticorpo IgM-H11 na forma de pentâmero associou-se às células SK-MG-1 em quantidades apreciáveis, enquanto que a IgM-C praticamente só interagiu com as células-alvo quando adicionada em quantidade superior a 30 pmoles. Estimou-se que o anticorpo específico IgM-H11 ligou-se às células-alvo cerca de 13 vezes mais que o anticorpo controle não específico. Estes resultados indicaram boa especificidade de interação do anticorpo IgM-H11 com as células SK-MG-1.

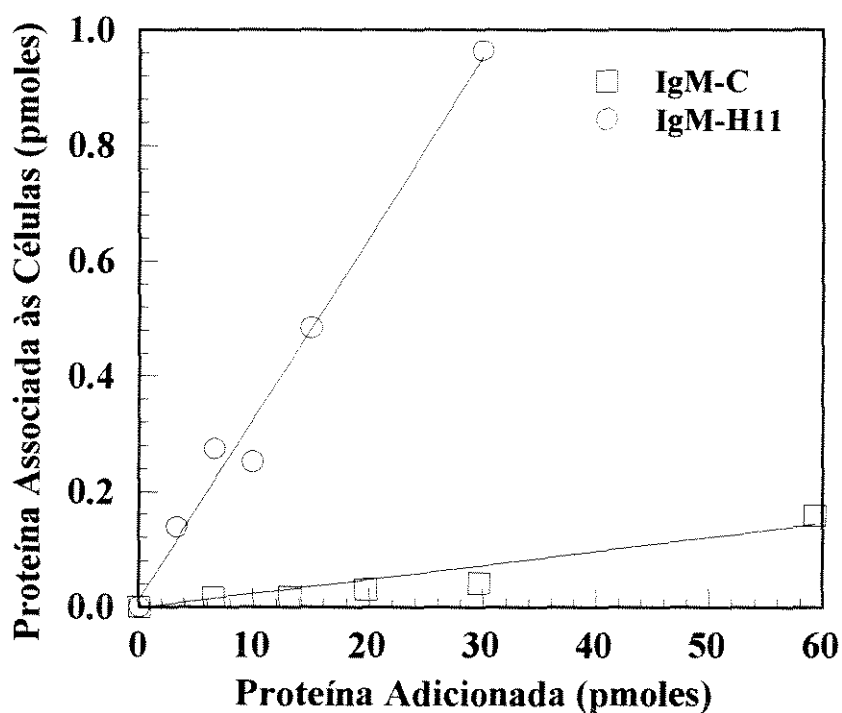


Figura 41 - Associação das proteínas IgM-H11 e IgM-C com as células de Glioblastoma Multiforme. As células ( $3,3 \cdot 10^5$ ) foram incubadas em placas com 35 mm de diâmetro por 52 horas, quando foram tratadas com 1 ml das soluções contendo os anticorpos marcados com  $^{14}\text{C}$ . Células e anticorpos foram incubados por 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  e 5 %  $\text{CO}_2$ . Os anticorpos não ligados foram removidos por lavagem e a radioatividade das células foi determinada.

A etapa posterior desses experimentos constou da avaliação da especificidade de interação com as células dos lipossomas acoplados a ambos os tipos de anticorpos. Para tal, utilizou-se imunolipossomas obtidos em condições otimizadas de acoplamento, de maneira que se tivesse aproximadamente o mesmo número de anticorpos ligados por vesícula em todas as situações (entre 17 e 19 monômeros de IgM por lipossoma). Os resultados estão ilustrados na Figura 42 para imunolipossomas contendo ou não DOX encapsulada.

Pode-se observar que a incubação das células com diferentes concentrações iniciais de imunolipossomas acoplados ao anticorpo controle resultou na ligação de um número restrito de vesículas, sendo que esse número só foi expressivo a altas concentrações iniciais de lipossomas na amostra.

Os imunolipossomas contendo IgM-H11 não apresentaram perda na capacidade de interagir com as células-alvo, indicando que o processo de acoplamento da proteína nas vesículas não afetou significativamente a especificidade do anticorpo. Para esses imunolipossomas, notou-se um aumento na quantidade de vesículas ligadas com a elevação do número inicial de lipossomas adicionados. A presença da droga encapsulada nos lipossomas não causou qualquer alteração nas características de ligação dos imunolipossomas com as células, como ilustrado pela quase repetibilidade dos resultados em ambas as condições. Assim, os resultados obtidos indicam excelentes possibilidades de uso dos imunolipossomas específicos contendo DOX encapsulada na terapia de tumores cerebrais do tipo Glioblastoma Multiforme.

Uma outra maneira de se analisar estes resultados é pela comparação do número de pentâmeros ou de imunolipossomas ligados por célula em cada um dos sistemas. Estes valores podem ser obtidos multiplicando-se o número de moles de monômeros de anticorpo ligado (estimado pela radioatividade) pelo

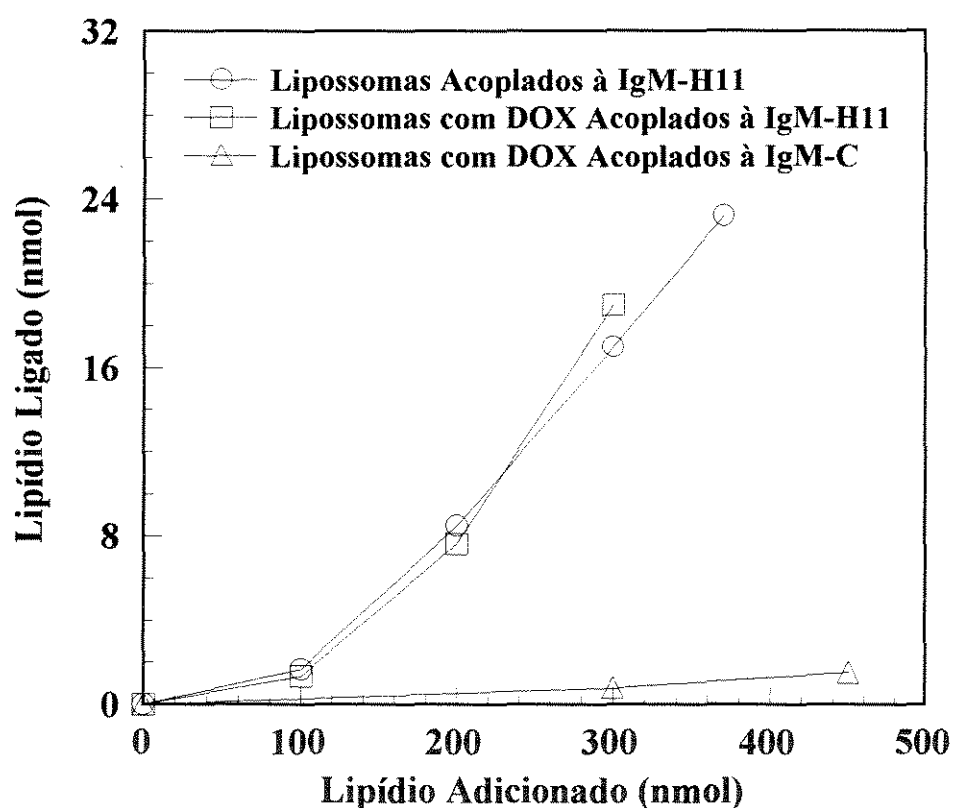


Figura 42 - Ligação de imunolipossomas a células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1. As células foram incubadas com alíquotas de 1 ml de lipossomas contendo ou não DOX encapsulada e acoplados aos anticorpos radioativos IgM-C e IgM-H11 e suspensos em solução tampão II por 60 minutos a 37°C e 5 % CO<sub>2</sub>. As vesículas não especificamente ligadas foram removidas por lavagem e a radioatividade das células foi avaliada.

número de Avogadro, dividindo-se o valor resultante pelo número de células presentes durante a incubação com a amostra e, finalmente, dividindo-se o número resultante pelo número de monômeros presente na estrutura. Os resultados comparativos obtidos para uma situação onde 30 pmoles de monômeros de anticorpo livre ou ligado à superfície das vesículas fossem incubados com  $8 \cdot 10^5$  células estão ilustrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Estimativa do número de moléculas de anticorpo livre não reduzido ou de imunolipossomas associados às células após incubação de  $8 \cdot 10^5$  células de SK-MG-1 por 1 hora na presença de 30 pmoles de anticorpo (considerado na forma de monômero).

Descrição do Sistema	Número de Anticorpos Livres ou Lipossomas Associados por Célula
IgM-C Livre	5.189
Lipossomas acoplados a IgM-C (19 monômeros por vesícula)	2.769
IgM-H11 Livre	69.688
Lipossomas acoplados a IgM-H11 (18 monômeros por vesícula)	43.011

Embora o número de estruturas ligadas por célula seja bastante elevado em todos os casos, variando de cerca de 2.700 até 70.000, pode-se observar que o número de estruturas ligadas provenientes do anticorpo controle seria



bem menor que o de estruturas resultantes da IgM-H11. Assim, cerca de 13 vezes mais anticorpo específico livre estaria ligado às células em relação ao anticorpo controle e 17 vezes mais imunolipossomas específicos se associariam em comparação com lipossomas não específicos. No entanto, em ambos os casos as proteínas livres não reduzidas ligam-se mais que as acopladas aos lipossomas. Esse fato poderia ser causado tanto por desnaturação parcial dos anticorpos no processo de acoplamento aos lipossomas quanto por impedimento estérico resultante da proximidade de lipossomas adjacentes.

Cálculos semelhantes foram feitos por Martin e Papahadjopoulos (1982) e por Schwendener et al. (1990), resultando na ligação de 5.000 e de 10.000 imunolipossomas específicos por célula-alvo, respectivamente. Embora o valor obtido para os imunolipossomas contendo o anticorpo específico IgM-H11 seja muito superior (cerca de 43.000 lipossomas/célula), uma célula pode apresentar até  $10^6$  sítios antigênicos em sua superfície (Hawthorne, 1993), tendo potencial para interagir com mais de 10.000 vesículas.

#### **4.4. Citotoxicidade *in Vitro* dos Compostos Terapêuticos Livres e Encapsulados em Lipossomas**

Como já mencionado anteriormente, os estudos *in vitro*, em geral, são relacionados a uma resposta celular direta, não necessariamente representando os possíveis efeitos farmacológicos observáveis *in vivo*, como a penetração nos tecidos, o metabolismo e a variação de concentração do agente testado na circulação sangüínea. No entanto, os testes *in vitro* são normalmente de mais fácil execução, de menor custo e mais reprodutíveis que os experimentos *in*

*vivo*, servindo como uma primeira estimativa das condições a serem utilizadas em ensaios com animais.

#### ***4.4.1. Sobrevivência de Linfócitos Humanos Expostos a Diversos Agentes***

Em um conjunto de testes preliminares, avaliou-se o efeito das soluções tampão, da BPA livre, da CPA e da DOX livres e encapsuladas em lipossomas e dos lipossomas por si só em linfócitos humanos em suspensão. Estes experimentos tiveram por objetivo ilustrar a possível toxicidade destes agentes a células humanas normais. A sobrevivência das células foi avaliada pelo método de exclusão do corante Trypan Blue, que cora de azul as células mortas.

*Exposição às Soluções Tampão* - Testou-se a toxicidade das soluções tampão I e II concentradas e diluídas por 10 vezes com meio de cultura por períodos de até 48 horas. Para a solução tampão I, observou-se a indução de morte em apenas 1 % das células após 48 h de exposição à amostra concentrada. Nos casos restantes, não foi detectada morte celular. Estes resultados indicam toxicidade em linfócitos baixa ou inexistente para ambas as amostras.

*Exposição a Compostos de Boro* - Os efeitos da toxicidade de CPA suspensa em solução tampão I (solução de maior concentração) e diluída em meio de cultura estão ilustrados na Tabela 8 para vários tempos de exposição.

Pode-se observar que a CPA apresentou baixa toxicidade para tempos de exposição de até uma hora em toda a faixa de concentrações testadas. No entanto, a exposição por 3 horas a 0,053 mM de CPA induziu a morte de 6 % das células. O percentual de células mortas aumentou com a elevação da

concentração de CPA. À medida em que se aumentou a concentração deste composto, diminuiu-se o tempo necessário para a indução da morte dos linfócitos, chegando-se a um limite máximo de 85 % de morte celular para um tempo de exposição de 2 horas. Assim, o encapsulamento deste composto em lipossomas seria indicado a fim de se proteger estas e outras células normais.

Tabela 8 - Avaliação da sobrevivência de linfócitos humanos normais tratados com soluções de CPA a diversas concentrações por tempos de exposição de 15 a 240 minutos pelo método de exclusão de Trypan Blue.

Concentração de CPA (mM)	Células Mortas (%)						
	Tempo de Exposição (min)						
	15	30	60	90	120	180	240
0,003	0	0	0	0	0	0	0
0,007	0	0	0	0	0	0	0
0,013	0	0	0	0	0	0	0
0,026	0	0	0	0	0	0	0
0,053	0	0	0	0	0	6	6
0,106	0	0	0	0	0	14	14
0,211	0	0	0	10	10	64	64
0,423	0	0	0	50	85	85	85

O mesmo tipo de teste foi feito para a BPA diluída em solução tampão I. Os resultados obtidos indicaram que concentrações de BPA variando de 0,004 a 0,4 mM e tempos de exposição de 15 minutos a 4 horas, não

induziram morte celular, sendo um indicativo da baixa toxicidade deste composto a células normais.

A exposição dos linfócitos a uma amostra a 0,20 mM de CPA encapsulada em lipossomas extrudados compostos por DSPC/DMPE/Col (concentração de lipídios igual a 2 mM) e suspensos em solução tampão I não causou morte celular por um período de até 48 h. O mesmo foi observado para lipossomas de composição idêntica não incorporando compostos terapêuticos. Assim, os lipossomas encapsulando a CPA foram capazes de proteger os linfócitos dos efeitos tóxicos deste composto de boro, preservando sua viabilidade mesmo em condições onde, de acordo com a Tabela 8, poderia-se esperar a morte de cerca de 64 % dos linfócitos após 2 horas de exposição, caso houvesse liberação espontânea da CPA encapsulada. Estes dados indicam também que os lipossomas preparados apresentam boa estabilidade.

*Exposição a Doxorrubicina* - A Tabela 9 ilustra os resultados obtidos para a exposição dos linfócitos a amostras de DOX livre e encapsulada em lipossomas extrudados compostos por DPPC/Col/MPB-PE suspensos em solução tampão II. Em testes controle, utilizou-se lipossomas de composição idêntica não incorporando esta droga. Avaliou-se também o efeito das amostras diluídas 10 vezes com meio de cultura.

A exposição das células por 24, 48 e 72 h a lipossomas com ou sem a droga praticamente não resultou em morte celular, enquanto que a DOX livre apresentou-se como mais tóxica, sendo capaz de induzir a morte de 14 e 48 % dos linfócitos, respectivamente, após 72 h de exposição. Estes resultados indicam que no período de 48 h, o efeito da droga livre nas células não é muito intenso e que os lipossomas apresentam baixa toxicidade, sendo efetivos na proteção das células dos efeitos da droga livre.

Tabela 9 - Avaliação da sobrevivência de linfócitos humanos normais tratados com amostras de lipossomas livres de drogas compostos por DPPC/Col/MPB-PE e com DOX livre e encapsulada em lipossomas por tempos de exposição de 24 a 72 h, pelo método de exclusão de Trypan Blue.

Descrição da Amostra Testada	Células Mortas (%)		
	Tempo de Exposição (h)		
	24	48	72
DOX Livre (0,5 mM)	0	7	48
DOX Livre a (0,05 mM)	0	2	14
Lipossomas (1 mM em lipídios)	0	2	0
Lipossomas (0,1 mM em lipídios)	0	0	1
Lipossomas + DOX (0,5 mM em DOX e 1 mM em lipídios)	0	1	5
Lipossomas + DOX (0,05 mM em DOX e 0,1 mM em lipídios)	0	0	0

#### 4.4.2. Caracterização Preliminar das Células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1

Quando as células são inoculadas em um frasco, as mesmas passam por uma fase lag de adaptação seguida por um período de crescimento exponencial (fase log), e finalmente entram na fase de crescimento reduzido ou nulo (fase platô), onde elas se tornam confluentes, recobrando completamente a superfície do frasco. Estas fases são características para cada linhagem celular, resultando em medidas reprodutíveis da duração da fase lag, do tempo gasto

para dobrar a população na fase lag e da densidade de saturação na fase platô.

A determinação do ciclo de crescimento tem um papel fundamental no projeto de experimentos e também na determinação da frequência com que as células devem ser subcultivadas (repicadas).

O monitoramento da proliferação das células SK-MG-1 para a determinação dos parâmetros de crescimento foi realizado durante 9 dias e os resultados podem ser observados na Figura 43.

Para estas células, o período lag foi de cerca de 22 horas. Durante a fase log, que se encerrou cerca de 140 horas após a inoculação das placas de cultivo, o tempo dispendido para que a população fosse dobrada foi de 22 horas. A fase platô caracterizou-se pela obtenção de uma densidade populacional de aproximadamente  $1,9 \cdot 10^6$  células viáveis por placa. Os parâmetros determinados foram condizentes com os citados na literatura para o cultivo de células humanas, podendo-se classificar o crescimento das células SK-MG-1 com sendo relativamente rápido (Freshney, 1994).

#### ***4.4.3. Sobrevivência das Células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1 Submetidas à Presença de CPA Livre***

Para uma série de compostos de boro, a literatura registra atividade anti-câncer independente da irradiação com nêutrons (Hall et al., 1985). Entre as classes de compostos estudados por este grupo de pesquisadores estão incluídas aminas cianoboranas, aminas carboxiboranas e análogos de  $\alpha$ -aminoácidos contendo boro. Nestes estudos, Hall et al. (1985) demonstraram que a síntese de DNA e RNA podem ser inibidas pelo uso de alguns dos compostos de boro a uma concentração de 300  $\mu$ M.

Uma vez que não há dados disponíveis na literatura a respeito do uso terapêutico da CPA contra tumores, uma etapa essencial no estudo de sua

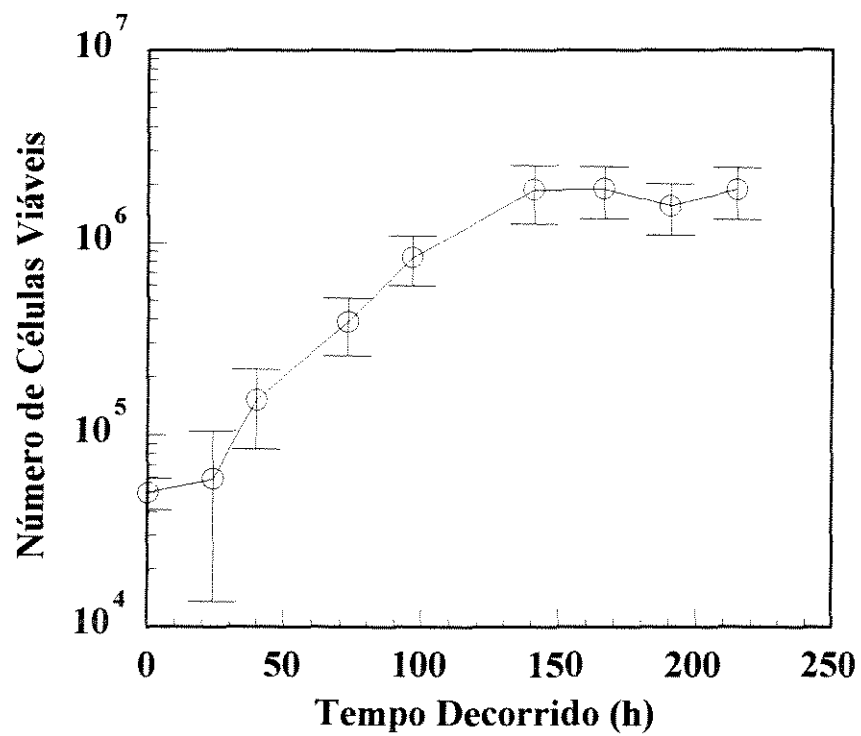


Figura 43 - Curva de crescimento das células de Glioblastoma Multiforme inoculadas a uma concentração inicial de  $5 \times 10^4$  células por placa de Petri e cultivadas em estufa a  $37^\circ\text{C}$  e 5 %  $\text{CO}_2$ .

aplicação como agente de captura de nêutrons é a avaliação da citotoxicidade do composto desvinculada dos efeitos resultantes da irradiação com nêutrons.

Avaliou-se experimentalmente a sobrevivência de células SK-MG-1 expostas por 2 horas a soluções contendo simplesmente CPA suspensa em solução tampão I. Após o tratamento com várias concentrações de CPA, determinou-se o efeito imediato nas células por exclusão do corante Trypan Blue. O efeito na capacidade de reprodução celular foi avaliado pela determinação do número de clones desenvolvidos 12 dias após o tratamento. Os resultados obtidos estão ilustrados na Tabela 10.

Pode-se observar uma séria discordância entre os dois métodos utilizados para a avaliação da sobrevivência celular. Enquanto o método do Trypan Blue indicou boa resistência das células para concentrações de CPA entre 10 e 300  $\mu\text{M}$ , a formação de clones revelou a forte ocorrência de danos à capacidade de reprodução das células, de uma maneira dependente da concentração de CPA adicionada. No entanto, a exposição das células a 1 mM de CPA resultou, segundo ambos os métodos de análise, em 100 % de morte celular. O método de desenvolvimento de clones mostrou um resultado semelhante para as células expostas a 300  $\mu\text{M}$  de CPA, onde apenas 2 % das células inoculadas sobreviveram.

Durante a incubação das células com a CPA, observou-se visualmente que as células expostas às duas concentrações mais elevadas do composto de boro perderam a aderência quase que imediatamente após o contato, de maneira que a CPA pode ter interagido com as proteínas responsáveis pela adesão celular. Embora as células tenham se desprendido da superfície do frasco de cultura, as mesmas não se isolaram, continuando agregadas entre si.

Assim, as doses estimadas como suficientes para matar 50 % da população inicial diferem para os dois métodos. De acordo com a técnica do Trypan Blue, este valor seria de cerca de 500  $\mu\text{M}$ , enquanto que a formação de



clones indica que este valor ocorreria em torno de 100  $\mu\text{M}$ , ou seja, em uma concentração 5 vezes menor. Entretanto, como a formação de clones indica que o veículo usado para suspender a CPA foi capaz de reduzir o crescimento celular em 18 %, por si só, o valor da dose suficiente para matar 50 % da população inicial seria um pouco mais elevado.

Tabela 10 - Avaliação da sobrevivência de células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1 tratadas com soluções de CPA a diversas concentrações pelos métodos de exclusão de Trypan Blue e de formação de clones.

Concentração de CPA ( $\mu\text{M}$ )	Sobrevivência Celular (%)	
	Método do Trypan Blue	Formação de Clones
0 (solução tampão I)	99 $\pm$ 2	82 $\pm$ 7
10	98 $\pm$ 3	78 $\pm$ 10
30	99 $\pm$ 2	60 $\pm$ 13
100	98 $\pm$ 2	53 $\pm$ 10
300	83 $\pm$ 24	2 $\pm$ 0
1000	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

Embora a técnica de exclusão do Trypan Blue seja simples e rápida, permitindo a avaliação instantânea da citotoxicidade de um dado agente, este método tende a superestimar a viabilidade celular, uma vez que apenas as células mortas são coradas, não se obtendo informações a respeito da capacidade reprodutiva das células tidas como sobreviventes (Freshney, 1994).

Desta forma, os ensaios clonogênicos possivelmente representariam melhor os efeitos tóxicos deste e de outros compostos terapêuticos em células de Glioblastoma Multiforme. Entretanto, este tipo de experimento demanda um longo tempo de execução e análise, principalmente se um número muito grande de amostras estiver envolvido. A duração deste tipo de experimento é, em geral, bastante longa, de forma que se pode levar até 3 semanas para a obtenção dos resultados finais.

Assim, nos experimentos que se seguem empregou-se um método alternativo para avaliar a proliferação de células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1 expostas a diversos agentes. A atividade metabólica celular foi monitorada através do reagente Alamar Blue, utilizando-se células cultivadas em placas de microtitulação com 96 poços. Esta metodologia é recomendada para a avaliação da citotoxicidade de compostos anti-câncer, sendo bastante sensível e possibilitando o teste simultâneo do efeito de várias condições distintas, além de favorecer a reprodução de experimentos a baixo custo (Pagé et al., 1993).

Em um teste preliminar do uso desta técnica, avaliou-se a sensibilidade das células SK-MG-1 à incubação na presença de concentrações variadas dos compostos terapêuticos CPA, BPA e DOX por um período de 48 horas. Além da CPA e da DOX, utilizou-se também uma droga de referência denominada Bleomicina. A bleomicina é um agente quimioterapêutico efetivo contra diversos tipos de tumores humanos que apresentam elevadas taxas de mitose, assim como os gliomas malignos, que têm ciclo celular de aproximadamente três a cinco dias *in vivo*. Os resultados destes experimentos podem ser observados na Figura 44.

Pode-se observar que apenas três dos compostos terapêuticos utilizados provocaram a inibição da proliferação celular. Assim como os linfócitos, as células SK-MG-1 não se mostraram sensíveis à presença de BPA. A utilização

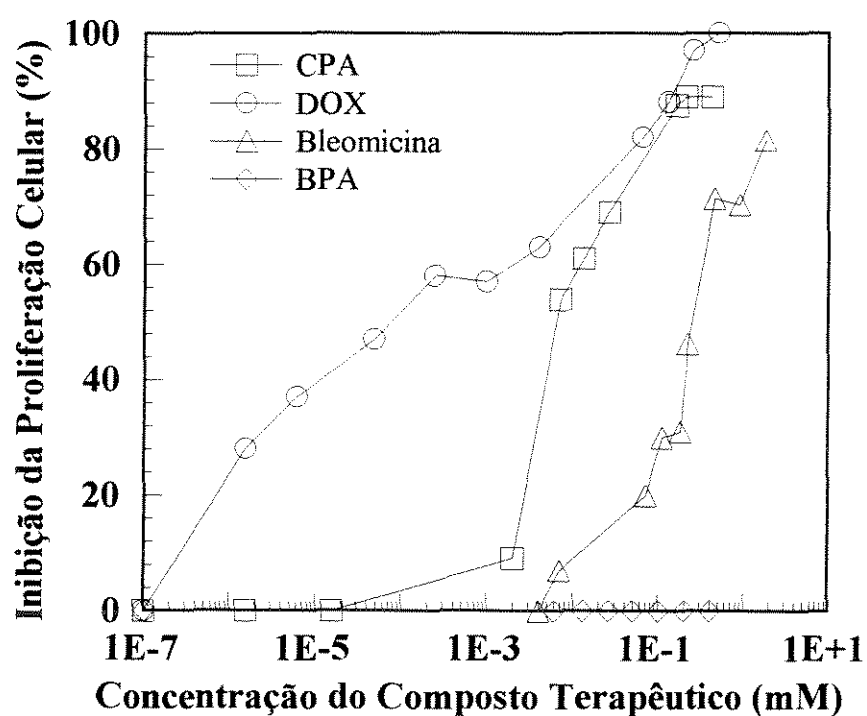


Figura 44 - Inibição da proliferação de células de Glioblastoma Multiforme incubadas por 48 h em estufa a 37°C e 5 % CO<sub>2</sub> na presença de concentrações variadas dos agentes terapêuticos CPA, BPA, DOX e bleomicina.

de concentrações de BPA variando de 0,004 a 0,4 mM não resultou em morte celular. Estes resultados são compatíveis com os obtidos por Matalka et al. (1993), Saris et al. (1992) e Coderre et al. (1990) em testes *in vitro* e *in vivo*. Os referidos autores observaram que a BPA, mesmo a concentrações elevadas, apresenta toxicidade ou efeito anti-câncer apenas quando submetida à irradiação com nêutrons.

Nos sistemas restantes, o grau de inibição aumentou com a elevação da concentração. Ao longo de toda a faixa de concentrações testada, a exposição à DOX causou as maiores inibições. As doses suficientes para inibir a proliferação de 50 % da população de células foram calculadas a partir dos resultados experimentais, resultando em aproximadamente  $7 \cdot 10^{-5}$  mM para a DOX,  $6 \cdot 10^{-3}$  mM para a CPA e  $2,5 \cdot 10^{-1}$  mM para a bleomicina. O resultado obtido para a DOX é próximo ao citado na literatura para células malignas do sistema nervoso central, em torno de  $10^{-5}$  mM (Alley et al., 1988).

Assim, embora tenha sido necessário cerca de 100 vezes mais CPA que DOX para causar 50 % de inibição, necessitou-se de quase 3.600 vezes mais bleomicina para inibir em 50 % a proliferação de uma população de células equivalente. Estes valores indicam bom potencial de uso dos agentes DOX e CPA na terapia do Glioblastoma Multiforme. Este dado é especialmente interessante para a CPA, pois sua atividade anti-câncer não estaria restrita aos resultados decorrentes da irradiação com nêutrons.

A fim de se comparar os valores obtidos para a dose letal requerida para inibir a proliferação de 50 % das células utilizando-se os métodos do Trypan Blue, formação de clones e Alamar Blue, expôs-se as células SK-MG-1 a várias concentrações de CPA por 2 horas. Os resultados obtidos mostraram que a técnica do Alamar Blue fornece uma concentração de cerca de 80  $\mu$ M de CPA para 50 % de inibição. Este valor é mais próximo da dose resultante do ensaio de formação de clones (100  $\mu$ M) que do método do Trypan Blue

(500  $\mu$ M), o que sugere sua utilização no monitoramento da proliferação celular.

#### ***4.4.4. Inibição da Proliferação de Células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1 pela Exposição a CPA Livre e Encapsulada em Lipossomas Convencionais e “Stealth”***

O efeito da incubação de células SK-MG-1 à CPA livre e encapsulada em lipossomas convencionais (compostos por DSPC/DMPE/Col) e “stealth” (compostos por DSPC/DMPE/Col/DMPE-PEG, contendo 6% de DMPE-PEG) foi avaliado para diversos tempos de exposição e para amostras concentradas ou diluídas por 10 vezes. Lipossomas de mesma composição porém não contendo CPA encapsulada foram também utilizados em experimentos controle. A Tabela 11 mostra as concentrações originais utilizadas para todas as amostras testadas.

Tabela 11 - Caracterização das amostras não diluídas utilizadas nos ensaios de citotoxicidade resultante da exposição de células SK-MG-1 à CPA. Todas as amostras encontravam-se suspensas em solução tampão I.

Tipo de Agente	Concentração de Lipídios (mM)	Concentração de CPA (mM)
CPA Livre	-	0,15
Lipossomas sem Droga	1,35	-
6%PEG-Lipossomas sem Droga	1,35	-
Liposomas + CPA	1,35	0,15
6%PEG-Lipossomas + CPA	1,35	0,15

Os efeitos da utilização das amostras na forma concentrada (suspensas em solução tampão II) ou diluídas 10 vezes com meio de cultura completo ou sem o soro de feto bovino (meio de cultura incompleto) são descritos a seguir.

A diluição na presença ou ausência do soro de feto bovino (SFB) visou a avaliação da influência das proteínas nele contidas no comportamento dos vários sistemas testados. Embora os efeitos das amostras diluídas em até 1.000.000 vezes tenham sido também avaliados, não se observou inibições maiores que 20 % em praticamente todos os casos onde a diluição era maior que 10 vezes. A única situação onde ainda houve forte inibição a baixas concentrações foi quando se expôs as células à CPA livre.

Os resultados descritos a seguir são representados por valores médios e desvios padrões obtidos a partir de pelo menos três testes independentes, envolvendo de 3 a 12 réplicas por teste, onde o reagente Alamar Blue foi utilizado como indicador da atividade metabólica celular.

*Exposição Aguda a Amostras Concentradas* - A Figura 45 demonstra os resultados comparativos obtidos na exposição das células aos agentes testados por 1, 2 e 4 h.

As maiores inibições da proliferação celular foram obtidas com a CPA livre, variando de  $80 \pm 21$  a  $93 \pm 2$  % para exposições de 1 a 4 h. A incubação das células na presença de lipossomas convencionais e “stealth” contendo ou não CPA resultou em inibições de proliferação equivalentes para ambos os sistemas, não ultrapassando 30 %. O máximo valor alcançado foi de 26 % para a exposição a lipossomas “stealth” contendo CPA por 4 h. Entretanto, este valor representou menos de um terço da inibição obtida pelo uso da CPA livre.

*Exposição Aguda a Amostras Diluídas com Meio de Cultura Completo* - Como se pode observar na Figura 46, a exposição das células às

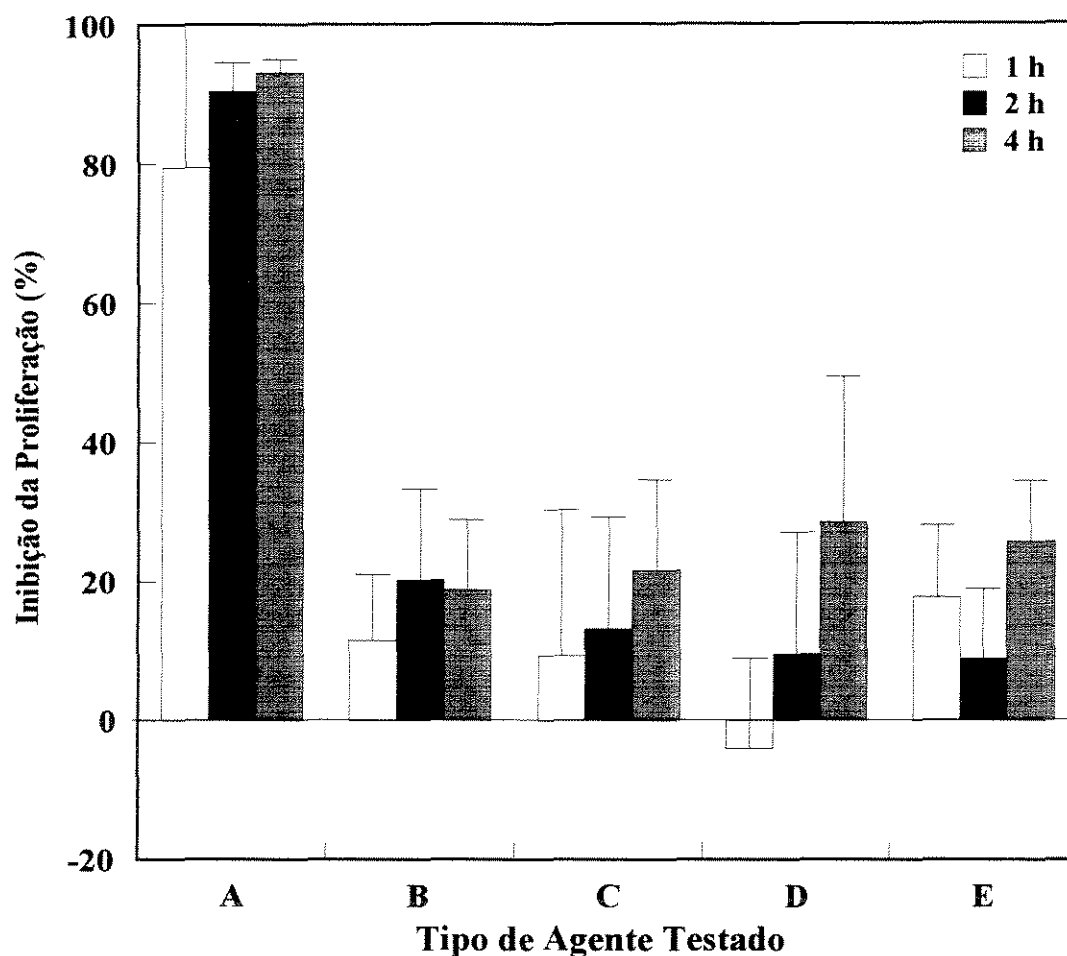


Figura 45 - Inibição da proliferação das células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1 por CPA livre e encapsulada em lipossomas convencionais e “stealth” suspensos em solução tampão I. As células foram incubadas na presença das amostras por 1, 2 e 4 h, após o que foram lavadas e incubadas em meio de cultura por 48 horas. O percentual de inibição foi determinado através do reagente Alamar Blue. Descrição dos agentes testados: (A) CPA livre; (B) lipossomas convencionais sem CPA; (C) lipossomas convencionais com CPA; (D) lipossomas “stealth” (com 6% DMPE-PEG) sem CPA; (E) lipossomas “stealth” com CPA. A concentração de CPA foi mantida em 0,15 mM e a de lipídios em 1,35 mM para todas as amostras.

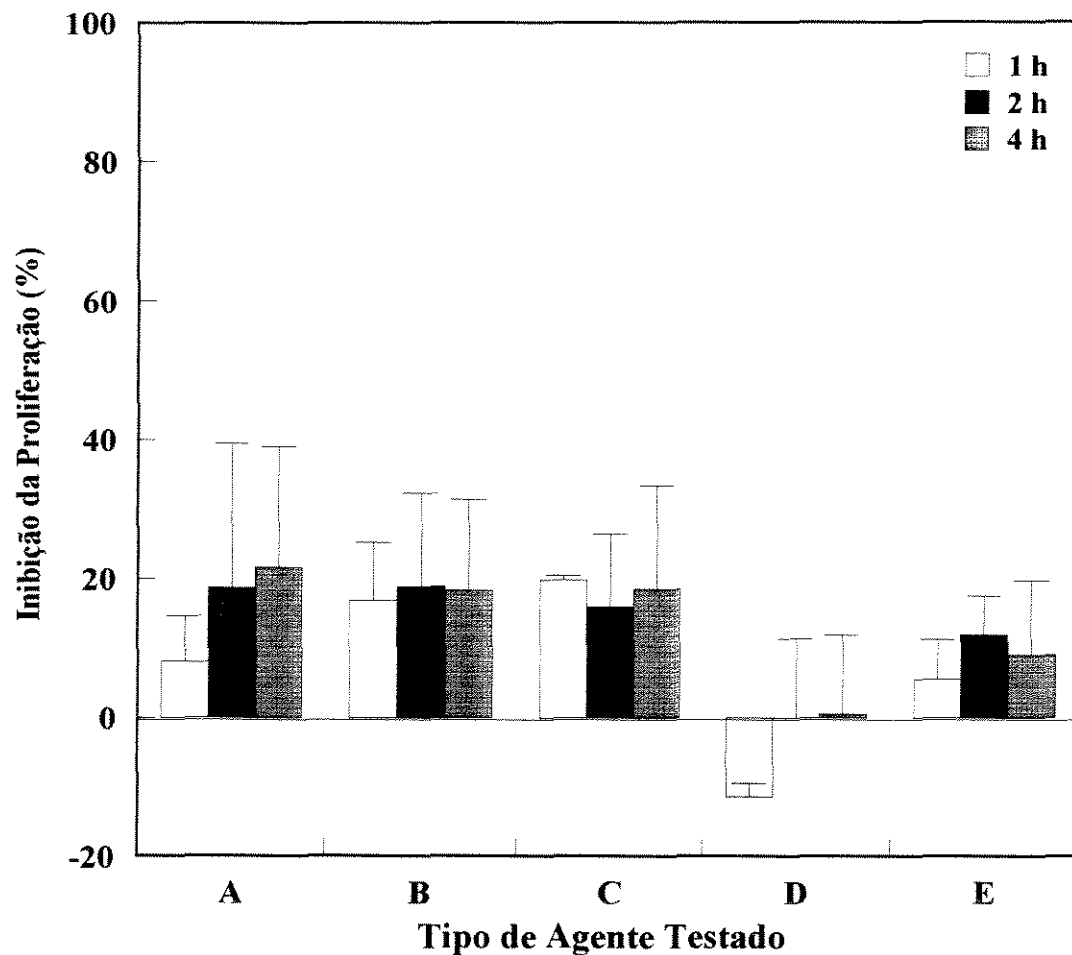


Figura 46 - Inibição da proliferação das células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1 por CPA livre e encapsulada em lipossomas convencionais e "stealth" diluídos em meio de cultura completo. As células foram incubadas na presença das amostras por 1, 2 e 4 h, após o que foram lavadas e incubadas em meio de cultura por 48 horas. O percentual de inibição foi determinado através do reagente Alamar Blue. Descrição dos agentes testados: (A) CPA livre; (B) lipossomas convencionais sem CPA; (C) lipossomas convencionais com CPA; (D) lipossomas "stealth" (com 6% DMPE-PEG) sem CPA; (E) lipossomas "stealth" com CPA. A concentração de CPA foi mantida em 0,015 mM e a de lipídios em 0,135 mM para todas as amostras.



amostras diluídas resultou em inibições inferiores a 20 %, mesmo para a CPA livre. O aumento do tempo de exposição de 1 para 4 horas não induziu inibição adicional da proliferação das células.

Notou-se que os lipossomas convencionais contendo ou não CPA encapsulada foram um pouco mais tóxicos às células que os lipossomas “stealth”. Isto pode ter ocorrido devido à menor estabilidade que lipossomas convencionais geralmente apresentam em soluções contendo proteínas de soro, fazendo com que estas vesículas se desestabilizem e liberem o composto encapsulado, que fica então mais disponível para as células.

*Exposição Aguda a Amostras Diluídas com Meio de Cultura Incompleto* - Na Figura 47 pode-se observar que a diluição das amostras em meio de cultura livre de SFB resultou em inibições da proliferação celular ainda menores que as observadas quando da diluição das amostras com meio de cultura completo. Entretanto, neste caso há uma discreta tendência ao aumento dos efeitos citotóxicos com o aumento do tempo de contato das amostras com as células.

*Exposição Crônica a Amostras Concentradas e Diluídas com Meio de Cultura Completo* - Na Tabela 12 pode-se observar os efeitos decorrentes da exposição por 48 horas das células SK-MG-1 aos agentes testados concentrados e diluídos.

As maiores toxicidades resultantes da exposição crônica foram observadas para a incubação com a droga livre tanto concentrada como diluída. Com o prolongamento do tempo de contato entre os lipossomas concentrados e as células para 48 h, notou-se um aumento expressivo na citotoxicidade dos lipossomas convencionais concentrados encapsulando ou não a CPA. Como esse efeito não foi observado quando da utilização das

mesmas amostras diluídas 10 vezes, supõe-se que o aumento na toxicidade deveu-se mais à presença dos lipídios e não somente à liberação da CPA encapsulada.

Os lipossomas “stealth” não encapsulando a CPA além de não induzirem a inibição da proliferação aparentemente estimularam o crescimento celular. A incorporação de CPA nestes lipossomas causou uma inibição equivalente à observada na exposição das células a essa mesma amostra por 4 horas, conforme mostrado na Figura 45.

Tabela 12 - Inibição da proliferação das células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1 por CPA livre e encapsulada em lipossomas convencionais e “stealth”. As células foram incubadas na presença das amostras concentradas suspensas em solução tampão I (composição descrita na Tabela 11) e diluídas em meio de cultura por 48 horas.

Tipo de Agente	Inibição da Proliferação (%)	
	Amostras não diluídas	Amostras diluídas 10 vezes
CPA Livre	88±8	65±8
Lipossomas sem Droga	76±21	-2±1
6%PEG-Lipossomas sem Droga	-15±19	5±27
Lipossomas + CPA	75±11	6±30
6%PEG-Lipossomas + CPA	21.9±10	1±0

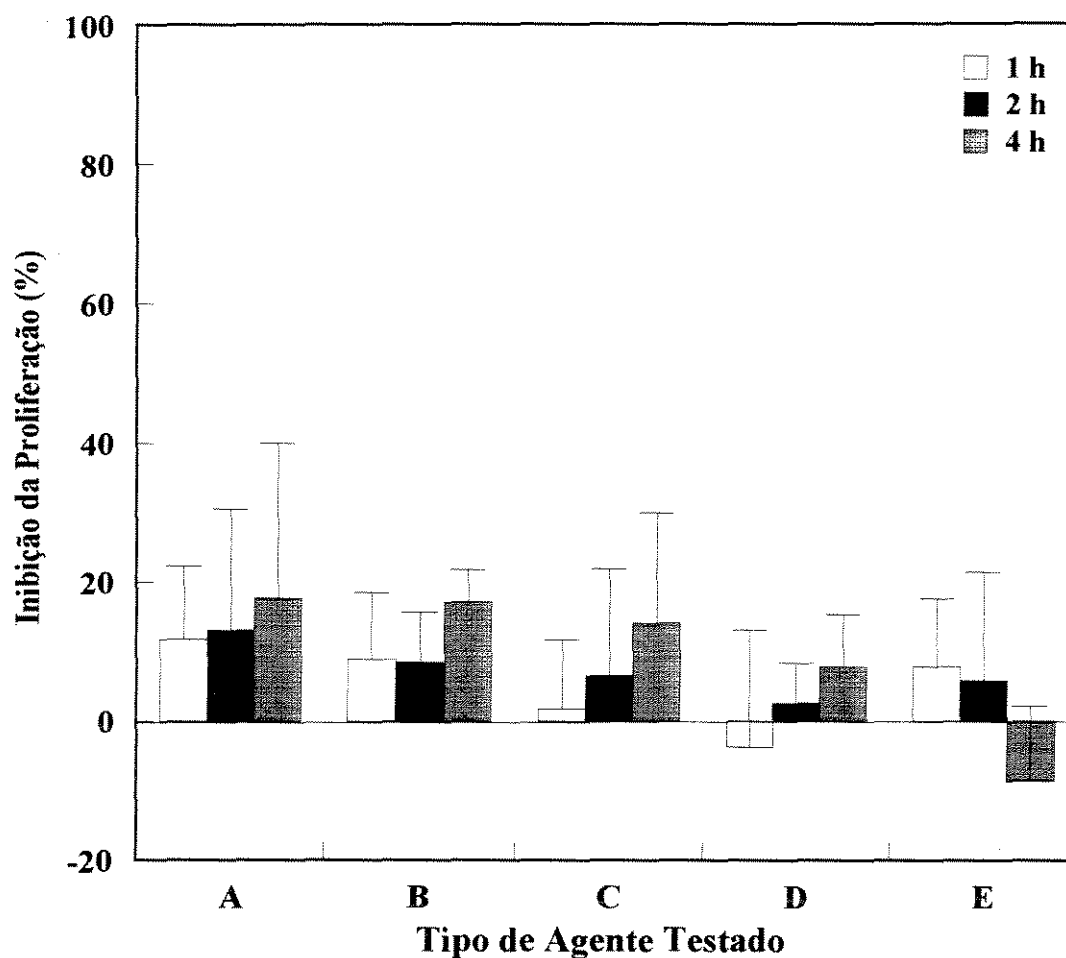


Figura 47 - Inibição da proliferação das células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1 por CPA livre e encapsulada em lipossomas convencionais e “stealth” diluídos em meio de cultura incompleto (não contendo SFB). As células foram incubadas na presença das amostras por 1, 2 e 4 h, após o que foram lavadas e incubadas em meio de cultura por 48 horas. O percentual de inibição foi determinado através do reagente Alamar Blue. Descrição dos agentes testados: (A) CPA livre; (B) lipossomas convencionais sem CPA; (C) lipossomas convencionais com CPA; (D) lipossomas “stealth” (com 6% DMPE-PEG) sem CPA; (E) lipossomas “stealth” com CPA. A concentração de CPA foi mantida em 0,015 mM e a de lipídios em 0,135 mM para todas as amostras.

#### ***4.4.5. Inibição da Proliferação de Células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1 pela Exposição a Doxorrubicina Livre e Encapsulada em Lipossomas Convencionais e em Imunolipossomas***

As células SK-MG-1 foram incubadas por diferentes intervalos de tempo com diversas amostras distintas. Os efeitos da exposição destas células a lipossomas extrudados com composição DPPC/Col/MPB-PE acoplando ou não os anticorpos do tipo IgM foram avaliados, para vesículas contendo ou não DOX ativamente encapsulada. Avaliou-se também os efeitos isolados da DOX e do anticorpo específico IgM-H11 livres em solução. A Tabela 13 mostra as concentrações originais utilizadas para todas as amostras testadas. A citotoxicidade foi determinada através do reagente Alamar Blue, como descrito no capítulo de Materias e Métodos, para a avaliação do efeito de todas as amostras.

Os efeitos da utilização das amostras na forma concentrada (suspensas em solução tampão II) ou diluídas 10 vezes com meio de cultura completo ou sem o soro de feto bovino (meio de cultura incompleto) são descritos como se segue. Embora os efeitos das amostras diluídas em até 1.000.000 vezes tenham sido também avaliados, não se observou inibições maiores que 20 % em praticamente todos os casos onde a diluição foi maior que 10 vezes. A única situação onde ainda houve forte inibição a baixas concentrações foi quando se expôs as células à DOX livre.

*Exposição Aguda a Amostras Concentradas* - A Figura 48 demonstra os resultados comparativos obtidos na exposição das células aos agentes testados por 1, 2 e 4. Pode-se observar que as toxicidades de lipossomas não contendo a droga, do anticorpo específico livre e de lipossomas sem droga acoplados à IgM-H11 foram inferiores a 10 %.

Tabela 13 - Caracterização das amostras não diluídas utilizadas nos ensaios de citotoxicidade resultante da exposição das células SK-MG-1 à DOX. Todas as amostras encontravam-se suspensas em solução tampão II.

Tipo de Agente	Concentração			Número de Monômeros/ Vesícula
	Lipídios (mM)	DOX (mM)	Proteína (µg/ml)	
DOX Livre	-	0,1	-	-
IgM-H11 Livre	-	-	8,4	-
Lipossomas sem Droga	0,3	-	-	-
Lipossomas sem Droga + IgM-H11	0,3	-	8,9	18
Lipossomas + DOX	0,3	0,1	-	-
Lipossomas + DOX + IgM-C	0,3	0,1	11,9	19
Lipossomas + DOX + IgM-H11	0,3	0,1	8,4	17

As maiores inibições da proliferação celular foram obtidas com a DOX livre, variando de  $73 \pm 8$  a  $82 \pm 2$  % para exposições de 1 a 4 h. A incubação das células na presença de lipossomas contendo DOX e de imunolipossomas (acoplados a IgM-H11) encapsulando DOX resultou em inibições de proliferação equivalentes para os dois sistemas. O valor máximo alcançado foi de  $41 \pm 7$  % para a exposição a imunolipossomas por 4 h. Entretanto, este valor representou apenas cerca de 50 % da inibição obtida pelo uso da droga livre.

Lipossomas acoplados à IgM-C (anticorpo não específico para as células SK-MG-1) contendo DOX encapsulada causaram inibição maior que 10 % apenas 4 horas após o contato com as células.

Possivelmente os resultados mais significativos do ponto de vista

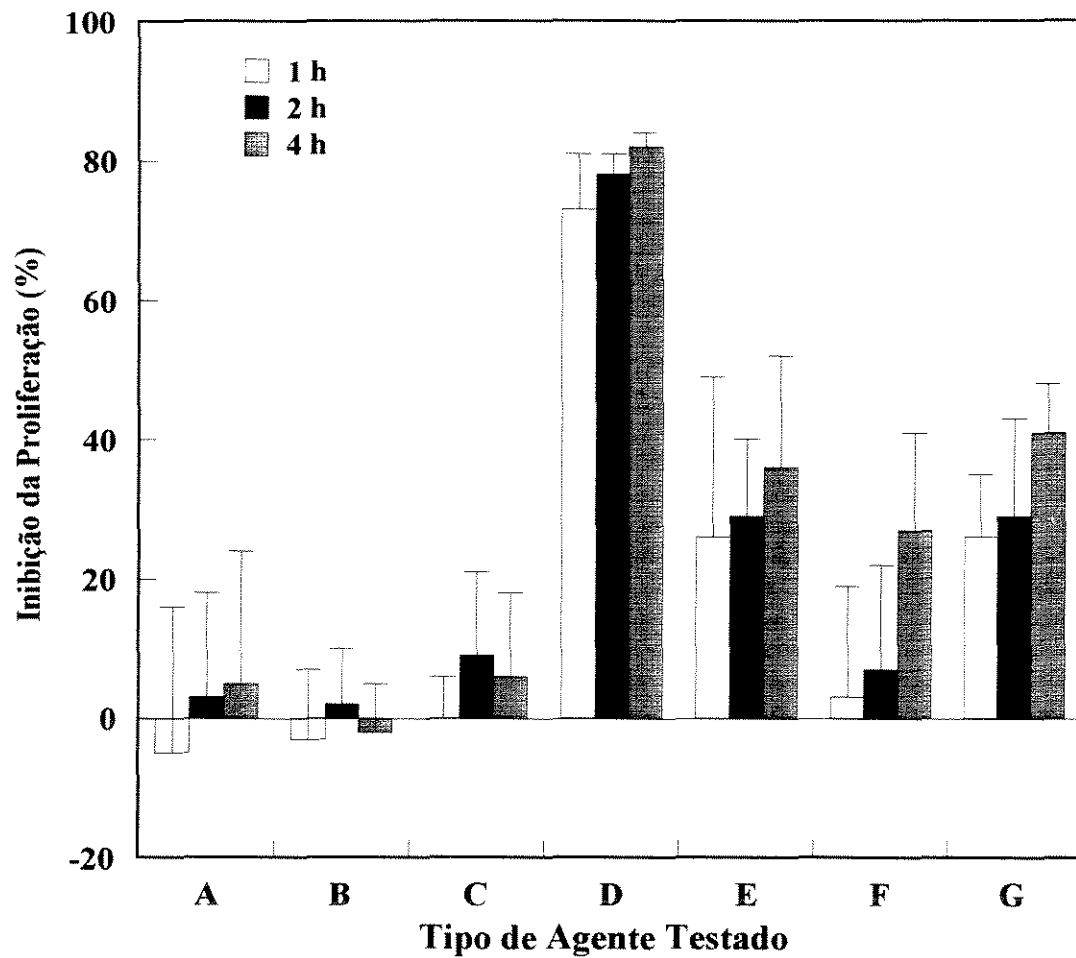


Figura 48 - Inibição da proliferação das células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1 por DOX livre e encapsulada em lipossomas convencionais e acoplados a anticorpos do tipo IgM. As células foram incubadas na presença das amostras suspensas em solução tampão II por 1, 2 e 4 h, após o que foram lavadas e incubadas em meio de cultura por 48 horas. Descrição dos agentes testados: (A) lipossomas convencionais sem DOX; (B) IgM-H11 livre; (C) lipossomas sem DOX acoplados a IgM-H11; (D) DOX livre; (E) lipossomas convencionais com DOX; (F) lipossomas com DOX acoplados a IgM-C; (G) lipossomas com DOX acoplados a IgM-H11. A concentração de DOX foi mantida em 0,1 mM, a de lipídios em 0,3 mM e a de IgM entre 8,4 e 11,9  $\mu\text{g/ml}$  nas amostras.

farmacológico foram obtidos dentro da primeira hora de exposição, quando interações não específicas células/lipossomas seriam minimizadas. Como após 1 hora de exposição o sistema consistindo de lipossomas ligados a IgM-H11 contendo DOX resultou em uma inibição de apenas  $26 \pm 9$  % da proliferação celular, pode-se sugerir duas possibilidades: que os lipossomas não sofreram endocitose após a ligação com a célula, ou que após a endocitose, o lipossoma não sofreu lise, não liberando portanto a droga encapsulada no interior da célula.

*Exposição Aguda a Amostras Diluídas com Meio de Cultura Completo* - Os resultados da exposição aguda aos agentes descritos na Tabela 13 diluídos por 10 vezes com meio de cultura completo estão ilustrados na Figura 49 .

Também neste caso observou-se que as maiores inibições foram obtidas pelo uso da DOX livre. A inibição causada pela DOX livre aumentou com o tempo de exposição e o maior valor obtido foi de  $76 \pm 5$  % após 4 h de exposição. Lipossomas sem droga acoplados ou não à IgM-H11 resultaram em inibições menores que 10 % ao longo das 4 horas de exposição, assim como a IgM-H11 livre.

Lipossomas contendo DOX e acoplados a ambos os tipos de anticorpos resultaram em inibições inferiores a 11 %. Os lipossomas convencionais contendo a droga, no entanto, induziram inibições até 3 vezes maiores que as observadas com o uso de imunolipossomas. Esta maior eficácia dos lipossomas não acoplados a nenhum tipo de anticorpo pode ser explicada pelo fato de que a presença dos anticorpos na superfície dos lipossomas teria aumentado a estabilidade das vesículas expostas às proteínas do SFB do meio de cultura. Assim, os lipossomas não ligados a anticorpos estariam relativamente mais desprotegidos do ataque destas proteínas, sendo mais

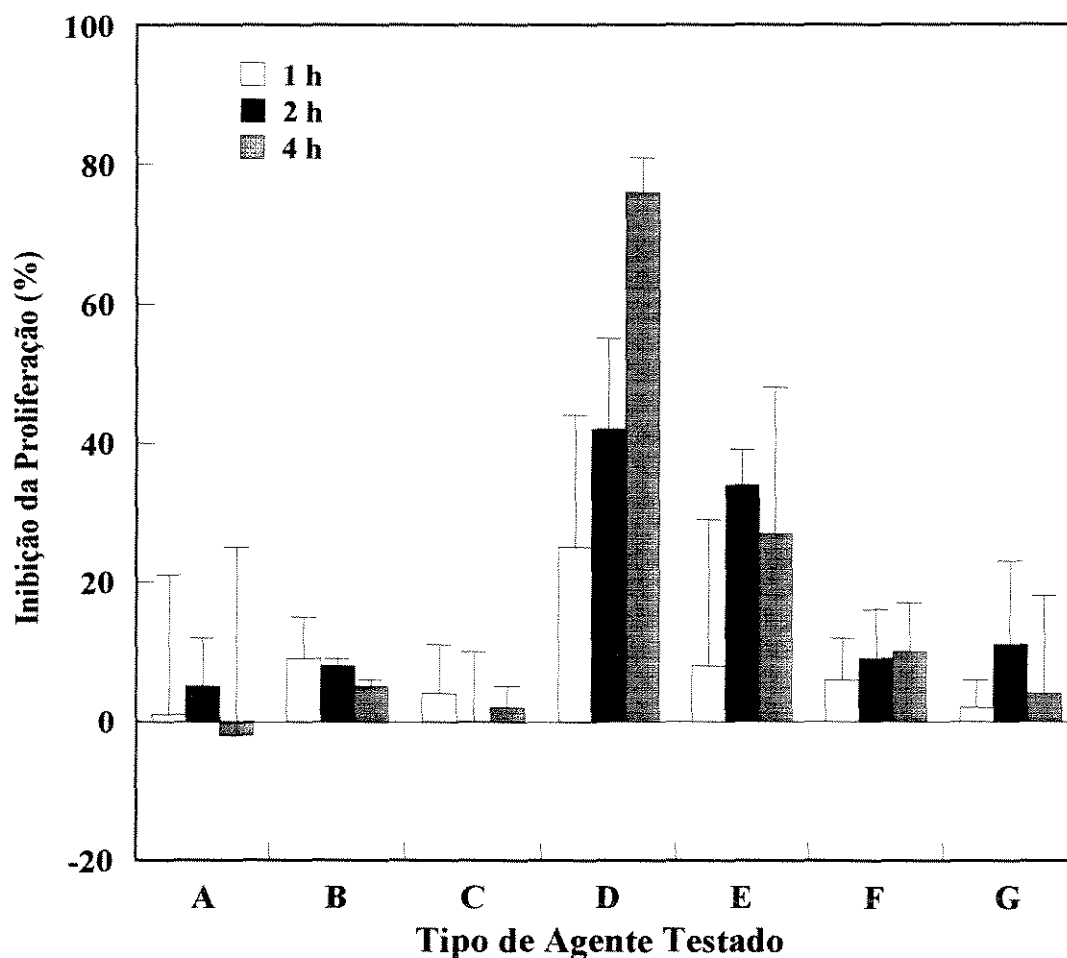


Figura 49 - Inibição da proliferação das células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1 por DOX livre e encapsulada em lipossomas convencionais e acoplados a anticorpos do tipo IgM. As células foram incubadas na presença das amostras suspensas em meio de cultura completo por 1, 2 e 4 h, após o que foram lavadas e incubadas em meio de cultura por 48 horas. Descrição dos agentes testados: (A) lipossomas convencionais sem DOX; (B) IgM-H11 livre; (C) lipossomas sem DOX acoplados a IgM-H11; (D) DOX livre; (E) lipossomas convencionais com DOX; (F) lipossomas com DOX acoplados a IgM-C; (G) lipossomas com DOX acoplados a IgM-H11. A concentração de DOX foi mantida em 0,01 mM, a de lipídios em 0,03 mM e a de IgM entre 0,84 e 0,119  $\mu\text{g/ml}$  nas amostras.



facilmente desestabilizados durante a incubação com as células. Isto poderia ter causado um aumento na permeabilidade das vesículas e a consequente liberação da droga, fazendo com que o comportamento deste sistema se aproximasse mais ao do obtido com a droga livre.

*Exposição Aguda a Amostras Diluídas com Meio de Cultura Incompleto* - A Figura 50 mostra os resultados obtidos com a exposição das células SK-MG-1 às amostras descritas na Tabela 13 diluídas por 10 vezes com o meio de cultura sem o SFB.

Similarmente ao comportamento obtido com os sistemas testados anteriormente, as células foram mais sensíveis à presença da droga livre do que à de qualquer um dos outros agentes utilizados. Também neste caso a maior inibição da proliferação celular, igual a  $74 \pm 10$  %, foi obtida após 4 horas de exposição à droga livre.

Nesta série de experimentos as toxicidades foram em geral maiores que as observadas para os mesmos agentes diluídos em meio de cultura completo. As toxicidades exibidas por lipossomas contendo DOX e apresentando ou não moléculas do anticorpo específico IgM-H11 ligadas à sua superfície foram comparáveis apenas 4 horas após o início da exposição, mas durante as duas primeiras horas, lipossomas contendo apenas a droga foram mais eficientes na inibição das células.

*Exposição Crônica a Amostras Concentradas e Diluídas com Meio de Cultura Completo* - A Tabela 14 ilustra as inibições de proliferação decorrentes da exposição das células SK-MG-1 aos agentes testados por 48 horas.

Pode-se observar que a maior inibição foi obtida pelo uso da DOX livre em todas as diluições testadas. Devido ao pronunciado efeito tóxico da DOX, a

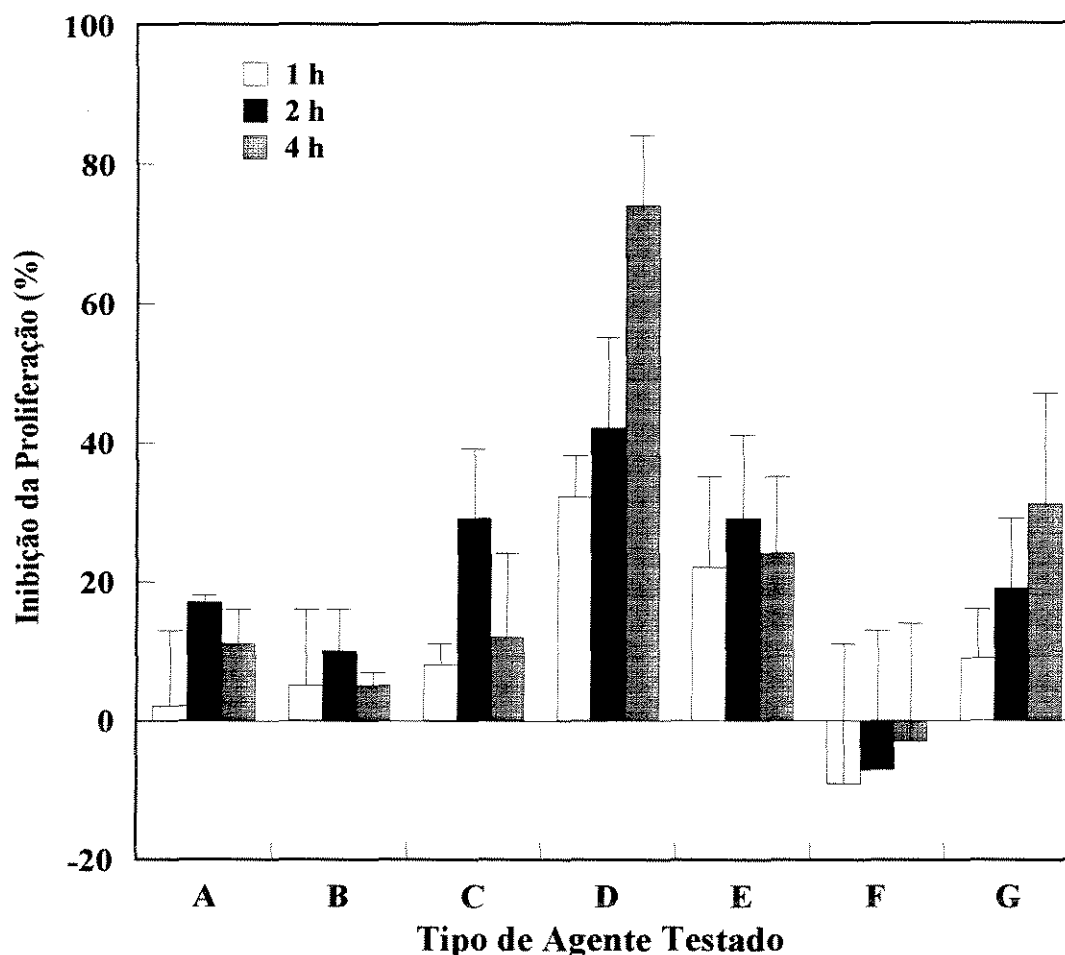


Figura 50 - Inibição da proliferação das células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1 por DOX livre e encapsulada em lipossomas convencionais e acoplados a anticorpos do tipo IgM. As células foram incubadas na presença das amostras suspensas em meio de cultura incompleto (sem SFB) por 1, 2 e 4 h, após o que foram lavadas e incubadas em meio de cultura por 48 horas. Descrição dos agentes testados: (A) lipossomas convencionais sem DOX; (B) IgM-H11 livre; (C) lipossomas sem DOX acoplados a IgM-H11; (D) DOX livre; (E) lipossomas convencionais com DOX; (F) lipossomas com DOX acoplados a IgM-C; (G) lipossomas com DOX acoplados a IgM-H11. A concentração de DOX foi mantida em 0,01 mM, a de lipídios em 0,03 mM e a de IgM entre 0,84 e 0,119  $\mu\text{g/ml}$  nas amostras.

inibição resultante da exposição das células à droga livre foi elevada mesmo quando a DOX se encontrava diluída por 100 vezes. O uso dos lipossomas convencionais encapsulando a droga e dos imunolipossomas ligados ao anticorpo específico contendo DOX resultaram nas segundas maiores inibições, em torno de 45 %. No entanto, este efeito não foi observado para as mesmas amostras diluídas.

Tabela 14 - Inibição da proliferação das células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1 por DOX livre e encapsulada em lipossomas convencionais e acoplados a anticorpos do tipo IgM. As células foram incubadas na presença das amostras concentradas suspensas em solução tampão II (composição descrita na Tabela 12) e diluídas em meio de cultura por 48 horas.

Tipo de Agente	Inibição da Proliferação (%)		
	Amostras não diluídas	Amostras diluídas 10 vezes	Amostras diluídas 100 vezes
DOX Livre	87±13	65±23	60±8
IgM-H11 Livre	-23±15	-3±2	7±2
Lipossomas sem Droga	-67±14	-24±32	-8±27
Lipossomas sem Droga + IgM-H11	-25±2	8±7	12±4
Lipossomas + DOX	44±2	12±38	19±26
Lipossomas + DOX + IgM-C	-5±10	5±29	6±17
Lipossomas + DOX + IgM-H11	45±3	18±7	7±22

Nota-se também que algumas amostras induziram a um aparente estímulo na proliferação, ilustrado pelos valores negativos obtidos para a inibição do crescimento celular. Entre as amostras que apresentaram este comportamento, tem-se o anticorpo específico livre, ambos os lipossomas livres de drogas e os lipossomas acoplados ao anticorpo IgM-C contendo DOX.

Horowitz et al. (1992) observaram que o uso de DOX encapsulada em lipossomas cujo principal componente é um fosfolipídio que apresente elevada temperatura de transição (em geral, maior que 37°C) resulta em baixa citotoxicidade. Embora o uso desse tipo de lipídio favoreça o transporte e deposição de vesículas intactas nas imediações do tumor, lipossomas intactos conduzem a uma menor exposição das células-alvo à droga. Os mesmos autores observaram também que a citotoxicidade depende da liberação da DOX no meio extracelular e não do transporte da droga encapsulada para o interior da célula. Desta forma, incubações prolongadas das células em presença de lipossomas contendo DOX tenderiam favorecer a liberação da droga, diminuindo as diferenças existentes entre as citotoxicidades observadas para a droga na forma livre e encapsulada.

Assim, a presença do fosfolipídio DPPC (que apresenta uma  $T_m$  de 41°C) na composição das vesículas testadas poderia ter causado a diminuição da biodisponibilidade da droga e, conseqüentemente, a redução da citotoxicidade. Como o aumento do tempo de contato não resultou em maior diminuição da proliferação celular, pode-se sugerir que tais vesículas são estruturalmente estáveis a 37°C por períodos de até 48 horas.

O fato de que os imunolipossomas específicos contra as células SK-MG-1 se mostram tão estáveis a ponto de não liberar a droga *in vitro* em quantidades suficientes para provocar a redução da proliferação das células em

comparação com o efeito da droga livre não necessariamente inviabiliza sua utilização *in vivo* na terapia de tumores cerebrais.

*In vivo*, os lipossomas estariam expostos a concentrações de plasma muito maiores que *in vitro*, além de estarem sujeitos a interações com as proteínas do fluido intersticial e com macrófagos que eventualmente estariam nas imediações do tumor (Horowitz et al., 1992; Lee et al., 1992). Esses fatores poderiam contribuir para um aumento significativo do efeito citotóxico pelo favorecimento da liberação da droga.

#### **4.5. Distribuição Ultraestrutural *in Vivo* de Boro Proveniente de CPA Livre e Encapsulada em Lipossomas**

A eficiência da Terapia de Captura de Nêutrons por Boro (TCNB) no tratamento de tumores cerebrais está diretamente ligada a pelo menos dois fatores, o acúmulo seletivo de substâncias contendo boro nas células cancerosas e a administração de doses corretas na irradiação com nêutrons. Embora o monitoramento dos níveis de boro no tumor e nas regiões normais adjacentes seja fundamental para a microdosimetria da radiação a ser aplicada, poucos são os métodos que possibilitam a localização e quantificação deste elemento nas células a nível ultraestrutural. A técnica de espectroscopia de perda de energia de elétrons acoplada à geração de imagens por espectroscopia eletrônica permite a análise específica e com elevada sensibilidade da distribuição de átomos de boro em estruturas internas de células, possibilitando a avaliação preliminar da eficácia de novos agentes de captura na deposição específica de boro em tumores.

Esta técnica foi utilizada para a localização de átomos de boro no cérebro de ratos. A avaliação foi feita em tecidos normais e em tumores intracranianos do tipo gliossarcoma 9L implantados e desenvolvidos nos animais por 13 dias. Para tal, injetou-se amostras contendo CPA na forma livre (contendo 160 ppm de boro) e ativamente encapsulada em lipossomas extrudados compostos por DSPC/DMPE/Col (contendo 20 ppm em boro). As análises foram feitas 30 minutos e 4 horas após a injeção intravenosa da CPA, resultando em amostras de tecidos com detalhamento celular e contraste de boa qualidade.

Em todas os tecidos onde foi detectado boro, o sinal associou-se primariamente à heterocromatina densa no interior do núcleo celular. No citoplasma, a associação do composto de boro foi fraca, não se observando o acúmulo de boro em nenhuma organela específica. Para as diversas amostras analisadas, a distribuição de boro foi variável, ou seja, este elemento foi exibido em diferentes intensidades pelas células de tumor e pelas células adjacentes a ele. Os tecidos cerebrais normais não apresentaram deposição de boro proveniente tanto da CPA livre como da encapsulada em lipossomas. As maiores concentrações de boro foram localizadas em glóbulos brancos, enquanto que os glóbulos vermelhos apresentaram pouco ou nenhum acúmulo deste elemento. Tecidos cerebrais normais e células de tumor de ratos controle (não tratados com CPA livre ou encapsulada) apresentaram apenas ruído de fundo.

Os tecidos de gliossarcoma de animais tratados com CPA encapsulada em lipossomas mostraram baixo acúmulo de boro 30 minutos após a injeção. Animais tratados com a CPA livre apresentaram acúmulo de boro moderado nos tumores e elevado nos glóbulos brancos. Em todas as amostras de tecido cerebral, notou-se que as células imediatamente adjacentes a vasos sanguíneos exibiram as deposições de boro mais intensas.

As amostras de gliossarcoma coletadas 4 horas após a injeção de CPA encapsulada em lipossomas mostraram um grande acúmulo de boro na região nuclear. A presença de boro nestas amostras permaneceu intensa nos cromossomos de células de tumor que se encontravam em divisão. Em contraste, a CPA livre resultou em deposições de boro de fracas a moderadas, apenas. Esta diferença nos acúmulos de boro observados para os dois sistemas é significativa, principalmente porque a concentração da CPA livre injetada suplantou a da CPA encapsulada em 8 vezes.

A razão do acúmulo da CPA no núcleo celular não foi esclarecida. No entanto, o caráter anfifílico deste composto pode ter auxiliado sua localização nos tumores, permitindo sua fácil penetração através das membranas celulares.

A quantificação do boro acumulado nas células de tumor através do uso de lipossomas levou a cerca de 0,4 µg de boro por grama de tumor. Este valor está claramente abaixo da concentração mínima necessária para que a TCNB seja efetiva. Segundo Hawthorne (1993), se o boro estiver associado à parede celular, concentrações iguais ou maiores que 30 ppm seriam necessárias, ao passo que se o boro estiver localizado no núcleo, concentrações em torno de 10 ppm seriam requeridas.

O fato de que a CPA pode ser acumulada especificamente em células de tumor e que tanto nos tecidos cerebrais normais como no sangue não foram observadas evidências da presença deste composto 4 horas após a injeção indicam boas possibilidades do uso da CPA encapsulada em lipossomas na TCNB. Embora a concentração de boro acumulado tenha sido bastante reduzida, a ausência de CPA nas imediações pouparia as células normais dos efeitos danosos da irradiação com nêutrons, atendendo a um requerimento básico para a aplicação da TCNB. A quantidade de boro acumulada poderia ser aumentada pela injeção intravenosa de um maior número de lipossomas, ou ainda através da administração intracraniana das vesículas, reduzindo a sua

diluição no sangue. Outras possibilidades seriam a administração de dosagens múltiplas e o uso de lipossomas “stealth” encapsulando a CPA.

#### **4.6. Citotoxicidade de Doxorrubicina Livre e Encapsulada em Lipossomas Injetados no Cérebro de Ratos**

Segundo Firth et al. (1984), a injeção local de agentes com atividade anti-câncer em tumores cerebrais pode ser uma opção relevante no tratamento de gliomas, pois a administração sistêmica destas substâncias geralmente envolve a manutenção de concentrações elevadas por períodos longos, acarretando sérios efeitos colaterais. A injeção intracerebral destes agentes terapêuticos encapsulados em lipossomas poderia ser ainda mais vantajosa, pois as vesículas poderiam atuar como reservatórios, liberando lentamente altas concentrações da droga encapsulada.

O efeito *in vivo* da injeção intracerebral de 10 µl de diversas amostras foi avaliado em ratos saudáveis. As alterações histológicas observadas através de microscopia óptica após a injeção dos agentes testados estão descritas na Tabela 15. Os testes tinham por finalidade mostrar os danos resultantes de doses únicas em fases de edema cerebral agudo (3 dias após a injeção) e crônico (14 dias após a injeção). A hemorragia leve é descrita como infiltrações de glóbulos sanguíneos vermelhos por não mais que um campo óptico além da extremidade da cânula de injeção, enquanto reações moderadas e fortes foram estipuladas como infiltrações de células alcançando 2 e de 3 a 4 campos ópticos além da região da cânula. Análises equivalentes foram feitas para tecidos apresentando células rompidas ou em fragmentos (necrose) e linfócitos (inflamação).



Tabela 15 - Alterações histológicas decorrentes da injeção intracerebral de diversas amostras em ratos saudáveis. Foram utilizados três animais por grupo de tratamento. Os animais foram sacrificados 3 ou 14 dias após uma única injeção de cada amostra.

Descrição da Amostra	Hemorragia		Necrose		Inflamação	
	Dia 3	Dia 14	Dia3	Dia 14	Dia 3	Dia 14
DOX Livre a 0,1 mM	++	-	-	-	-	-
	-	+	-	-	-	-
	++	++	-	-	-	-
DPPC/Col/MPB-PE Lipossomas a 0,3 mM em lipídios	+	-	-	-	-	-
	+	-	-	-	-	-
	+	-	-	-	-	-
IgM-H11 Livre a 8,4 µg/ml	+++	++	+	-	-	-
	+++	-	-	-	-	-
	+++	-	++	-	+	-
Lipossomas+DOX a 0,1 mM em DOX e 0,3 mM em lipídios	++	-	-	+	-	-
	++	+	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-
Lipossomas+DOX+IgM-C a 0,1 mM em DOX, 0,3 mM em lipídios e 11 µg IgM/ml	-	-	-	-	-	+++
	-	-	-	-	-	-
	++	-	-	-	-	-
Lipossomas+DOX+IgM-H11 a 0,1 mM em DOX, 0,3 mM em lipídios e 8,4 µg IgM/ml	-	-	-	+	-	+++
	++	-	-	-	-	-
	++	+	-	-	-	-

- : reação inexistente  
 + : reação fraca  
 ++ : reação moderada  
 +++ : reação forte

De maneira geral, não se observou danos anormais nos tecidos cerebrais. Em nenhum dos animais notou-se alterações comportamentais nos períodos decorridos após a injeção dos agentes testados, como convulsões. Três dias após as injeções, a maioria dos animais avaliados exibiu zonas de hemorragia adjacentes à região da cânula. Dois dos animais apresentaram tecidos com necrose de fraca a moderada (ambos tratados com a IgM-H11) e apenas um animal apresentou uma discreta inflamação (também tratado com o anticorpo específico). Assim, a injeção da IgM-H11 resultou nos efeitos mais intensos do ponto de vista de danos agudos, enquanto a DOX livre e encapsulada nos diversos lipossomas testados causou, quando muito, reações moderadas. A reação foi mínima quando da injeção de lipossomas livres da droga e dos anticorpos.

A avaliação dos tecidos cerebrais 14 dias após a administração dos agentes mostrou poucas alterações histológicas. Menos que um terço dos animais apresentou hemorragia fraca ou moderada. Em dois dos animais detectou-se necrose fraca (um tratado com lipossomas encapsulando DOX e outras com lipossomas acoplados a IgM-H11 contendo DOX). Observou-se forte reação inflamatória local em dois animais tratados com os lipossomas acoplados aos dois tipos de anticorpo.

Os resultados obtidos são, de uma maneira geral, comparáveis aos descritos por Firth et al. (1984) para ratos tratados com injeções intracranianas de bleomicina livre e encapsulada em lipossomas.

Pelos dados obtidos, demonstrou-se que a injeção dos agentes testados foi razoavelmente segura. A resposta mais freqüente foi hemorragia. Especificamente para os imunolipossomas contendo IgM-H11, o único efeito observado três dias após a injeção foi hemorragia moderada, enquanto que 14 dias após a injeção, a maior reação tóxica foi a inflamação.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSÕES E SUGESTÕES

#### 5.1. Conclusões

Em conclusão, o presente trabalho demonstra que a compreensão dos efeitos que controlam o encapsulamento e a liberação de um composto terapêutico é essencial para que se possa variar sistematicamente características como composição do lipossoma, diâmetro de vesícula, quantidade de composto terapêutico incorporado e número de anticorpos acoplados, de maneira a atender necessidades específicas. Os protocolos de preparação estão geralmente associados à estabilidade final do sistema.

Os resultados obtidos sugerem que técnicas de encapsulamento passivo e ativo de BPA em lipossomas convencionais conduzem a baixas eficiências de encapsulação, em concordância com os dados de solubilidade em soluções aquosas e de partição em sistemas 1-octanol/soluções aquosas. A adição de polietileno glicol ou de frutose à formulação, no entanto, melhora o encapsulamento.

Gradientes de pH podem ser utilizados para encapsular CPA em lipossomas convencionais e “stealth”, de maneira eficiente. O encapsulamento da CPA é mais sensível às razões molares iniciais CPA/lipídio que às condições de incubação.

A CPA foi mais eficientemente encapsulada em lipossomas contendo 6% de PEG em comparação com 12% de PEG, indicando que a presença das cadeias poliméricas perturba o transporte da CPA na membrana lipídica.

Lipossomas modificados com PEG exibem maior estabilidade em soluções de  $C_{12}E_5$  que lipossomas convencionais encapsulando ou não a CPA. Lipossomas convencionais contendo CPA são menos estáveis que lipossomas sem o composto de boro, indicando que parte da CPA acumula-se na bicamada lipídica. Este fato é também indicado pelo elevado coeficiente de partição obtido para este composto no sistema 1-octanol/solução tampão a pH 7,5.

O uso de razões molares iniciais CPA/lipídio reduzidas, bem como de lipossomas com maiores diâmetros, é mais indicado para a obtenção de sistemas estáveis do ponto de vista de estocagem.

Os lipossomas foram capazes de proteger os linfócitos humanos normais dos efeitos tóxicos da CPA.

Os resultados dos experimentos *in vitro* demonstraram pouco efeito citotóxico decorrente do acúmulo de CPA nas células SK-MG-1 através do uso de lipossomas convencionais e “stealth”. Os resultados preliminares dos testes de deposição seletiva de CPA encapsulada em lipossomas convencionais extrudados em tumores cerebrais *in vivo* mostraram-se bastante promissores.

A incorporação ativa de DOX em lipossomas compostos por DSPC/Col/DMPE e por DPPC/Col/MPB-PE a 60°C resulta em razões molares finais droga/lipídio similares para ambas as formulações de lipossomas. No entanto, o número de moléculas de DOX encapsuladas é maior para as vesículas contendo DPPC/Col/MPB-PE.

A estocagem das vesículas contendo DOX por um mês a 4°C não resultou em perda significativa da droga encapsulada. O acoplamento de anticorpos do tipo IgG e IgM à superfície dos lipossomas não provocou a liberação da droga encapsulada.

Enquanto o uso da técnica do periodato resulta na ligação de um máximo de 6 moléculas de anticorpo por lipossoma, a metodologia de acoplamento via grupos maleimida permite a ligação de até 22 monômeros de IgM-H11 e de até 40 monômeros de IgM-C por vesícula.

Lipossomas com monômeros do anticorpo específico IgM-H11 ligados à sua superfície associam-se às células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1 17 vezes mais que lipossomas acoplados a monômeros do anticorpo controle IgM-C.

Os experimentos *in vitro* mostraram que a encapsulação de DOX em lipossomas resulta na redução da toxicidade da droga para linfócitos humanos normais. Quando injetada no cérebro de ratos normais, a toxicidade da DOX encapsulada em lipossomas varia de reduzida a moderada.

Os experimentos *in vitro* apresentaram, em geral, baixa reprodutibilidade, não elucidando o mecanismo de interação das células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1 com os lipossomas, representando apenas as tendências gerais da associação das vesículas com as células. A proliferação *in vitro* dessas células foi inibida em até 45 % quando imunolipossomas contendo o anticorpo específico IgM-H11 e encapsulando DOX foram utilizados.

## 5.2. Sugestões

Para dar continuidade ao trabalho desenvolvido, sugere-se o estudo dos aspectos mencionados a seguir.

Estocagem de lipossomas liofilizados contendo os compostos terapêuticos encapsulados.

Encapsulamento simultâneo de BPA e CPA por incorporação passiva e ativa, respectivamente.

Avaliação da permeabilidade da bicamada lipídica dos lipossomas com variações na composição em lipídios.

Preparação e caracterização de lipossomas sensíveis a pequenas variações de temperatura ou pH para aumentar a quantidade de composto terapêutico liberado disponível para as células.

Avaliação da ocorrência de endocitose de lipossomas incubados com células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1.

Avaliação da influência do número de anticorpos ligados por vesícula na associação dos imunolipossomas às células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1.

Determinação da eficiência de associação dos imunolipossomas contendo DOX a células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1 *in vivo*.

Avaliação da inibição da proliferação de células de Glioblastoma Multiforme SK-MG-1 *in vivo* pelo uso de imunolipossomas contendo DOX.

7. Allen, T.M.; Hansen, C.; Martin, F.; Redemann, C. e Yau-Young, A. - *Liposomes Containing Synthetic Lipid Derivatives of Poly(Ethylene Glycol) Show Prolonged Circulation Half-Lives in vivo* - *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1066, p. 29-36, 1991.
8. Allen, T. M.; Hansen, C. B. e Zalipsky, S. - *Antibody-Targeted Stealth Liposomes* - In: Lasic, D. e Martin, F. - *Stealth Liposomes* - CRC Press Inc., Boca Raton, 1995.
9. Alley, M. C.; Scudiero, D. A.; Monks, A.; Hursey, M. L.; Czerwinski, M. J.; Fine, D. L.; Abbott, B. J.; Mayo, J. G.; Shoemaker, R. H. e Boyd, M. R. - *Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay* - *Cancer Research*, vol. 48, p. 589-601, 1988.
10. Alonso, A.; Sáez, R.; Villena, A. e Goñi, F. M. - *Increase in Size of Sonicated Phospholipid Vesicles in the Presence of Detergents* - *J. Membrane Biology*, vol. 67, p. 55-62, 1982.
11. Barenholz, Y. e Crommelin, D. A. - *Liposomes as Pharmaceutical Dosage Forms* - In: Swarbrick, J. e Boylan, J. C. - *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, vol. 9, Marcel Dekker Inc., New York, p. 1-39, 1994.
12. Barth, R. F.; Soloway, A. H. e Fairchild, R. G. - *Perspectives in Cancer Research: Boron Neutron Capture Therapy of Cancer* - *Cancer Research*, vol. 50, p. 1061-1070, 1990.
13. Barth, R. F.; Soloway, A. H.; Fairchild, R. G. e Brugger, R. M. - *Boron Neutron Capture Therapy for Cancer: Realities and Prospects* - *Cancer*, vol. 70, no. 12, p. 2995-3007, 1992.
14. Bergevin, P. R. - *Brain* - In: Bergevin, P. R. e Blom, J. - *Guide to Therapeutic Oncology*, Williams and Wilkins, Baltimore, 492-496, 1979.

15. Blume, G. e Cevc, G. - *Liposomes for the Sustained Drug Release in Vivo* - *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1029, p. 91-97, 1990.
16. Carlsson, J.; Drevin, H. e Axen, R. - *Protein Thiolation and Reversible Protein Conjugation: N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)-propionate, a New Heterobifunctional Reagent* - *Biochem. J.*, vol. 173, p.723-737, 1978.
17. Cairncross, J. G.; Mattes, M. J.; Beresford, R.; Albino, A. P.; Houghton, A. N.; Lloyd, K. O. e Old, L. J. - *Cell Surface Antigens of Human Astrocytoma Defined by Mouse Monoclonal Antibodies: Identification of Astrocytoma Subsets* - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 79, p. 5641-5645, 1982.
18. Chen Jr., P. S.; Toribara, T. Y. e Warner, H. - *Microdetermination of Phosphorus* - *Analytical Chem.*, vol. 28, no. 11, p. 1756-1758, 1956.
19. Coderre, J. A.; Glass, J. D.; Fairchild, R. G.; Micca, P. L.; Fand, I. e Joel, D. D. - *Selective Delivery of Boron by the Melanin Precursor Analogue p-Boronophenylalanine to Tumors Other than Melanoma* - *Cancer Research*, vol. 50, p. 138-141, 1990.
20. Crommelin, D. J. A. e Schreier, H. - *Liposomes* - In: Kreuter, J. - *Colloidal Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker Inc., New York, p. 73-191, 1994.
21. Dawson, R. M. C.; Elliot, D. C.; Elliot, W. H. e Jones, K. M. - *Data for Biochemical Research* - Oxford University Press, 3<sup>a</sup> edição, New York, 1986.
22. Dibner, M.D. - *North Carolina's Biotechnology Industry 1992* - BT Catalyst, janeiro de 1993.
23. Edwards, K.; Almgren, M.; Bellare, J. e Brown, W. - *Effects of Triton X-100 on Sonicated Lecithin Vesicles* - *Langmuir*, vol. 5, p. 473-478, 1989.



24. Edwards, K. e Almgren, M. - *Kinetics of Surfactant-Induced Leakage and Growth of Unilamellar Vesicles* - Progress in Colloid & Polymer Science, vol. 82, p. 190-197, 1990.
25. Edwards, K. e Almgren, M. - *Solubilization of Lecithin Vesicles by  $C_{12}E_8$*  - Journal of Colloid and Interface Science, vol. 147, no. 1, p. 1-21, 1991.
26. Edwards, K. e Almgren, M. - *Surfactant-Induced and Structural Change of Lecithin Vesicles: Effect of Surfactant Headgroup Size* - Langmuir, vol. 8, p. 824-832, 1992.
27. Feakes, D. A.; Shelly, K.; Knobler, C. B. e Hawthorne, M. F. -  *$Na_3[B_{20}H_{17}NH_3]$ : Synthesis and Liposomal Delivery to Murine Tumors* - Proc. Natl. Acad. Sci., vol. 91, p. 3029-3033, 1994.
28. Feakes, D. A.; Shelly, K. e Hawthorne, M. F. - *Selective Boron Delivery to Murine Tumors by Lipophilic Species Incorporated in the Membranes of Unilamellar Liposomes* - Proc. Natl. Acad. Sci., vol. 92, p. 1367-1370, 1995.
29. Firth, G.; Oliver, A. S. e McKeran, R. O. - *Studies on the Intracerebral Injection of Bleomycin Free and Entrapped within Liposomes in the Rat* - Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry, vol. 47, p. 585-589, 1984.
30. Ford Jr., N. C. - *Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy* - R. Pecora (Editor) Plenum Press, New York, p.7-57, 1985.
31. Freshney, I. R. - *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique* - 3ª Edição, Wiley-Liss, Inc., New York, 1994.
32. Fukuda, H.; Ichihashi, M. e Mishima, Y. - *[Neutron Capture Therapy for Cancer]* - Gan To Kagaku Ryoho, vol. 21, no. 3, p. 374-378, 1994.

33. Gabizon, A. e Papahadjopoulos, D. - *Liposome Formulations with Prolonged Circulation Time in Blood and Enhanced Uptake by Tumors* - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 85, p. 6949-6953, 1988.
34. Gabizon, A. e Papahadjopoulos, D. - *The Role of Surface Charge and Hydrophilic Groups on Liposome Clearance in vivo* - Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1103, p. 94-100, 1992.
35. Goñi, F. M. e Alonso, A. - *Surfactant-Induced Liposome Fusion: Molecular Mechanisms and Biotechnological Applications* - Advances in Experimental Medicine & Biology, vol. 238, p. 81-103, 1988.
36. Goren, D.; Gabizon, A. e Barenholz, Y. - *The Influence of Physical Characteristics os Liposomes Containing Doxorubicin on their Pharmacological Behavior* - Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1029, p. 285-294, 1990.
37. Green, S. B.; Byar, D. P.; Walker, M. D. et al.- *Comparisons of Carmustine, Procarbazine and High Dose Methylprednisolone in Addition to Surgery and Radiotherapy for the Treatment of Malignant Gliomas* - Cancer Treatment Reviews., vol. 67, no.2, p. 121-132, 1983.
38. Gregoriadis, G. - *Engineering Liposomes for Drug Delivery: Progress and Problems* - Trends in Biotechnology, vol. 13, p. 527-537, 1995.
39. Grossman, S. - *Chemotherapy of Brain Tumors* - In: Salzman, M. - Neurobiology of Brain Tumors - vol. 4, Williams and Wilkins, p. 321-340, 1991.
40. Hall, I. H.; Gilbert, C. J.; McPhail, A. T.; Morse, K. W.; Hasset, K. e Spielvogel, B. F. - *Antineoplastic Activity of a Series of Boron Analogues of  $\alpha$ -Amino Acids* - Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 74, no. 7, p. 755-758, 1985.
41. Hansch, C. e Leo, A. - *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*, Wiley-Interscience, New York, 1979.

42. Haran, G.; Cohen, R.; Bar, L. K. e Barenholz, Y. - *Transmembrane Ammonium Sulfate Gradients in Liposomes Produce Efficient and Stable Entrapment of Amphipathic Weak Bases* - *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1151, p. 201-215, 1993.
43. Harsh, G. R. I.V.; Levin, V. A.; Gutin, P. H. et al.. - *Reoperation for Recurrent Glioblastoma Multiforme and Anaplastic Astrocytoma* - *Neurosurgery*, vol. 21, p. 615-621, 1987.
44. Hashimoto, Y.; Sugawara, M. e Endoh, H. - *Coating of Liposomes with Subunits of Monoclonal IgM Antibody and Targeting of the Liposomes* - *Journal of Immunological Methods*, vol. 62, p. 155-162, 1983.
45. Hatanaka, H. e Nakagawa, Y. - *Clinical Experience of Boron-Neutron Capture Therapy for Brain Tumors Between 1968 and 1992 (Resumo de Congresso)* - *International Congress of Radiation Oncology*, 21 a 25 de junho, Kyoto, Japão, 1993.
46. Hatanaka, H. e Nakagawa, Y. - *Clinical Results of Long-Surviving Brain Tumor Patients who Underwent Boron-Neutron Capture Therapy* - *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, vol. 28, no. 5, p. 1061-1066, 1994.
47. Hawthorne, F. M. - *The Role of Chemistry in the Development of Boron Neutron Capture Therapy of Cancer* - *Angewandte Chemie (International Edition in English)*, vol. 32, p. 950-984, 1993.
48. Heath, T. D.; Robertson, D.; Birbeck, M. S. C. e Davis, A. J. S. - *Covalent Attachment of Horseradish Peroxidase to the Outer Surface of Liposomes* - *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 599, p. 42-62, 1980.
49. Horowitz, A. T.; Barenholz, Y. e Gabizon, A. - *In vitro Cytotoxicity of Liposome-Encapsulated Doxorubicin: Dependence on Liposome Composition and Drug Release* - *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1109, p. 203-209, 1992.

50. Hoshino, T. - *A Commentary on the Biology and Growth Kinetics of Low Grade and High Grade Gliomas* - Journal of Neurosurgery, vol. 61, pp. 895-900, 1984.
51. Ikeushi, I. e Amano, T. - *A Colorimetric Determination of Boron in Biological Materials* - Chemical and Pharmaceutical Bulletin, vol. 26, p. 2619-2623, 1978.
52. Israelachvili, J.- *Intermolecular & Surface Forces* - 2ª Edição, San Diego, 1994.
53. Israelachvili, J. e Mitchell, D. J. - *A Model for the Packing of Lipids in Bilayer Membranes* - Biochimica et Biophysica Acta, vol. 389, p. 13-19, 1975.
54. Jentoft, N. e Dearborn, D. - *Protein Labeling by Reductive Alkylation* - Methods in Enzymology, vol. 91, p. 570-579, 1983.
55. Jones, M. A.; Singh, A. ; Kilpatrick, P. K. e Carbonell, R. G. - *Preparation and Characterization of Ligand-Modified Labelled Liposomes for Solid Phase Immunoassays* - Journal of Liposome Research, vol. 3, no. 3, p. 793-804, 1993.
56. Klibanov, A. L.; Maruyama, K.; Torchilin, V. P. e Huang, L. - *Amphipatic Polyethyleneglycols Effectively Prolong the Circulation Time of Liposomes* - FEBS Letters, vol. 268, no. 1, p. 235-237, 1990.
57. Lasic, D. D. - *The Mechanism of Vesicle Formation* - Biochem. Journal, vol. 256, p. 1-11, 1988.
58. Lasic, D. D. - *Liposomes* - American Scientist, vol. 80, p. 20-31, 1992.
59. Lasic, D. D. e Martin, F. - *Steath Liposomes* - CRC Press Inc., Boca Raton, 1995.
60. Lasic, D. D.; Martin, F. J.; Gabizon, A.; Huang, S. K. e Papahadjopoulos, D. - *Sterically Stabilized Liposomes: a Hypothesis on*

- the Molecular Origin of the Extended Circulation Times* - *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1070, p. 187-192, 1991.
61. Lee, K. D.; Hong, K. e Papahadjopoulos, D. - *Recognition of Liposomes by Cells: in vitro Binding and Endocytosis Mediated by Specific Headgroups and Surface Charge Density* - *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1103, p. 185-197, 1992.
62. Liu, D.; Mori, A. e Huang, L. - *Large Liposomes Containing Ganglioside GM<sub>1</sub> Accumulate Effectively in Spleen* - *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1066, p. 159-165, 1991.
63. Locher, G. L. - *Biological Effects and Therapeutic Possibilities of Neutrons* - *Amer. J. Roentgenol. Radium Ther.*, vol. 36, no. 1, p. 1-13, 1936.
64. MacDonald, R. C.; MacDonald, R. I.; Menco, B. P. M.; Takeshita, K.; Subbarao, N. K. e Hu, L. - *Small-Volume Extrusion Apparatus for Preparation of Large, Unilamellar Vesicles* - *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1061, p.297-303, 1991.
65. Madden, T. D.; Harrigan, P. R.; Tai, L. C. L.; Bally, M. B.; Mayer, L. D.; Redelmeier, T. E.; Loughrey, H. C.; Tilcock, C. P. S.; Reinish, L. W. e Cullis, P. R. - *The Accumulation of Drugs within Large Unilamellar Vesicles Exhibiting a Proton Gradient: a Survey* - *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 53, p. 37-46, 1990.
66. Martin, F. J. e Papahadjopoulos, D. - *Irreversible Coupling of Immunoglobulin Fragments to Preformed Vesicles* - *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 257, no. 1, p. 286-288, 1982.
67. Matalka, K. Z.; Bailey, M. Q.; Barth, R. F.; Staubus, A. E.; Soloway, A. H.; Moeschberger, M. L.;Coderre, J. A. e Rosftad, E. K. - *Boron Neutron Capture Therapy of Intracerebral Melanoma Using*

- Boronophenylalanine as a Capture Agent* - Cancer Research, vol. 53, p. 3308-3313, 1993.
68. Matalka, K. Z.; Barth, R. F.; Staubus, A. E.; Moeschberger, M. L.; e Coderre, J.A. - *Neutron Capture Therapy of a Rat Glioma Using Boronophenylalanine as a Capture Agent* - Radiation Research, vol. 137, p.44-51, 1994.
69. Mayer, L. D.; Hope, M. J.; Cullis, P. R e Janoff, A. S. - *Solute Distributions and Trapping Efficiencies Observed in Freeze-Thawed Multilamellar Vesicles* - Biochimica et Biophysica Acta, vol. 817, p. 193-196, 1985.
70. Mayer, L. D.; Bally, M. B.; Hope, M. J. e Cullis, P. R. - *Techniques for Encapsulating Bioactive Agents into Liposomes* - Chemistry and Physics of Lipids, vol. 40, p. 333-345, 1986.
71. Mayer, L. D.; Tai, L. C. L.; Ko, D. S. C.; Masin, D.; Ginsberg, R. S.; Cullis, P. R. e Bally, M. B. - *Influence of Vesicle Size, Lipid Composition, and Drug-to-Lipid Ratio on the Biological Activity of Liposomal Doxorubicin in Mice* - Cancer Research, vol. 49, p. 5922-5930, 1989.
72. Mayer, L. D.; Tai, L. C. L.; Bally, M. B.; Mitilenes, G. N.; Ginsberg, R. S. e Cullis, P. R. - *Characterization of Liposomal Systems Containing Doxorubicin Entrapped in Response to pH Gradients* - Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1025, p. 143-151, 1990.
73. Mayer, L. D.; Madden, T. D.; Bally, M. B. e Cullis, P. R. - *pH Gradient-Mediated Drug Entrapment in Liposomes* - In: Gregoriadis, G. - Liposome Technology, 2<sup>a</sup> edição, vol. II, CRC Press Inc., Boca Raton, p. 27-44, 1993.
74. McKeran, R. O.; Firth, G.; Oliver, S.; Uttley, D. e O'Laoire - *A Potential Application for the Intracerebral Injection of Drugs*

- Entrapped within Liposomes in the Treatment of Cerebral Gliomas* - Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, vol. 48, p. 1213-1219, 1985.
75. Morreale, V. M.; Herman, B. H.; Der-Minassian, V.; Palkovitz, M.; Klubes, P.; Perry, D., Csiffary, A. e Lee, A. P. - *A Brain-Tumor Model Utilizing Stereotactic Implantation of a Permanent Cannula* - Journal of Neurosurgery, vol. 78, p. 959-965, 1993.
76. Murthy, K. S. e Zografi, G. - *Oil-Water Partitioning of Chlorpromazine and Other Phenothiazine Derivatives Using Dodecane and n-Octanol* - Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 59, no. 9, p. 1281-1285, 1970.
77. Needham, D.; McIntosh, T. J. e Lasic, D. D. - *Repulsive Interactions and Mechanical Stability of Polymer-Grafted Lipid Membranes* - Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1108, p. 40-48, 1992.
78. New, R. R. C. - *Liposomes: A Practical Approach* - Oxford University Press, Oxford, 1990.
79. Nichols, J. W. e Deamer, D. W. - *Catecholamine Uptake and Concentration by Liposomes Maintaining pH Gradients* - Biochimica et Biophysica Acta, vol. 455, p. 269-271, 1976.
80. Nilsson, K.; Almgren, M.; Brown, W. e Jansson, M. - *Effects of a Non-Ionic Surfactant on Small Unilamellar Lecithin Vesicles* - Mol. Cryst. Liq. Cryst., vol. 152, p. 181-203, 1987.
81. Ohta, S.; Igarashi, S.; Honda, A.; Sato, S e Hanai, N. - *Cytotoxicity of Adriamycin-Containing Immunoliposomes Targeted with Anti-Ganglioside Monoclonal Antibodies* - Anticancer Research, vol. 13, p. 331-336, 1993.
82. Ostro, M. J. - *Liposomes* - Scientific American, vol. 256, no. 1, p. 90-99, 1987 (a).

83. Ostro, M. J. - *Liposomes: from Biophysics to Therapeutics* - Marcel Dekker, New York, 1987 (b).
84. Pagé, B.; Pagé, M. e Noel, C. - *A New Fluorimetric Assay for Cytotoxicity Measurements in vitro* - *International Journal of Oncology*, vol. 3, p. 473-476, 1993.
85. Papahadjopoulos, D.; Allen, T. M.; Gabizon, A.; Mayhew, E.; Matthay, K.; Huang, S. K.; Lee, K. D.; Woodle, M. C.; Lasic, D. D.; Redemann, C. e Martin, F. J. - *Sterically Stabilized Liposomes: Improvements in Pharmacokinetics and Antitumor Therapeutic Efficacy* - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 88, p. 11460-11464, 1991.
86. Physicians' Desk Reference, 47<sup>a</sup> Edição, 1993.
87. Powers, J. D.; Kilpatrick, P. K. e Carbonell, R. G. - *Trypsin Purification by Affinity Binding to Small Unilamellar Liposomes* - *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 36, p. 506-519, 1990.
88. Ruiz, J.; Goñi, F. M. e Alonso, A. - *Surfactant-Induced Release of Liposomal Contents. A Survey of Methods and Results* - *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 937, p. 127-134, 1988.
89. Saez, R.; Goñi, F. M. e Alonso, A. - *The Effect of Bilayer Order and Fluidity on Detergent-Induced Liposome Fusion* - *FEBS Lett.*, vol. 179, no.2, p. 311-315, 1985.
90. Saris, S. C.; Solares, G. R.; Wazer, D. E.; Cano, G.; Kerley, S. E.; Joyce, M. A.; Adelman, L. S.; Harling, O. K.; Madoc-Jones, H. e Zamenhof, R. G. - *Boron Neutron Capture Therapy for Murine Malignant Gliomas* - *Cancer Research*, vol. 52, p. 4672-4677, 1992.
91. Schwendener, R. A.; Trüb, T.; Schott, H.; Langhals, H.; Barth, R. F.; Groscurth, P. e Hengartner, H. - *Comparative Studies of the Preparation of Immunoliposomes with the Use of Two Bifunctional Coupling Agents and Investigation of in vitro Immunoliposome-Target*



- Cell Binding by Cytofluorometry and Electron Microscopy* - Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1026, p. 69-79, 1990.
92. Shelly, K.; Feakes, D. A.; Hawthorne, M. F.; Schmidt, P. G.; Krisch, T.A e Bauer, W. F. - *Model Studies Directed Toward the Boron Neutron-Capture Therapy of Cancer: Boron Delivery to Murine Tumors with Liposomes* - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 89, p. 9039-9043, 1992.
93. Silverman, R. B. - *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Academic Press, Inc., San Diego, CA, p. 26-34, 1992.
94. Simpson, J. R.; Horton, J.; Scott, C et al.. - *Influence of Location and Extent of Surgical Resection on Survival of Patients with Glioblastoma Multiforme : Results of Three Consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) Clinical Trials* - International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics, vol. 26, no. 2, p. 239-244, 1993.
95. Singh, A. K; Kilpatrick, P. K. e Carbonell, R. G. - *Noncompetitive Immunoassays Using Bifunctional Unilamellar Vesicles or Liposomes* - Biotechnol. Prog., vol. 11, p. 333-341, 1995.
96. Steffen, D.M. - *The Effect of Cholesterol, Phosphatidylethanolamine and Immobilized Horseradish Peroxidase on the Stability of Phosphatidylcholine Vesicles when Treated with Nonionic Surfactant* - Tese de mestrado, North Carolina State University, Raleigh, NC, EUA, 1993.
97. Storm , G.; van Bloois, L.; Steerenberg, P. A.; van Etten, E.; de Groot, G. e Crommelin, D. A. J. - *Liposome Encapsulation of Doxorubicin: Pharmaceutical and Therapeutical Aspects* - Journal of Controlled Release, vol. 9, p. 215-229, 1989.

98. Sunamoto, J.; Kondo, H. e Yoshimatsu, A. - *Liposomal Membranes I: Chemical Damage of Liposomal Membranes with Functional Detergent* - *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 510, p. 52-62, 1978.
99. Szoka, F. e Papahadjopoulos, D. - *Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes)* - *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*; vol. 9, p. 467-508, 1980.
100. Talsma, H. e Crommelin, D.J.A. - *Liposomes as Drug Delivery System, Part 1: Preparation* - *BioPharm*, p. 36-47, outubro de 1992 (a).
101. Talsma, H. e Crommelin, D.J.A. - *Liposomes as Drug Delivery System, Part 2: Characterization* - *BioPharm*, novembro-dezembro de 1992 (b).
102. Urbaneja, M. A.; Goñi, F. M. e Alonso, A. - *Structural Changes Induced by Triton X-100 on Sonicated Phosphatidylcholine Liposomes* - *Eur. J. Biochem.*, vol. 173, p. 585-588, 1988.
103. Uyama, I.; Kumai, K.; Yasuda, T.; Tagawa, T.; Ishibiki, K.; Kitajima, M. e Tadakuma, T. - *Improvement of Therapeutic Effect by Using Fab' Fragment in the Treatment of Carcinoembryonic Antigen-Positive Human Solid Tumors with Adriamycin-Entrapped Immunoliposomes* - *Jpn. J. Cancer Res.*, vol. 85, p. 434-440, 1994.
104. Vaage, J.; Barberá-Guillerm, E.; Abra, R.; Huang, A. e Working, P. - *Tissue Distribution and Therapeutic Effect of Intravenous Free or Encapsulated Liposomal Doxorubicin on Human Prostate Carcinoma Xenografts* - *Cancer*, vol. 73, no. 5, p. 1478-1484, 1994.
105. Walker, M. D.; Alexander Jr., E.; Hunt, W. E. et al.. - *Evaluation of BCNU and/or Radiotherapy in the Treatment of Anaplastic Gliomas: a Cooperative Trail* - *Journal of Neurosurgery*, vol. 49, p. 333-343, 1978.
106. Westermark, B.; Nistér, M.; Heldin, N. E. e Heldin, C. H. - *Oncogene Expression and Control of Growth in Malignant Brain Tumors* - In:

- Thomas, D. G. T. - *Neuro-Oncology: Primary Malignant Brain Tumors* - The John Hopkins University Press, Baltimore, p. 26-39, 1990.
107. Woodle, M.; Martin, F. J.; Yan-Young, A. e Redemann, C. T. - *Liposomes with Enhanced Circulation Time* - United States Patent nº5.013.556, p. 1-26, emitida em 07 de maio de 1991.
108. Woodle, M. C.; Collins, L. R.; Sponsler, E.; Kossovsky, N.; Papahadjopoulos, D. e Martin, F. J. - *Sterically Stabilized Liposomes: Reduction in Electrophoretic Mobility But Not Electrostatic Surface Potential* - *Biophysical Journal*, vol. 61, p. 902-910, 1992.
109. Wright, S. e Huang, L. - *Antibody-Directed Liposomes as Drug-Delivery Vehicles* - *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 3, p. 343-389, 1989.
110. Wu, N. Z.; Da, D.; Rudoll, T. L.; Needham, D.; Whorton, A. R. e Dewhirst, M. W. - *Increased Microvascular Permeability Contributes to Preferential Accumulation of Stealth Liposomes in Tumor Tissue* - *Cancer Research*, vol. 53, p. 3765-3770, 1993.
111. Yanagië, H.; Tomita, T.; Kobayashi, H.; Fujii, Y.; Takahashi, T.; Hasumi, K.; Nariuchi, H. e Sekiguchi, M. - *Application of Boronated Anti-CEA Immunoliposome to Tumor Cell Growth Inhibition in in Vitro Boron Neutron Capture Therapy Model* - *The British Journal of Cancer*, vol. 63, no. 4, p. 522-526, 1991.

## ABSTRACT

This work details the preparation and characterization of lipid vesicles (liposomes) designed to the delivery of three therapeutic compounds, o-carboranilpropilamine (CPA), L-p-boronophenylalanine (BPA) and doxorubicin (DOX) to malignant brain tumors. The ability of the three therapeutic compounds to accumulate passively and actively within unilamellar liposomes of different diameters and compositions was evaluated. The influence of the entrappment conditions such as temperature, therapeutic compound/liposomes incubation time and initial therapeutic compound to lipid molar ratio on the encapsulation efficiency is discussed. In order to improve the selectivity of drug action on tumor cells, IgG and IgM antibodies were attached to the surface of DOX loaded liposomes. The toxicity of the prepared systems was evaluated both *in vitro* and *in vivo*, using Glioblastoma Multiforme SK-MG-1 cells and injecting the samples in rats, respectively.

The results demonstrate that the therapeutic compound loading, the number of antibodies bound per liposomes and vesicle stability can be controlled by the experimental procedure. The loadings of BPA, CPA and DOX into liposomes with average diameters of 100 nm were estimated at 10,000, 13,000 and 66,000 molecules per vesicle, respectively. The storage of the liposomes at 4 to 5°C for 1 month did not result in significant therapeutic compound leakage or vesicle aggregation, indicating fairly stable preparations. Up to 6 IgG antibodies and up to 40 IgM subunits were consistently bound per DOX loaded vesicle. The use of liposomes coated with SK-MG-1 specific antibodies resulted in a 17 times increase in cell binding in comparison to liposomes coated with a non-specific antibody. Cell proliferation *in vitro* was

inhibited up to 45% when specific immunoliposomes containing DOX were used. Similar results were obtained for CPA loaded liposomes. Specific deposition of CPA in tumors implanted in rat brains mediated by liposomes is demonstrated. Preliminary results indicated that the injection of liposomes in rats was a relatively safe procedure.