

VILDETE APARECIDA SOUSA CARMO

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E MARCAÇÃO DE
LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS COM TECNÉCIO-99m PARA
IDENTIFICAÇÃO DE FOCOS INFLAMATÓRIOS/
INFECCIOSOS EM MODELOS EXPERIMENTAIS**

BELO HORIZONTE - MG

2007

VILDETE APARECIDA SOUSA CARMO

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E MARCAÇÃO DE
LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS COM TECNÉCIO-99m PARA
IDENTIFICAÇÃO DE FOCOS INFLAMATÓRIOS /
INFECCIOSOS EM MODELOS EXPERIMENTAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador Prof. Dr. Valbert Nascimento
Cardoso

Co-orientadora Profa. Dra. Mônica Cristina de
Oliveira

Belo Horizonte - MG

2007

FOLHA DE APROVAÇÃO

**"Preparação, caracterização e marcação de lipossomas
pH-sensíveis com tecnécio-99m para identificação de
focos inflamatórios/infecciosos em modelos
experimentais"**


VILDETE APARECIDA SOUSA CARMO

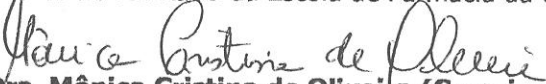
Tese aprovada em 09/11/2007 pela Comissão Examinadora constituída
pelos seguintes membros:


Prof. Dr. Frédéric Jean Georges Frézard
Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG


Prof. Dr. Carlos Jorge Simal Rodrigues
Departamento de Propedêutica Complementar da Faculdade de Medicina da UFMG


Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana
Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP


Profa. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira
Departamento de Farmácia da Escola de Farmácia da UFOP


Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira (Co-orientadora)
Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da UFMG


Dr. Valbert Nascimento Cardoso (Orientador)
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG

Aos meus filhos, Glauber e Mariane, que diariamente, me dispensam amor, amizade, alegria e apoio. Vocês são muito preciosos!

Aos meus pais, Vicente e Sebastiana (in memoriam), exemplos de coragem e dignidade.

As minhas irmãs Vilma, Vânia, Vera e Ângela que estão sempre ao meu lado, vibrando com as minhas conquistas, enfim, fazendo parte da minha vida!

A todos vocês, dedico esta tese.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar e abençoar sempre os meus caminhos.

Ao Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso, meu orientador, pelos ensinamentos, amizade, confiança e otimismo diante das adversidades que surgiram.

A Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira, minha co-orientadora, por sua amizade e acolhimento. A sua persistência, disponibilidade e confiança foram os estímulos necessários para a construção do meu trabalho.

Ao meu marido Luís Carlos do Carmo pelo apoio, incentivo e compreensão das horas ausentes.

A Profa. Dra. Marilene S. M. Michalick, do Laboratório de Sorologia do ICB/UFMG, e aos Professores Dra. Tânia M. P. Guimarães e Dr. Vicente Toledo, do Laboratório de Imunologia da FaFar/UFMG, pela colaboração nos ensaios de ativação do complemento.

Aos Profs Dr. Carlos Jorge R. Simal, Dr. Frédéric Jean G. Frézard e Dr. Lucas Antônio M. Ferreira, da minha banca de qualificação, pelas críticas e sugestões.

Aos pesquisadores Dra. Margareth Spangler e Dr. José M. C. Vilela, do Laboratório de Nanoscopia do CETEC, pelo apoio na execução das imagens por microscopia de força atômica.

Ao Prof. Dr. Alfredo J. A. Barbosa, do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina/UMFG, pela ajuda na obtenção das imagens histológicas.

Ao Prof. Dr. Marcelo Santoro e ao Técnico Jamil, do Laboratório de Físico-química das Proteínas do ICB/UFMG, pela disponibilização da ultracentrífuga.

Às amigas, Profa Celeyda M. B. Barbosa e Farm. Sônia M. L. da Silva, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando nos melhores e, principalmente, nos momentos mais difíceis. Obrigada pela amizade e incentivo!

Ao Técnico Eduardo de Cássio Oliveira Reis, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da FaFar/UFMG, pela inestimável ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas da Faculdade de Farmácia: Ms. Simone O. F. Diniz, Dra. Elzília de A. Nunan, Dr. Gilson A. Ramaldes e Dr. Lucas A. M. Ferreira pelo apoio, sugestões e incentivo.

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas da FaFar/UFMG pela colaboração.

Ao Dr. Cristiano F. Siqueira e funcionárias da Clínica Ecograf, pelo fornecimento do Tecnécio-99m e apoio na realização das imagens cintilográficas.

Às colegas e funcionárias do Laboratório de Radioisótopos, em especial, Luciene e Maira, pela convivência e ajuda de sempre.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa da Farmacotécnica, em especial, Erly, Ricardo, Samuel e Álvaro, pelo apoio, amizade e grande torcida.

Aos bolsistas de Iniciação Científica: Lívia S. Oliveira, Fernanda P. Sepe, Fernanda Amorim, Bianca D. David e Luis P. Freire, pela ajuda nos trabalhos experimentais.

À médica veterinária Maria Adelaide Fernandes e ao funcionário José Batista Viturino, do Biotério da FaFar/UFMG, que sempre estiveram prontos a me ajudar.

Ao CNPQ e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro.

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho

“A utopia está no horizonte. Aproximo-me dois passos, ela afasta-se dois passos. Caminho dez passos e o horizonte afasta-se dez passos. Por muito que caminhe, nunca a alcançarei. Para que serve a utopia? Para isto: serve para caminhar.”

Eduardo Galeano

RESUMO

A caracterização físico-química de lipossomas pH-sensíveis convencionais e de longa circulação (DOPE/CHEMS e aPEG₂₀₀₀-DSPE ou mPEG₂₀₀₀-DSPE/DOPE/CHEMS, respectivamente) bem como de lipossomas não-pH-sensíveis convencionais e de longa circulação (DOPC/COL e aPEG₂₀₀₀-DSPE ou mPEG₂₀₀₀-DSPE/DOPC/COL ou mPEG₂₀₀₀-DSPE/HSPC/COL, respectivamente) mostrou diâmetro médio das vesículas compreendido entre 99,8 nm e 124,3 nm, apresentando boa homogeneidade (índice de polidispersão $\leq 0,25$). O potencial zeta foi negativo para todas as preparações, exceto para os lipossomas modificados com aPEG₂₀₀₀-DSPE, os quais apresentaram potencial zeta positivo. As imagens de microscopia de força atômica mostraram que os lipossomas pH-sensíveis convencionais são propensos à agregação das vesículas. Estudos *in vitro* da interação do sistema complemento com os lipossomas foram realizados em soro de rato usando um ensaio hemolítico. Os lipossomas não-pH-sensíveis convencionais e de longa circulação ativaram o sistema complemento enquanto os lipossomas pH-sensíveis convencionais e de longa circulação mostraram ser menos ativadores do complemento. Estudos de biodistribuição e imagens cintilográficas foram realizados para avaliar a habilidade de lipossomas pH-sensíveis de longa circulação, constituídos por mPEG₂₀₀₀-DSPE/DOPE/CHEMS, e marcados com tecnécio-99m (^{99m}Tc) para identificar sítios de inflamação e infecção em modelos experimentais. Lipossomas pH-sensíveis de longa circulação contendo glutatona foram marcados com ^{99m}Tc-Hexametilpropileno amino oxima (^{99m}Tc-HMPAO). Os lipossomas pH-sensíveis de longa circulação radiomarcados (^{99m}Tc-LpHS) foram administrados por via intravenosa em ratos e camundongos após indução dos processos inflamatório e infeccioso, respectivamente. Nos estudos de biodistribuição os animais foram sacrificados em intervalos de tempos pré-estabelecidos e os tecidos removidos para determinação da radioatividade em um cintilador de poço. As imagens cintilográficas foram obtidas em diferentes tempos após administração intravenosa dos ^{99m}Tc-LpHS. Os ^{99m}Tc-LpHS foram significativamente captados pelos órgãos do sistema fagocitário mononuclear (baço e fígado). Além disso, a captação dos ^{99m}Tc-LpHS no foco inflamatório e no abscesso foi significativamente maior quando comparada aos respectivos controles ($p < 0,05$) e as lesões foram visualizadas nas imagens

cintilográficas em 30 minutos após injeção dos ^{99m}Tc -LpHS. A relação alvo/não-alvo da radioatividade contada nas regiões de interesse foi superior a 1,5 para todos os tempos investigados. Esses resultados indicam que os ^{99m}Tc -LpHS apresentam alto tropismo para regiões inflamadas e infectadas e podem ser úteis como um radiofármaco para auxiliar no diagnóstico de processos inflamatórios e infecciosos.

Palavras-chave: lipossomas pH-sensíveis, tecnécio-99m, inflamação, infecção, cintilografia, sistema complemento.

ABSTRACT

Physicochemical characterization of conventional and long-circulating pH-sensitive liposomes (DOPE/CHEMS and aPEG₂₀₀₀-DSPE or mPEG₂₀₀₀-DSPE/DOPE/CHEMS, respectively) as well as conventional and long-circulating non-pH-sensitive liposomes (DOPC/COL and aPEG₂₀₀₀-DSPE or mPEG₂₀₀₀-DSPE/DOPC/COL, or mPEG₂₀₀₀-DSPE/HSPC/COL, respectively) showed mean diameter vesicles between 99.8nm and 124,3nm, presenting good homogeneity (polydispersity index $\leq 0,25$). The zeta potential was negative in all liposomes preparations, except in liposomes modified with aPEG₂₀₀₀-DSPE, which presented a positive zeta potential. Atomic force microscopy images showed that conventional pH-sensitive liposomes are prone to aggregation of vesicles. *In vitro* studies of the interaction of the complement system with the liposomes were performed using a hemolytic assay in rat serum. The non-pH-sensitive liposomes activated the complement system while pH-sensitive liposomes shown to be poor activators of complement in rat serum. Studies of biodistribution and scintigraphic imaging were performed to evaluate the ability of long-circulating pH-sensitive liposomes composed of mPEG₂₀₀₀-DSPE/DOPE/CHEMS and labeled with technetium-99m (^{99m}Tc) to identify inflammatory and infectious sites in experimental models. Preformed glutathione-containing long-circulating pH-sensitive liposomes were labeled with ^{99m}Tc-Hexamethylpropyleneamine oxime (^{99m}Tc-HMPAO). The radiolabeled long-circulating pH-sensitive liposomes (^{99m}Tc-SpHL) were administered intravenously after inflammatory and infectious foci were induced in rats and mice, respectively. In the biodistribution studies, the animals were killed at pre-established time intervals, and tissues were removed and analyzed for ^{99m}Tc content using an automatic scintillation apparatus. Scintigraphic imaging was performed at different times after injection of ^{99m}Tc-SpHL. A significantly amount of ^{99m}Tc-SpHL was taken up by organs of the mononuclear phagocyte system (spleen and liver). Moreover, the ^{99m}Tc-SpHL uptake was significantly higher in the inflamed and infected regions when compared to the respective controls ($p < 0.05$), and the lesions could be visualized scintigraphically at 30 minutes after injection. The ratio of the target/no-target radioactivity counts was superior to 1.5 at all times investigated. This result indicates that the ^{99m}Tc-SpHL

presents a high tropism for inflammation and infection sites and may be useful as a radiopharmaceutical to identify these foci.

Key words: pH-sensitive liposomes, technetium-99m, inflammation, infection, scintigraphy, complement system.

LISTA DE FIGURAS

[REVISÃO BIBLIOGRÁFICA]

1	Gerador de ^{99}Mo / $^{99\text{m}}\text{Tc}$	26
2	Representação ilustrativa de uma vesícula lipossomal.....	30
3	Representação esquemática de lípides na forma cilíndrica como fosfatidilcolina (A) e na forma de cone como fosfatidiletanolamina (B).....	34
4	Estrutura química do hemisuccinato de colesterila (CHEMS). A – Forma protonada (meio ácido); B – Forma ionizada (meio neutro).....	35
5	Representação esquemática de lipossomas-PEG marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ através da incorporação de um agente quelante na superfície (A) ou pelo uso do complexo lipofílico HMPAO (B). PEG - polietilenoglicol; HMPAO-Hexametilpropileno amino oxima.....	37
6	Imagens cintilográficas de ratos com abscesso na coxa induzido por <i>S. aureus</i> após injeção intravenosa de pertecnetato de sódio (A) e de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -lipossomas aniônicos (B).....	39
7	Representação esquemática da cascata do sistema complemento.....	45
8	Diagrama esquemático da configuração PEG sobre a superfície de uma partícula. A - Configuração <i>mushroom</i> (baixa concentração do conjugado PEG); B - Configuração <i>brush-like</i> (alta concentração do conjugado PEG).....	49

[CAPITULO I]

1	Diagrama esquemático da reação de ativação do complemento em soro de rato exposto aos lipossomas.....	58
2	Imagens topográficas de lipossomas compostos de DOPE/CHEMS obtidas por microscopia de força atômica (modo contato intermitente) sobre substrato mica. A - Visão tridimensional. B - Perfil topográfico (10 x 10 μm).....	65
3	Imagens topográficas de lipossomas compostos de mPEG ₂₀₀₀ -DSPE/DOPE/CHEMS obtidas por microscopia de força atômica (modo contato intermitente) sobre substrato mica. A - Visão tridimensional. B - Perfil topográfico (10 x 10 μm). 66	66
4	Imagens topográficas de lipossomas compostos de aPEG ₂₀₀₀ -DSPE/DOPE/CHEMS obtidas por microscopia de força atômica (modo contato intermitente) sobre substrato mica. A - Visão tridimensional. B - Perfil topográfico (10 x 10 μm). 67	67
5	Consumo de complemento em soro de rato (1:3) previamente incubado (30 min, 37 ^o C) com lipossomas pH-sensíveis ou não convencionais em diferentes concentrações. A atividade do complemento residual, expressa como % lise dos eritrócitos, foi medida pela hemólise de eritrócitos de carneiro sensibilizados com anticorpos.....	69
6	Diagrama esquemático da interação de fosfolípides (DPPC) com hemisuccinato de colesterila (CHEMS) e colesterol (CHOL).....	70
7	Consumo de complemento em soro de rato (1:3) previamente incubado (30 min, 37 ^o C) com lipossomas pH-sensíveis ou não de longa circulação em diferentes concentrações. A atividade do complemento residual, expressa como % lise dos eritrócitos, foi medida pela hemólise de eritrócitos de carneiro sensibilizados com anticorpos.....	72

[CAPITULO II]

- 1 Inflamação da pata direita de rato Wistar, 4 horas após administração subplantar de 0,05 mL de suspensão de carragenina a 1% (p/v)..... 81
- 2 Microfotografias de tecidos da pata normal (**A**) e inflamada (**B**) de rato Wistar, 4 horas após injeção subplantar de solução estéril de NaCl a 0,9% (p/v) e suspensão de carragenina a 1% (p/v), respectivamente. As amostras foram fixadas em formaldeído a 4% (v/v), incluídas em parafina e cortes de 5 µm foram corados com hematoxilina-eosina..... 82
- 3 Imagens cintilográficas de rato Wistar com inflamação na pata direita induzida por carragenina em 2, 4 e 8 horas após injeção de ^{99m}Tc-LpHS..... 85
- 4 Análise quantitativa (média ± d.p.) das imagens cintilográficas de ratos injetados com ^{99m}Tc-LpHS após injeção subplantar de carragenina (n=5). **A** - Atividade retida no foco inflamatório (PD = pata direita) e na área contralateral não inflamada (PE = pata esquerda). **B** - Relação alvo/não-alvo..... 86

[CAPITULO III]

- 1 Imagens cintilográficas (visão ventral) de camundongo Swiss com infecção por *S. aureus* no músculo da coxa direita nos tempos de 30 minutos, 1, 2, 4, 6 e 18 horas após injeção dos ^{99m}Tc-LpHS..... 101
- 2 Análise quantitativa das imagens cintilográficas de camundongos com infecção por *S. aureus* no músculo da coxa direita após injeção intravenosa de ^{99m}Tc-LpHS (n = 5). **A** - Relações abscesso/não-alvo calculadas a partir da análise do ROI das imagens. **B** - Percentagem de atividade no abscesso determinada a partir da análise do ROI das imagens..... 102

[APÊNDICE A]

- 1 Curva de calibração do doseamento de fósforo pelo método de Bartlett (1959)..... 122

LISTA DE TABELAS

[CAPITULO I]

- 1 Composição lipídica, razão molar e tipo de preparação de lipossomas..... 56
- 2 Diâmetro, índice de polidispersão, mobilidade eletroforética e potencial zeta e de lipossomas pH-sensíveis convencionais e de longa circulação bem como de lipossomas não-pH-sensíveis convencionais e de longa circulação..... 62

[CAPITULO II]

- 1 Resultados da biodistribuição dos ^{99m}Tc -LpHS e ^{99m}Tc -HMPAO livre em ratos com inflamação na pata direita induzida por carragenina (n = 5)..... 84

[CAPITULO III]

- 1 Biodistribuição dos ^{99m}Tc -LpHS administrados por via intravenosa em camundongos Swiss com infecção, induzida por *S. aureus*, no músculo da coxa direita (n = 3)..... 99

[APÊNDICE A]

- 1 Composição, razão molar e resultado da concentração de fosfolípidos das preparações de lipossomas analisadas..... 123

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

^{67}Ga	gálio-67
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	tecnécio-99 metaestável
HMPAO	hexametilpropileno amino oxima
PEG	polietilenoglicol
keV	quiloelétron-volts
^{111}In	índio-111
^{99}Mo	molibdênio-99
p/v	peso por volume
mSv	milisievert
LUV	<i>large unilamellar vesicles</i>
nm	nanômetro
SUV	<i>small unilamellar vesicles</i>
MLV	<i>multilamellar vesicles</i>
SFM	sistema fagocitário mononuclear
mPEG-DSPE	metoxipolietilenoglicol-diestearilfosfatidiletanolamina
aPEG-DSPE	aminopolietilenoglicol-diestearilfosfatidiletanolamina
T_H	temperatura de transição de fase
PE	fosfatidiletanolamina
CHEMS	hemisuccinato de colesterila
H_{II}	fase hexagonal invertida
COL	colesterol
DOPE	dioleilfosfatidilcolina
DTPA	ácido dietilenotriaminopentacético
HYNIC	hidrazinonicotinamida
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
PI	fostadilinositol
HPC	fosfatidilcolina hidrogenada
EPG	fosfatidilglicerol de ovo
EPC	fosfatidilcolina de ovo
HSA	albumina humana
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
μmol	micromol
kg	quilograma
IgG	imunoglobulina gama
CLM	complexo lítico de membrana
Fc	<i>fragment crystalline</i>
IgM	imunoglobulina M
PCR	proteína C reativa
APS	amilóide P de soro
MBP	<i>mannose binding proteins</i>
IgE	imunoglobulina E
CARPA	<i>Complement Activation-Related Pseudoallergy</i>
mL	mililitro
RHS	reação de hipersensibilidade
MFA	microscopia de força atômica
SC	sistema complemento

DOPC	dioleilfosfatidilcolina
HSPC	fosfatidilcolina de soja totalmente hidrogenada
mM	milimolar
μL	microlitro
μm	micrômetro
CETEC-MG	Centro Tecnológico de Minas Gerais
Khz	quilohertz
Hz	hertz
CH50	ensaio hemolítico
CETEA	Comitê de Ética para Experimentação Animal
SH	sistema hemolítico
STV ²⁺	tampão veronal contendo 0,5 mM de MgCl ₂ e 0,15 mM de CaCl ₂
d.p.	desvio padrão
nmol	nanomol
ANOVA	análise de variância
^{99m} Tc-LpHS	lipossomas pH-sensíveis de longa circulação radiomarcados com ^{99m} Tc
DI	dose injetada
GSH	glutathiona
MBq	megabecquerel
v/v	volume por volume
cpm	contagem por minuto
ROI	regiões de interesse
UFC	unidades formadoras de colônia
e.p.	erro padrão

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	14
INTRODUÇÃO	19
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
1 INFLAMAÇÃO E INFECÇÃO	22
1.1 Aspectos Fisiopatológicos da Inflamação/Infecção.....	22
1.2 Diagnóstico de Inflamação/Infecção por Cintilografia.....	22
1.2.1 Tecnécio-99m.....	26
1.2.2 Radiofármacos convencionais.....	27
2 LIPOSSOMAS	29
2.1 Lipossomas de Longa Circulação.....	32
2.2 Lipossomas pH-Sensíveis.....	33
2.3 Lipossomas Radiomarcados.....	36
2.3.1 Lipossomas radiomarcados para diagnóstico de inflamação/ infecção.....	38
3 SISTEMA COMPLEMENTO	44
3.1 Ativação do Complemento.....	45
3.2 Interação de Lipossomas com o Sistema Complemento.....	46
4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO/INFECÇÃO	50
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTUDOS <i>IN VITRO</i> DE INTERAÇÕES DE LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS COM O SISTEMA COMPLEMENTO	52
RESUMO	52
1 INTRODUÇÃO	53
2 MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1 Material.....	55
2.2 Métodos.....	55
2.2.1 Preparação dos lipossomas.....	55
2.2.2 Caracterização dos lipossomas.....	56
2.2.3 Estudos <i>in vitro</i> da atividade do complemento.....	58
2.3 Análise Estatística.....	61
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.1 Caracterização dos Lipossomas.....	62

3.1.1 Diâmetro e potencial zeta.....	62
3.1.2 Imagens de MFA.....	64
3.2 Estudos <i>in vitro</i> da Atividade do Complemento.....	68
4 CONCLUSÃO.....	73

CAPÍTULO II – ESTUDO DE BIODISTRIBUIÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE SÍTIOS INFLAMATÓRIOS USANDO LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE LONGA CIRCULAÇÃO MARCADOS COM TECNÉCIO-99m..... 74

RESUMO.....	74
1 INTRODUÇÃO.....	75
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	76
2.1 Material.....	76
2.2 Métodos.....	77
2.2.1 Preparação dos lipossomas.....	77
2.2.2 Procedimento de marcação.....	78
2.2.3 Modelo animal.....	78
2.2.4 Estudos histopatológicos.....	79
2.2.5 Estudos de biodistribuição.....	79
2.2.6 Identificação de sítios de inflamação.....	80
2.3 Análise Estatística.....	80
3 RESULTADOS.....	81
3.1 Caracterização dos ^{99m} Tc-LpHS.....	81
3.2 Estudos Histopatológicos.....	81
3.3 Biodistribuição.....	82
3.4 Identificação de Sítios de Inflamação.....	84
4 DISCUSSÃO.....	87
5 CONCLUSÃO.....	89

CAPÍTULO III – LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE LONGA CIRCULAÇÃO MARCADOS COM TECNÉCIO-99m: UMA NOVA ESTRATÉGIA PARA IDENTIFICAR INFECÇÃO EM MODELO EXPERIMENTAL..... 90

RESUMO.....	90
1 INTRODUÇÃO.....	91
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	93
2.1 Material.....	93
2.2 Métodos.....	93
2.2.1 Preparação dos lipossomas.....	93
2.2.2 Procedimento de marcação.....	94
2.2.3 Preparo da suspensão de <i>Staphylococcus aureus</i>	95
2.2.4 Modelo animal.....	95
2.2.5 Estudos de biodistribuição.....	96

2.2.6 Estudos de imagem.....	96
2.3 Análise Estatística.....	97
3 RESULTADOS.....	98
3.1 Caracterização dos ^{99m} Tc-LpHS.....	98
3.2 Estudos de Biodistribuição.....	98
3.3 Estudos de Imagem.....	99
4 DISCUSSÃO.....	103
5 CONCLUSÃO.....	105
CONCLUSÕES INTEGRADAS E PERSPECTIVAS.....	106
1 CONCLUSÕES INTEGRADAS.....	106
2 PERSPECTIVAS.....	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108
APÊNDICE A – Método espectrofotométrico para dosagem de fosfolípides.....	121
APÊNDICE B – Produção bibliográfica e técnica.....	124

INTRODUÇÃO

O diagnóstico rápido e preciso de processos inflamatórios e infecciosos pode diminuir o curso dessas doenças, reduzir a morbidade e a mortalidade, o tempo de hospitalização e o custo total do tratamento. Na perspectiva da saúde pública pode, também, reduzir o uso inadequado de antibióticos no tratamento. Além disso, a localização precisa das lesões pode ser útil na orientação de procedimentos de biópsia e, ainda, alterar substancialmente o plano de tratamento (DUMAREY et al., 2006). Nesse sentido, a medicina nuclear é de grande importância uma vez que os métodos cintilográficos detectam alterações fisiológicas e patológicas, permitindo o diagnóstico de uma lesão inflamatória/infecciosa no estágio inicial bem como a sua localização e natureza (BOERMAN et al., 2001; CORSTENS e VAN DER MEER, 1999; RENNEN et al., 2001).

Atualmente, para a detecção cintilográfica de processos inflamatórios/infecciosos em pacientes, os radiotraçadores mais comumente utilizados são o Citrato marcado com Gálio-67 (^{67}Ga -Citrato) e os leucócitos marcados com Tecnécio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)-Hexametilpropileno amino oxima (HMPAO). Entretanto, esses radiofármacos apresentam alguns inconvenientes, tais como riscos de contaminação do manipulador, tempo de preparo prolongado e trabalhoso, baixa especificidade e alta dose de exposição. Por isso, existe uma investigação contínua na busca de novos e melhores radiofármacos que possibilitem auxiliar no diagnóstico de processos inflamatórios e infecciosos com maior sensibilidade, especificidade e acurácia além de facilidade e segurança no seu manuseio (BOERMAN et al., 2001; LOVE e PALESTRO, 2004; PHILLIPS, 1998; RENNEN et al., 2001; STORM et al., 1998; VAN EERD et al., 2005).

A potencialidade do uso de lipossomas para a liberação direcionada de fármacos e agentes de diagnóstico foi vislumbrada logo após sua descoberta por Bangham na década de 60 (PHILLIPS, 1999). Os lipossomas são pequenas vesículas consistindo de uma ou mais bicamadas lipídicas que envolvem um pequeno espaço aquoso e são formados espontaneamente quando fosfolípidos são suspensos em meio

aquoso (ANSEL et al., 2000). O desenvolvimento de lipossomas revestidos com o polímero hidrofílico polietilenoglicol (PEG), também conhecidos como lipossomas de longa circulação, ampliou muito a aplicação dessas preparações (LAVERMAN et al., 2000).

A utilização de lipossomas em medicina nuclear requer a sua marcação com um radionuclídeo emissor de radiação gama, preferencialmente o ^{99m}Tc . Diferentes métodos para marcar lipossomas com radioisótopos foram desenvolvidos, dentre os quais se destacam aqueles que utilizam a incorporação de quelantes na bicamada dos lipossomas ou o transporte do radioisótopo através da bicamada para o compartimento aquoso sendo, assim, encapsulado (BOERMAN et al., 2000).

Estudos em diferentes modelos experimentais têm demonstrado a habilidade de lipossomas radiomarcados de se acumularem em focos inflamatórios e infecciosos, permitindo a sua identificação por meio de imagens cintilográficas (BOERMAN et al., 2000, 2001; OYEN et al., 1996_{a,b}).

As avaliações clínicas indicaram que os ^{99m}Tc -lipossomas de longa circulação podem constituir-se em um novo radiofármaco para identificação de focos de inflamação e infecção pelo método cintilográfico. Entretanto, a ocorrência de efeitos adversos em alguns pacientes, expressos como reações de hipersensibilidade e atribuídos à ativação do sistema complemento, têm impedido a sua utilização na prática clínica (BOERMAN et al., 2000; BROUWERS et al., 2000; DAMS et al., 2000_b; MOGHIMI e SZEBENI, 2003).

Várias características físico-químicas dos lipossomas têm sido descritas como responsáveis pela indução da ativação do sistema complemento pelas vias clássica e alternativa, com os conseqüentes efeitos relacionados à aceleração da depuração e aos efeitos adversos observados após injeção de preparações lipossomais (AWASTHI et al., 2003; DEVINE e BRADLEY, 1998; MOGHIMI e SZEBENI, 2003; NAGAYASU et al., 1999; SZEBENI, 2005).

Os lipossomas pH-sensíveis têm sido estudados como uma estratégia para liberação intracelular de drogas em tecidos patológicos, tais como em áreas inflamadas ou

infectadas, os quais apresentam menor pH em relação aos tecidos normais (SIMÕES et al., 2004). Assim, esses lipossomas apresentam potencial aplicação como carreadores de agentes de imagem para diagnóstico de inflamação/infecção.

No presente trabalho foi realizada a caracterização físico-química de lipossomas pH-sensíveis convencionais e de longa circulação bem como de lipossomas não-pH-sensíveis convencionais e de longa circulação. Foi avaliada, pela primeira vez, a potencialidade de aplicação dos lipossomas pH-sensíveis de longa circulação marcados com ^{99m}Tc -HMPAO como radiofármaco para identificação, por cintilografia, de focos inflamatórios e infecciosos em modelos experimentais. Tendo em vista que a utilização prática desse radiotraçador poderia ficar comprometida devido a interação com componentes do complemento e conseqüente indução dos efeitos adversos, como descrito em estudos anteriores, foram realizados estudos *in vitro* da interação do sistema complemento com lipossomas pH-sensíveis convencionais e de longa circulação bem como com lipossomas não-pH-sensíveis convencionais e de longa circulação. Como controle positivo desse estudo foi usado uma formulação de lipossomas cuja capacidade de induzir reações de hipersensibilidade após sua administração é amplamente relatada.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 INFLAMAÇÃO E INFECÇÃO

1.1 Aspectos Fisiopatológicos da Inflamação/Infecção

As doenças caracterizadas por inflamação são importantes causa de morbidade e mortalidade do homem e, por isso, os processos envolvidos nos mecanismos de defesa dessas doenças bem como os métodos que auxiliem no seu diagnóstico foram e continuam sendo objeto de muitos estudos experimentais (CIRINO, 1998; DUMAREY et al., 2006; LOVE e PALESTRO, 2004).

Inflamação é um processo bioquímico e celular que ocorre em tecidos vascularizados como uma reação do organismo a algum tipo de agente agressor, enquanto que a infecção caracteriza-se pela invasão e multiplicação de microrganismos nos tecidos. As lesões celulares podem ser causadas por traumas, privação de oxigênio ou nutrientes, defeitos genéticos ou imunológicos, agentes químicos, microrganismos, temperaturas extremas, partículas estranhas ou radiação ionizante (ROTE, 1998; VAN DER LAKEN et al., 1998). Pode ocorrer infecção sem inflamação, por exemplo, no caso de pacientes imunodeprimidos. Por outro lado, pode ocorrer inflamação sem infecção quando a lesão do tecido não está associada à invasão de microrganismos, mas provocada por outro estímulo. Em resposta à lesão do tecido, vários mecanismos de defesa envolvendo células (leucócitos) e proteínas plasmáticas (opsoninas, anticorpos, fatores do complemento) são ativados. Posteriormente, uma complexa variedade de mediadores vasoativos e quimiotáticos está envolvida neste processo. Esses mediadores são moléculas geradas no foco da inflamação/infecção e amplificam a resposta local pelo recrutamento de células e componentes plasmáticos do sangue. A vasodilatação e a permeabilidade endotelial aumentada são induzidas para facilitar o extravasamento de proteínas e células (RENNEN et al., 2001; VAN DER LAKEN et al., 1998).

Descritos desde a antiguidade, os sinais e sintomas da inflamação incluem eritema (rubor), edema, calor, dor e perda da função. As alterações a nível celular envolvem uma série de eventos na microcirculação (arteríolas, capilares e vênulas) da área lesada, com aumentada permeabilidade vascular, exsudação de fluidos incluindo as proteínas plasmáticas, e migração de leucócitos para o sítio da lesão (CIRINO, 1998; ROTE, 1998).

A inflamação pode ser aguda ou crônica. Inflamação aguda é a resposta inicial e imediata do organismo a um agente que causa a lesão tecidual, apresentando uma duração relativamente curta (minutos, algumas horas ou poucos dias). Uma vez que os dois maiores componentes defensivos (anticorpos e leucócitos) são normalmente carregados no sistema circulatório é de se esperar que o fenômeno vascular exerça papel fundamental na inflamação aguda, sendo caracterizado por: alterações no calibre vascular que levam ao aumento do fluxo sangüíneo no local; alterações estruturais na microvasculatura, aumentando sua permeabilidade e, conseqüentemente, permitindo que proteínas plasmáticas e leucócitos deixem a circulação; migração de leucócitos, predominantemente neutrófilos, e seu acúmulo na área afetada (quimiotaxia) (COLLINS, 1999).

A inflamação crônica é freqüentemente definida como uma inflamação de longa duração, presente por semanas ou meses. Ela pode ser precedida de uma fase aguda ou pode iniciar-se como um processo insidioso ou subclínico. A característica da resposta celular no processo inflamatório crônico é diferente do processo agudo, estando associada histologicamente à presença de células predominantemente mononucleares (linfócitos, monócitos e macrófagos), com a proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose de tecidos (COLLINS, 1999; RENNEN et al., 2001; VAN DER LAKEN et al., 1998).

1.2 Diagnóstico de Inflamação/Infecção por Cintilografia

A identificação e a localização precoce de focos infecciosos e inflamatórios são fatores importantes para o tratamento adequado de pacientes com suspeita ou portadores desses processos (VAN EERD, 2005). Embora, em alguns casos, o

diagnóstico seja óbvio com base na história clínica e exame físico do paciente, em outros se torna mais difícil pela ausência de sintomas ou por esses não serem específicos. O diagnóstico de uma lesão inflamatória no estágio inicial, a sua localização e natureza têm relevantes conseqüências na prática clínica uma vez que possibilita iniciar, precocemente, a intervenção terapêutica específica e monitorar sua eficácia, além de prevenir outras complicações decorrentes do processo inflamatório (CHIANELLI et al., 1997; RENNEN et al., 2005; SIGNORE et al., 2002).

Os processos de inflamação e infecção podem ser detectados por técnicas radiológicas como tomografia computadorizada, imagens de ressonância magnética e ultra-sonografia. Entretanto, essas técnicas são dependentes de alterações anatômicas, não discriminando processos inflamatórios ou infecciosos ativos de alterações anatômicas devido a processos curados ou remanescentes de cirurgias. Além disso, elas não são capazes de auxiliar no diagnóstico das doenças inflamatórias ou infecciosas na fase inicial de desenvolvimento, quando alterações anatômicas ainda não estão presentes e fornecem informações de apenas uma parte do corpo (SIGNORE et al., 2002; VAN DER LAKEN et al., 1998).

O estudo de processos inflamatórios por técnicas de medicina nuclear é de grande importância para a medicina clínica. O objetivo da medicina nuclear no campo da inflamação/infecção é o desenvolvimento de métodos não invasivos para a detecção *in vivo* de células e tecidos específicos. Assim, ao contrário das técnicas radiológicas, a imagem cintilográfica, que se baseia em alterações funcionais fisiológicas ou bioquímicas dos tecidos, constitui um excelente método não invasivo de exploração do corpo inteiro. Desta forma, permite de maneira precoce tanto a localização quanto a determinação do número de focos inflamatórios e infecciosos em todas as partes do corpo (BOERMAN et al., 2001; CORSTENS e VAN DER MEER, 1999; RENNEN et al., 2001; VAN DER LAKEN et al., 1998).

Em medicina nuclear, os compostos radiomarcados (radiofármacos) são administrados aos pacientes para fins terapêuticos ou para visualizar processos fisiopatológicos, como é o caso do diagnóstico de inflamação e infecção. Nesse caso, os radiofármacos são marcados com um radionuclídeo emissor de radiação gama (fótons) com energia apropriada [100-500 quiloelétron-volts (keV)]. Após a sua

administração, o radiofármaco é distribuído pelo organismo e por meio de uma gama-câmara pode-se realizar a detecção dos raios gama e, assim, a farmacocinética do radiofármaco pode ser determinada. Como a distribuição *in vivo* do radiofármaco é determinada pelas características fisiológicas dos tecidos, este pode fornecer importantes informações sobre vários tecidos de forma não invasiva (BOERMAN et al., 2000).

O radiofármaco ideal para imagem de sítios de inflamação/infecção deve apresentar as seguintes características: acumular-se eficientemente e ter boa retenção no foco inflamatório; fornecer rápido delineamento do foco e da extensão da lesão; não acumular-se em tecidos não inflamados/infectados; ter rápida depuração da radiação de fundo; não apresentar efeitos colaterais; ser de fácil preparação e sem riscos para o manipulador; fornecer baixa carga de radiação; ser de fácil obtenção e de baixo custo (BOERMAN et al., 2001; CORSTENS e VAN DER MEER, 1999; RENNEN et al., 2001).

No diagnóstico de inflamações, o acúmulo e a retenção do radiofármaco no sítio da inflamação podem ocorrer por mecanismos específicos ou não específicos. Os processos específicos compreendem interações entre o radiofármaco e o alvo. Entre os radiofármacos que apresentam esse mecanismo destacam-se os leucócitos marcados com índio-111 (^{111}In) ou $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e ciprofloxacino marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Nos mecanismos não específicos para detecção de inflamações o radiofármaco chega até o alvo devido ao aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular da área lesada e envolvem os radiofármacos ^{67}Ga -Citrato, imunoglobulinas não específicas e lipossomas radiomarcados (CORSTENS e VAN DER MEER, 1999; RENNEN et al., 2001).

Em medicina nuclear, tanto experimental quanto clínica, os isótopos que emitem raios gama são os mais comumente usados. Emissores gama tais como $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In e isótopos do Iodo (^{123}I , ^{125}I ou ^{131}I) constituem os radionuclídeos que podem ser visualizados através da gama-câmara (imagem cintilográfica *in vivo*) e quantificados por contagem direta nas amostras de tecidos em um contador gama. Cerca de 80% dos radiofármacos usados em medicina nuclear são compostos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (OYEN et al., 2001).

1.2.1 Tecnécio-99m

O tecnécio, com número atômico 43, é um metal de transição e, portanto, apresenta como características diferentes estados de oxidação (de -1 a +7) e a capacidade de formação de complexos metais-doadores que são compostos formados pela ligação entre o metal deficiente de elétrons com átomos ou grupos funcionais (aminas, amidas, tióis, fosfinas, oximas e isonitrilas) capazes de doar pares de elétrons (ARAÚJO, 1998).

O radioisótopo tecnécio-99m (^{99m}Tc), isótopo metaestável de um elemento artificial, é obtido a partir de um gerador de Molibdênio-99 (^{99}Mo) contendo uma coluna de alumina (Figura 1). Para eluição da resina utiliza-se solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v), fazendo a extração do ^{99m}Tc sob a forma de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$), ou seja, no seu estado de oxidação mais alto (+7), não sendo capaz de ligar-se a agentes quelantes. Assim, é necessária a sua redução por meio de agentes redutores tais como cloreto estanoso (SnCl_2) ou boridreto de sódio (NaBH_4), entre outros (DEUTSCH, 1983).



Figura 1. Gerador de ^{99}Mo / ^{99m}Tc .
Fonte: IPEN – CNENSP

O ^{99m}Tc possui um único fóton de energia equivalente a 140 keV, decaindo para ^{99}Tc de meia-vida longa ($2,1 \times 10^5$ anos) e emissor de radiação beta com energia de 290 keV. Assim, a dose de radiação absorvida pelo paciente é baixa, resultando em doses efetivas menores que 50 mSv que apresentam risco considerado baixo (STANFORD DOSIMETRY, LCC). Ainda, a energia emitida pelo ^{99m}Tc se ajusta perfeitamente à eficiência dos detectores de iodeto de sódio usados nas gama-câmaras e a dosimetria permite a utilização de doses suficientes para que muitos fótons estejam presentes durante o exame e favoreçam deste modo, a realização de imagens bem definidas em um espaço de tempo relativamente curto (JONES, 1995).

O amplo uso desse marcador é resultado da sua disponibilidade, baixo custo e, ainda, por apresentar características nucleares e físicas extremamente favoráveis: emissão de raios gama de 140 keV, meia-vida curta (6 horas) e com baixo risco de radiação tanto para o paciente quanto para o médico (OYEN et al., 2001; SHUKLA, 1983).

1.2.2 Radiofármacos convencionais

A medicina nuclear é conhecida por sua alta sensibilidade e, atualmente, dispõe de técnicas que são capazes de revelar a presença de inflamação em várias condições patológicas. Entretanto, a sensibilidade e a especificidade das diferentes técnicas variam em função da doença e seus efeitos fisiopatológicos, fazendo com que os radiofármacos apresentem diferentes acurácias de diagnóstico (CHIANELLI et al., 1997).

Nas duas últimas décadas, alguns radiofármacos foram desenvolvidos para obtenção de imagens de inflamação e infecção, sendo usados rotineiramente na prática clínica o ^{67}Ga -Citrato e os leucócitos autólogos marcados com ^{111}In ou ^{99m}Tc .

O ^{67}Ga -Citrato tem sido usado para imagem de inflamação/infecção desde sua descoberta em 1971. A captação fisiológica desse radiofármaco ocorre no fígado, intestino, ossos e medula óssea, sendo excretado parcialmente por via renal e pelo trato gastrointestinal. O mecanismo de captação consiste na ligação do ^{67}Ga -Citrato à

transferrina plasmática até chegar ao sítio da inflamação onde se une a lactoferrina liberada *in situ* pelos leucócitos e/ou aos sideróforos produzidos pelos microrganismos (CORSTENS e VAN DER MEER, 1999). Embora a técnica que utiliza o ^{67}Ga -Citrato tenha uma alta sensibilidade e baixo custo, ela apresenta deficiências que limitam sua aplicação clínica. A sua especificidade é baixa, com captação ativa no trato urinário e gastrointestinal, a obtenção de imagens nítidas requer 72 horas após sua administração, além do radionuclídeo apresentar uma meia-vida longa (78 horas) e uma radiação gama de alta energia para fins de diagnóstico. Essas características desfavoráveis, associadas ao desenvolvimento de novos radiofármacos, têm limitado sua aplicação clínica somente a algumas condições patológicas tais como infecções dos pulmões e desordens esqueléticas crônicas (BOERMAN et al., 2001; CHIANELLI et al., 1997; RENNEN et al., 2001).

McAfee e Thakur (1976) desenvolveram uma técnica para marcar leucócitos autólogos *in vitro* com ^{111}In utilizando oxinato como quelante para transferir o radionuclídeo para o interior da célula (^{111}In -leucócitos). Os leucócitos marcados com ^{111}In apresentam boa estabilidade, entretanto esse radionuclídeo é pouco disponível, tem alta energia de radiação e apresenta meia-vida relativamente longa (2,8 dias) para procedimentos de diagnóstico.

Em 1986, Peters et al. desenvolveram o HMPAO, um quelante lipofílico que possibilita uma eficiente marcação de leucócitos com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO-leucócitos). Ao contrário do ^{111}In -oxinato, os leucócitos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO não são estáveis, sendo o complexo liberado da célula em uma proporção de 7% por hora o qual retorna para a corrente sanguínea e é excretado através dos rins e intestino (SIGNORE et al., 2002). Dessa forma, o emprego de leucócitos marcados com ^{111}In fica restrito, praticamente, à avaliação de afecções do sistema urinário, sendo substituído pelo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO-leucócitos para avaliação de inflamações e infecções em outros sistemas orgânicos (CORSTENS e VAN DER MEER, 1999; RENNEN et al., 2001).

Estudos mostraram que o método dos leucócitos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO apresenta uma especificidade de 100% e uma sensibilidade maior que 95% para imagens de focos inflamatórios ou infecciosos. O mecanismo de captação dos

leucócitos é por quimiotaxia e, portanto, representa um indicador específico para infiltração leucocítica, mas não para infecção. Em virtude dos excelentes resultados obtidos com o uso dos leucócitos marcados com ^{99m}Tc -HMPAO, essa técnica é considerada, em medicina nuclear, “padrão ouro” para imagens de inflamação e infecção (CARDOSO et al., 2002; MARTIN-COMIN e PRATS, 1999). Entretanto, a preparação desse radiotraçador requer equipamentos especializados, consistindo de um complexo procedimento de marcação com um longo tempo de preparação (3 h), além de apresentar riscos para o técnico manipulador em decorrência da necessidade de manusear sangue potencialmente contaminado que pode levar a transmissão de doenças tais como hepatite, síndrome da imunodeficiência adquirida, entre outras (BOERMAN et al., 2001; RENNEN et al., 2001).

As limitações desses radiofármacos convencionais têm estimulado a pesquisa de novos agentes para o diagnóstico de inflamação ou infecção visando evitar a manipulação de sangue potencialmente infectado, usar moléculas pequenas com rápida depuração de forma a permitir uma resposta rápida, desenvolver agentes que interaja com receptores, distinguir inflamação asséptica de infecção e usar agentes marcados com ^{99m}Tc . Entre esses novos radiofármacos encontram-se os lipossomas radiomarcados que se caracterizam como radiotraçadores não específicos para imagem de inflamação/infecção, uma vez que sua localização no foco inflamatório resulta da maior permeabilidade vascular no local e não de uma interação específica entre o radiotraçador e um componente do foco inflamatório, como ocorre com o uso dos leucócitos (RENNEN et al., 2001).

2 LIPOSSOMAS

Durante estudos de difusão de cátions e ânions através de lípides, Bangham et al. (1965) observaram que determinados lípides em meio aquoso se organizavam espontaneamente em bicamadas formando vesículas esféricas circundando uma cavidade aquosa interna e um meio aquoso externo, semelhante às membranas biológicas (Figura 2). Desde então, essas vesículas passaram a ser utilizadas como modelo de membrana biológica e foram denominadas lipossomas. Em 1971, Gregoriadis et al. propuseram a utilização de lipossomas como carreadores de

fármacos. A partir daí, diversos estudos foram feitos visando verificar as suas potencialidades terapêuticas, tais como carrear quimioterápicos, antibióticos, fungicidas, antígenos e compostos quelantes entre outros (ADLER-MOORE e PROFFITT, 1993; ALVING, 1992; FATTAL et al., 1993; RAHMAN e WRIGHT, 1975).

A grande potencialidade terapêutica dos lipossomas deve-se a sua versatilidade estrutural em termos de tamanho, composição lipídica, carga superficial, fluidez da membrana e sua capacidade de incorporar tanto fármacos lipofílicos na membrana lipídica, quanto fármacos hidrossolúveis no compartimento aquoso interno. A membrana lipídica dos lipossomas é capaz de controlar a liberação de moléculas hidrofílicas encapsuladas na cavidade aquosa, por difusão lenta, assim como de moléculas lipofílicas, em função da ação dos líquidos corporais sobre a integridade das membranas (ANSEL et al., 2000).

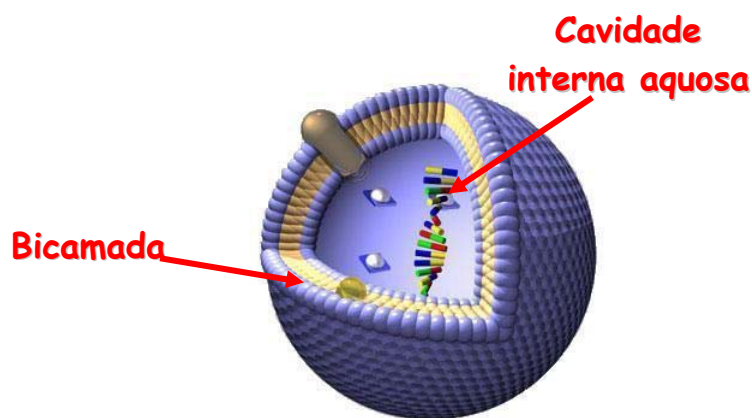


Figura 2. Representação ilustrativa de uma vesícula lipossomal.

Dependendo do processo de preparação, os lipossomas podem apresentar apenas um compartimento aquoso circundado por uma bicamada lipídica ou podem, ainda, serem constituídos por várias bicamadas lipídicas e aquosas concêntricas. Aqueles que contêm apenas uma bicamada lipídica são denominados unilamelares de grande tamanho (LUV - *Large Unilamellar Vesicles*), com tamanhos variando entre 100 a 1000 nm, ou unilamelares de pequeno tamanho (SUV - *Small Unilamellar*

Vesicles), em geral menor que 100 nm. Os lipossomas que possuem mais de uma bicamada lipídica são denominados multilamelares (MLV - *Multilamellar Vesicles*) e apresentam tamanho superior a 100 nm (NEW, 1990).

A estabilidade físico-química dos lipossomas é diretamente afetada pelas alterações envolvendo a distribuição populacional das partículas, a lamelaridade, a permeabilidade, a estrutura bilamelar e o volume interno (OLIVEIRA, 1998). Assim, é importante efetuar uma caracterização físico-química da preparação.

A administração de lipossomas pode ser realizada por diferentes vias, como a transdérmica, a nasal, a pulmonar, a oral e, principalmente, a via intravenosa. A farmacocinética e a biodistribuição dos lipossomas são influenciadas pela via de administração e por suas características, que incluem o tamanho da vesícula, a composição, a concentração lipídica, a carga superficial e o grau de hidrofília, e ainda, da sua capacidade de encapsulação (BOERMAN et al., 2000; OUSSOREN et al., 1997).

Pesquisas sobre o comportamento *in vivo* dos “lipossomas clássicos” ou “convencionais” mostraram que eles se acumulam rapidamente nas células do Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM), particularmente no fígado, baço e medula óssea (tecidos ricos em macrófagos), e são rapidamente eliminados, o que limita a sua utilização para outros tecidos (ALLEN e HANSEN, 1991; SENIOR e ALVING, 1987). Acredita-se que a depuração relativamente rápida desses lipossomas seja resultante da sua opsonização no sistema circulatório, facilitando o seu rápido reconhecimento e remoção (PATEL, 1992; SZEBENI, 1998). Investigações iniciadas na década de 90 foram realizadas com o objetivo de reduzir a captação dos lipossomas convencionais pelas células do SFM e aumentar seu tempo de permanência na circulação. Nesses estudos, tornou-se evidente que a incorporação de certos glicolípides na membrana dos lipossomas (PAPAHADJOPOULOS, 1992), modificações químicas na sua superfície (LASIC e PAPAHADJOPOULOS, 1995) ou no interior das membranas (SANTAELLA et al., 1993) produziam lipossomas com meia-vida mais longa e capazes de escapar ao SFM.

2.1 Lipossomas de Longa Circulação

Avanços nos estudos relativos à biofísica das membranas permitiram o desenvolvimento de lipossomas com a superfície modificada de tal modo que não sejam reconhecidos pelas células do SFM. Esses lipossomas, denominados “lipossomas de longa circulação”, representaram o maior passo para a sua aplicação *in vivo*. A primeira geração desses lipossomas continha monosialogangliosídeo GM1 com a finalidade de torná-los similares aos eritrócitos (ALLEN e CHONN, 1987) e foram denominados lipossomas *stealth* (marca registrada pela Liposome Technology Inc).

Entretanto, problemas comerciais desses lipossomas *stealth* levaram à busca de alternativas menos onerosas e clinicamente seguras. Isso resultou no desenvolvimento da segunda geração de lipossomas de longa circulação, que contêm derivados lipídicos do polímero hidrofílico polietilenoglicol (PEG), sendo o metoxiPEG-diestearilfosfatidiletanolamina (mPEG-DSPE) o derivado de escolha para a preparação de lipossomas estericamente estabilizados (KLIBANOV et al., 1990; WOODLE e LASIC, 1992). Esses lipossomas são conhecidos como lipossomas estericamente estabilizados ou mPEG-lipossomas. A presença de volumosos grupos hidrofílicos na superfície dos lipossomas parece constituir um obstáculo estérico às proteínas do plasma que podem atuar como opsoninas. Conseqüentemente, os lipossomas ficam protegidos do reconhecimento e destruição pelas células do SFM (STORM et al., 1995). Devido a sua capacidade de evadir-se do SFM, aos mPEG-lipossomas, também chamados de lipossomas *stealth*, são atribuídas propriedades de longa circulação, independente da composição lipídica e da carga superficial (LAVERMAN et al., 2000). Entretanto, estudos demonstraram que a concentração do conjugado PEG na composição da membrana e o tamanho da cadeia do polímero afetam as características de longa circulação desses lipossomas. Para o mPEG₂₀₀₀-DSPE, estudos mostram que concentrações entre 5 e 7,5 mol% são suficientes para reduzir a opsonização (BRADLEY et al., 1998; MARUYAMA et al., 1992; MOGHIMI et al., 2001; SEMPLE et al., 1998).

O derivado aminoPEG-DSPE (aPEG-DSPE) é composto pelo PEG com um grupo amino terminal. Nesse derivado, o grupo amino é protonado em meio fisiológico e,

assim, é carregado positivamente, resultando em um derivado neutro devido à carga negativa do grupo fosfato do fosfolípide. Contudo, lipossomas contendo aPEG-DSPE apresentam superfície positiva (ZALIPSKY et al., 1994). Estudos da biodistribuição de lipossomas contendo esse derivado, realizados em ratos, mostraram que são bem tolerados *in vivo*, sem perda da circulação prolongada e sem desvios significativos na biodistribuição quando comparados com lipossomas contendo mPEG-DSPE (ZALIPSKY et al., 1994).

Assim, a característica dos lipossomas revestidos com PEG de permanecerem mais tempo na circulação, uma vez que não são reconhecidos pelo SFM, faz deles um poderoso instrumento para auxiliar no diagnóstico de processos inflamatórios ou infecciosos (BOERMAN et al., 1997; CORSTENS e VAN DER MEER, 1999; RENNEN et al., 2001).

2.2 Lipossomas pH-Sensíveis

O princípio básico de lipossomas pH-sensíveis consiste em introduzir na composição de sua bicamada lípidos que são intrinsecamente instáveis, ou seja, que não são capazes de formar bicamada numa determinada temperatura, conhecida como temperatura de transição de fase hexagonal (T_H). A obtenção da fase lamelar para estes lípidos é conseguida pela adição de compostos que são carregados em pH neutro, mas que perdem sua carga em condições onde o pH é ácido e, portanto, a sua capacidade de estabilizar a bicamada (NEW et al., 1990).

A classe de formulação de lipossomas pH-sensíveis mais estudada consiste na associação de lípidos polimórficos tais como fosfatidiletanolamina (PE) insaturadas, com compostos anfifílicos fracamente ácidos como, por exemplo, ácido oléico ou hemisuccinato de colesterila (CHEMS), que atuam como estabilizadores da membrana em pH neutro (DRUMOND et al., 2000).

As PE insaturadas, ao contrário da maioria dos fosfolípidos, apresentam uma cabeça polar pequena e pouco hidratada, ocupando um volume menor quando comparado ao volume ocupado pelas cadeias alifáticas, dessa forma exibindo uma forma de

cone, o que impede a formação da fase lamelar (Figura 3). Essa forma cônica das moléculas de PE favorece a formação de fortes interações intermoleculares entre os grupos amina e fosfato da cabeça polar, justificando a forte tendência destas moléculas para adquirir a fase hexagonal invertida (H_{II}) em temperaturas acima da T_H (DRUMOND et al., 2000; FATTAL et al., 2004; SIMÕES et al., 2004).

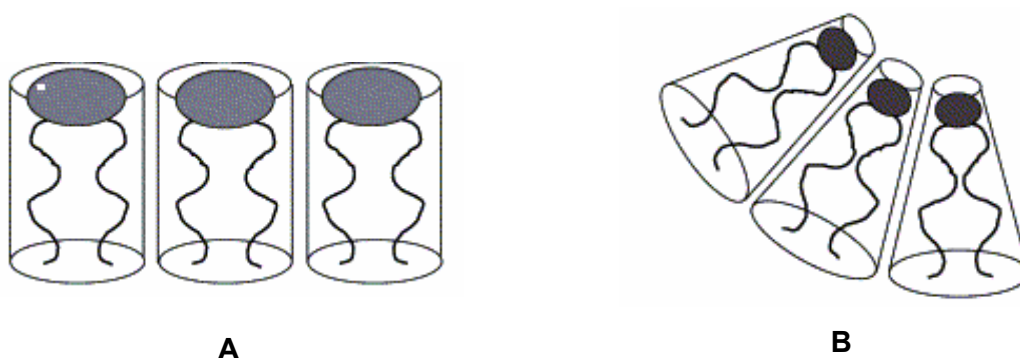


Figura 3. Representação esquemática de lípidos na forma cilíndrica como fosfatidilcolina (**A**) e na forma de cone como fosfatidiletanolamina (**B**). Fonte: FATTAL (2004)

O CHEMS é um éster derivado do colesterol (COL) que em pH neutro apresenta carga negativa (Figura 4), o que permite estabilizar membranas contendo DOPE por meio de repulsões eletrostáticas. Entretanto, em meios fracamente ácidos tais como aqueles encontrados no lúmen de endossomas e em alguns tecidos patológicos (tumores, áreas inflamadas ou infectadas), o CHEMS torna-se protonado, resultando na desestabilização da membrana lipídica levando a formação da fase H_{II} , as quais apresentam propriedades fusogênicas (DING et al., 2005; DRUMOND et al., 2000; SIMÕES et al., 2004).

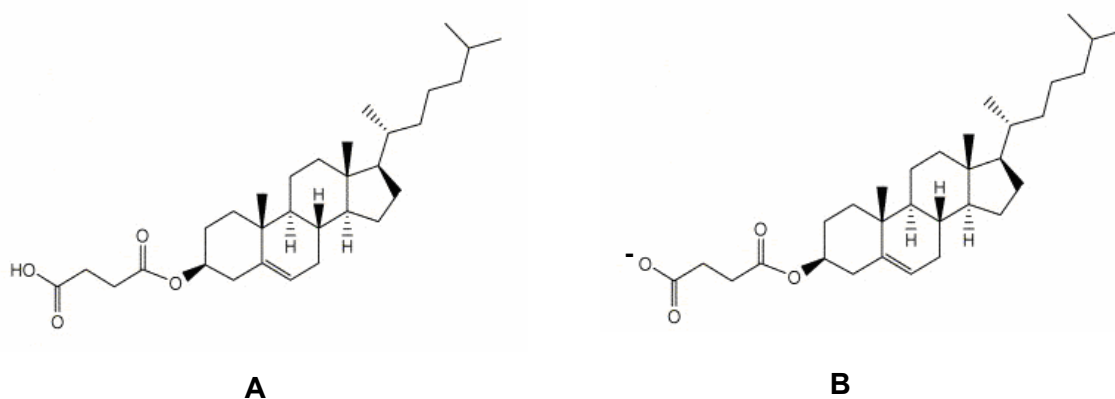


Figura 4. Estrutura química do hemisuccinato de colesterila (CHEMS). **A** – Forma protonada (meio ácido); **B** – Forma ionizada (meio neutro).

Os lipossomas pH-sensíveis foram desenvolvidos para promover a liberação de seu conteúdo, em geral moléculas muito hidrofílicas ou macromoléculas, dentro do citoplasma após a endocitose e, desta forma, melhorar a eficiência terapêutica de muitas drogas que exercem seu efeito a nível intracelular (DRUMOND et al., 2000; ROUX et al., 2004; SIMÕES et al., 2004).

Embora tenha sido demonstrado que os lipossomas pH-sensíveis compostos de PE são eficientes em liberar diversas moléculas no citoplasma, sua aplicação *in vivo* é limitada devido a sua moderada estabilidade e/ou rápida remoção pelo SFM após administração intravenosa. Entretanto, estudos têm demonstrado que a inclusão de conjugados lipídicos, como o polietilenoglicol acoplado ao diestearilfosfatidiletanolamina (PEG-DSPE), aumenta a estabilidade *in vivo* de lipossomas pH-sensíveis, proporcionando maior tempo de circulação e, ainda, mantendo suas propriedades de pH-sensibilidade até atingir o tecido alvo (FATTAL et al., 2004; ROUX et al., 2004; SIMÕES et al., 2004; SLEPUSHKIN et al., 1997).

2.3 Lipossomas Radiomarcados

Os lipossomas podem ser marcados pela simples adição do radionuclídeo de escolha no meio aquoso que é usado para hidratar os lípides. Esse método foi usado para marcar lipossomas com ^{99m}Tc por Torchilin e Trubetskoy (1995), porém ele apresenta duas grandes desvantagens. A primeira porque somente uma pequena fração do radiomarcador é incorporada na fase aquosa interna e, conseqüentemente, a eficiência de marcação é baixa (menor que 10%) e a segunda por ser um método muito trabalhoso, pois requer a preparação de novos lipossomas em todos os experimentos.

Assim, estratégias foram desenvolvidas para marcar lipossomas pré-formados com alta eficiência. Em geral, são usados dois métodos diferentes para marcar lipossomas pré-formados. O primeiro consiste em marcá-los pelo acoplamento do radiomarcador na bicamada lipídica, diretamente na superfície ou por meio de um quelante. No segundo método, o radionuclídeo é transportado através da bicamada lipídica e encapsulado na fase aquosa interna dos lipossomas (Figura 5).

Morgan et al. (1981) foram os primeiros a marcar lipossomas unilamelares com ^{99m}Tc , pela redução do pertecnetato de sódio com cloreto estanoso e seu acoplamento direto na superfície da bicamada. Porém, em estudos com animais, essas preparações lipossomais radiomarcadas apresentaram alta captação nos rins e bexiga, sugerindo extensa liberação *in vivo* do ^{99m}Tc dos lipossomas. A instabilidade dos lipossomas radiomarcados por esse método foi confirmada por outros pesquisadores (AHKONG e TILCOCK, 1992; LOVE et al., 1989).

Outro método para marcar lipossomas consiste em encapsular o radionuclídeo no espaço interno aquoso de lipossomas pré-formados. Para realizar o transporte do radionuclídeo através da bicamada lipídica, esse deve estar na forma lipofílica. Hwang et al. (1982) mostraram que o ^{67}Ga pode ser transportado através da bicamada na forma de um complexo lipofílico ^{67}Ga -oxinato e pode ser irreversivelmente encapsulado quando o quelante hidrofílico desferoxamina está presente na fase aquosa dos lipossomas preparados. Utilizando o mesmo princípio, Phillips et al. (1992) desenvolveram outra técnica para marcar lipossomas com

^{99m}Tc . Nesse estudo, os autores utilizaram o quelante lipofílico HMPAO, formando um complexo ^{99m}Tc -HMPAO que também foi capaz de atravessar a bicamada dos lipossomas pré-formados. Quando os lipossomas continham glutathiona na fase interna, o complexo ^{99m}Tc -HMPAO era reduzido para sua forma hidrofílica e como resultado ocorria sua retenção, de forma irreversível, no interior dos lipossomas (Figura 5B). Esse método mostrou-se reprodutível, produzindo lipossomas radiomarcados com ^{99m}Tc mais estáveis *in vivo* do que os métodos citados anteriormente. Além disso, sua eficiência de marcação é alta, sendo de aproximadamente 85% (PHILLIPS et al., 1992).

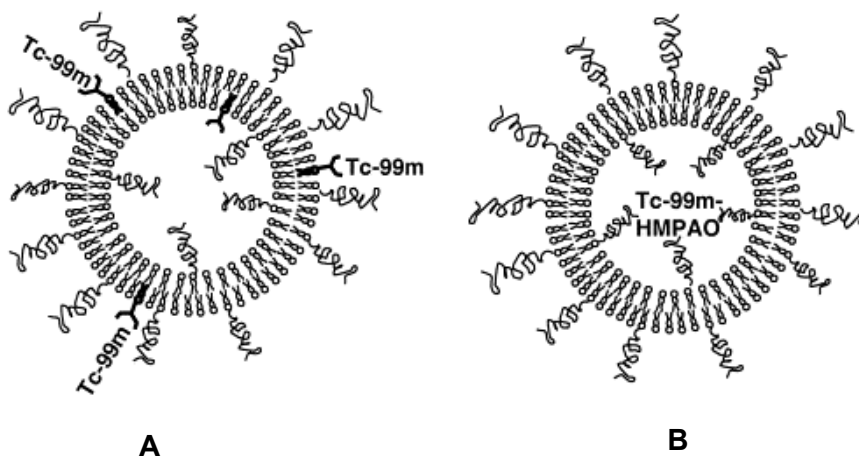


Figura 5. Representação esquemática de lipossomas-PEG marcados com ^{99m}Tc através da incorporação de um agente quelante na superfície (A) ou pelo uso do complexo lipofílico HMPAO (B). PEG – polietilenoglicol; HMPAO-Hexametilpropilenoamina oxima. Fonte: BOERMAN (2000)

A marcação dos lipossomas com radionuclídeos pode, ainda, ser realizada pela inclusão de agentes quelantes tais como o ácido dietilenotriaminapentacético (DTPA) ou hidrazinonicotinamida (HYNIC) à bicamada lipídica (Figura 5A). O quelante é conjugado ao componente lipídico da bicamada, antes da preparação dos lipossomas. Após hidratação dos lípidos o quelante fica exposto na superfície externa dos lipossomas favorecendo a ligação do radionuclídeo. Os lipossomas contendo o conjugado HYNIC-DSPE incorporado na bicamada foram marcados com

=====
^{99m}Tc com alta eficiência (> 90%), em somente 15 minutos de incubação à temperatura ambiente. Nos estudos realizados em ratos infectados por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), a captação do radiomarcador nos rins foi três vezes menor com os lipossomas marcados via HYNIC quando comparada com os lipossomas marcados via HMPAO, sugerindo reduzida liberação do radiomarcador dos lipossomas (LAVERMAN et al., 1999).

2.3.1 Lipossomas radiomarcados para diagnóstico de inflamação/infecção

O uso de lipossomas como carreador de agentes de imagem para diagnóstico requer que eles mantenham sua estabilidade e apresentem uma meia-vida de circulação sanguínea longa, proporcionando uma máxima deposição no tecido alvo com conseqüente aumento do contraste entre os tecidos normal e doente (AWASTHI et al., 2003).

Para que um sítio infeccioso ou inflamado possa ser diagnosticado por imagem cintilográfica é necessário que ele tenha uma quantidade de radioatividade acima da atividade da radiação de fundo dos tecidos normais. Em geral, deve-se ter uma relação alvo/não-alvo de pelo menos 1,5 para permitir a identificação de uma lesão por imagem cintilográfica (PHILLIPS et al., 1999). Lipossomas que apresentam vida média plasmática em torno de 4 horas têm sido sugeridos como carreadores de agentes de imagem para focos de inflamação. Esse tempo seria suficiente para que os lipossomas se acumulassem no sítio inflamatório e, também, para que ocorresse a depuração sanguínea, resultando na obtenção de imagens mais nítidas das lesões (PHILLIPS et al., 1999). A vida média plasmática dos lipossomas pode ser modificada e otimizada por meio de alterações das suas características de tamanho e superfície.

Os estudos utilizando lipossomas como veículos para imagem de inflamação ou infecção iniciaram-se há mais de 20 anos. As primeiras investigações foram realizadas por Morgan et al. (1981) em ratos infectados com *S. aureus* (Figura 6). Nesse estudo, lipossomas convencionais unilamelares aniônicos, catiônicos e neutros foram marcados com ^{99m}Tc pelo método do cloreto estano. Eles

observaram uma significativa captação dos lipossomas aniônicos na área do abscesso quando comparada com a correspondente área não afetada, enquanto os lipossomas catiônicos e neutros não apresentaram a mesma captação. A captação máxima no abscesso, para os lipossomas aniônicos, foi obtida em 30 minutos após a injeção (MORGAN et al., 1981).

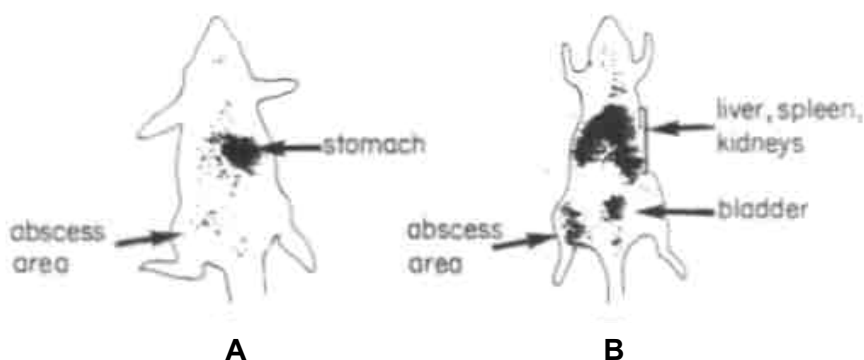


Figura 6. Imagens cintilográficas de ratos com abscesso na coxa induzido por *S. aureus* após injeção intravenosa de pertecnetato de sódio (A) e de ^{99m}Tc -lipossomas aniônicos (B). Fonte: MORGAN (1981)

Bakker-Woudenberg et al. (1992) estudaram a biodistribuição de lipossomas, com diferentes composições lipídicas, em modelos de ratos com pneumonia unilateral causadas por *Klebsiella pneumoniae*. Embora os estudos tenham sido inicialmente desenvolvidos para investigar se a administração desses lipossomas resultava em significativa concentração nos tecidos infectados, os experimentos proporcionaram a compreensão das características lipossomais que facilitam a sua captação pelos tecidos infectados. Lipossomas com diâmetro aproximado de 100 nm, compostos de fosfatidilinositol hidrogenada/fosfatidilcolina hidrogenada/colesterol (PI/HPC/COL) foram comparados com lipossomas compostos por fosfatidilglicerol de ovo/fosfatidilcolina de ovo/COL (EPG/EPC/COL). A formulação de maior tempo de circulação (PI/HPC/COL) mostrou uma captação significativamente alta no pulmão infectado em relação à formulação de menor circulação (EPG/EPC/COL). Subseqüentemente, o comportamento dos lipossomas PI/HPC/COL foi comparado com lipossomas de longa circulação num modelo de infecção do pulmão. Nesse

estudo foi observado que, nos pulmões infectados os lipossomas de longa circulação apresentaram uma captação dez vezes maior do que para os lipossomas convencionais em 40 horas após administração dos radiofármacos (BAKKER-WOUDENBERGER et al., 1993).

Estudos em vários modelos animais têm mostrado que lipossomas de longa circulação se localizam em sítios de inflamação e de infecções bacterianas ou fúngicas. Tem sido sugerido que esses lipossomas apresentam amplo extravasamento em focos infecciosos e inflamatórios devido ao aumento da permeabilidade vascular nessas áreas. Porém, o mecanismo de retenção dos lipossomas nesses sítios não é conhecido. Uma possível explicação pode ser a de que os lipossomas sejam fagocitados pelos leucócitos presentes na área afetada, mantendo-os no local (ERDORGAN et al., 2000; GOINS et al., 1993). Utilizando técnicas de microscopia ótica e microscopia eletrônica de transmissão, Laverman et al. (2001) demonstraram que lipossomas de longa circulação localizam-se preferencialmente em abscessos intramusculares infectados por *S. aureus*, sugerindo que a sua captação e a sua retenção no abscesso ocorre devido ao aumento da permeabilidade vascular e subsequente fagocitose dos lipossomas pelos macrófagos do tecido infectado.

Goins et al. (1993) avaliaram lipossomas de longa circulação para imagens de focos infecciosos usando ratos infectados por *S. aureus* nos quais foram injetados lipossomas com diâmetros de 185 nm, ricos em colesterol e marcados com ^{99m}Tc pelo método HMPAO. O desempenho desses lipossomas foi comparado com dois outros radiofármacos convencionais, o ^{67}Ga -Citrato e a ^{99m}Tc -Albumina humana (HSA). A meia-vida da formulação lipossomal foi de 10 horas. A relação abscesso/músculo foi da ordem de 35 com 24 horas após injeção, sendo muito maior do que aquelas obtidas com os agentes convencionais (8,0 e 4,1 para ^{99m}Tc -HSA e ^{67}Ga -Citrato, respectivamente). A captação dos lipossomas radiomarcados foi relativamente baixa no fígado (1% da dose injetada/g de tecido) e significativamente alta no baço (39% da dose injetada/g de tecido) em 24 horas após injeção.

As características de imagem de lipossomas de longa circulação marcados com ^{111}In ou ^{99m}Tc , com aproximadamente 100 nm, foram determinadas usando ratos

infectedos por *S. aureus*, *Escherichia coli* (*E. coli*) ou turpentina no músculo da pantorrilha. Os dois radiofármacos apresentaram biodistribuição similar, com alta captação tanto no abscesso bacteriano quanto na inflamação estéril. A atividade no tecido não inflamado diminuiu com o tempo e, conseqüentemente, nas imagens tardias uma alta relação abscesso/não-alvo foi obtida (BOERMAN et al., 1995; OYEN et al., 1996_a).

Boerman et al. (1997) estudaram o efeito do tamanho e do tempo de circulação dos lipossomas de longa circulação marcados com ^{99m}Tc para imagens de focos infecciosos utilizando quatro preparações lipossomais constituídas por vesículas de diferentes tamanhos (90, 120, 150 e 180 nm) que foram injetadas em ratos infectados na pata com *S. aureus*. As imagens obtidas com as diferentes preparações foram comparadas e mostraram que os lipossomas de longa circulação de menor tamanho não somente apresentaram uma ótima captação no músculo infectado como, também, menor captação no baço.

Erdogan et al. (2000) utilizaram lipossomas marcados com ^{99m}Tc-HMPAO para a detecção de infecção em ratos. Os resultados da biodistribuição (1 h e 24 h após injeção) mostraram que a atividade no SFM e em outros órgãos foi reduzida com o tempo, enquanto a atividade no abscesso tornou-se mais proeminente. O abscesso foi definido em uma hora, tornando-se mais nítido com o tempo.

O efeito da dose lipídica sobre a biodistribuição dos lipossomas de longa circulação foi avaliado por Laverman et al. (2000). Foram injetados, por via intravenosa, 0,02 a 1,0 µmol de lípides/kg em modelos animais (ratos e coelhos) e em humanos. Os resultados demonstraram que a biodistribuição desses lipossomas é dose lipídica-dependente e é significativamente alterada com doses lipídicas muito baixas (0,02 µmol de lípides/kg). Estes autores concluíram que o uso clínico de lipossomas de longa circulação marcados com ^{99m}Tc para imagens de inflamação/infecção requer administração de doses lipídicas de pelo menos 0,5 µmol de lípides/kg.

Awasthi et al. (1998) investigaram o potencial de lipossomas de longa circulação duplamente marcados com ^{99m}Tc e ¹¹¹In (^{99m}Tc/¹¹¹In-lipossomas de longa circulação)

para imagens de osteomielites em ratos. Em todos os animais com osteomielite confirmada histologicamente, os lipossomas de longa circulação permitiram identificar claramente, na janela do ^{99m}Tc , as lesões osteomielíticas com 8 horas após injeção. A maior relação alvo/não-alvo foi obtida na janela do ^{111}In com 48 horas após injeção. Em outro estudo, Dams et al. (2000_a) compararam o potencial dos ^{99m}Tc -lipossomas de longa circulação em relação a ^{99m}Tc -IgG, ao ^{67}Ga -Citrato e aos ^{111}In -leucócitos para imagens de osteomielite crônica, utilizando coelhos como modelo experimental. Tanto os ^{99m}Tc -lipossomas de longa circulação como a ^{99m}Tc -IgG permitiram identificar corretamente todas as lesões infecciosas. Nesse estudo, ^{99m}Tc -lipossomas de longa circulação mostraram-se tão bons quanto o ^{67}Ga -Citrato e os ^{111}In -leucócitos, demonstrando o potencial dos lipossomas de longa circulação para detectar infecções de baixo grau, como é o caso das infecções crônicas.

Os resultados promissores obtidos com os lipossomas de longa circulação radiomarcados em vários modelos animais levaram os pesquisadores a iniciar os estudos clínicos empregando esses lipossomas marcados ^{99m}Tc .

No estudo realizado por Dams et al. (2000_b) foram avaliados trinta e cinco pacientes suspeitos de apresentarem doenças inflamatórias ou infecciosas. Foram utilizados lipossomas de longa circulação, compostos de mPEG₂₀₀₀-DSPE/EPC/COL (razão molar 0,15/1,85/1, respectivamente), marcados com ^{99m}Tc pelo método HMPAO. Observou-se que no grupo de pacientes com lesões predominantemente do sistema músculo-esquelético, a cintilografia usando ^{99m}Tc -lipossomas mostrou alta sensibilidade (94%) e especificidade (89%). Todos os focos inflamatórios ou infecciosos foram detectados, com resultado falso-negativo somente para um caso de endocardite. Resultados falso-positivos foram observados para dois pacientes com pseudo-artrose (não infectados). Entretanto, um paciente apresentou rubor facial e dor no peito durante a administração da formulação lipossomal, com os sintomas desaparecendo rapidamente com a redução da taxa de infusão. Esta ocorrência foi uma surpresa para os pesquisadores, pois foram usadas doses muito baixa (aproximadamente 0,5 μmol de lípides/kg peso corporal) quando comparadas com as doses para fins terapêuticos (aproximadamente 10 μmol de lípides/kg peso corporal). A ocorrência desses efeitos adversos foi atribuída à ativação do sistema complemento com subsequente liberação dos mediadores vasoativos.

Em outro estudo clínico, realizado por Brouwers et al. (2000), lipossomas de longa circulação pequenos (90 nm) e marcados com ^{99m}Tc usando HYNIC foram administrados em nove pacientes com suspeita de agravamento da doença de Crohn, para avaliar o papel dos lipossomas radiomarcados na determinação da extensão e gravidade dessas doenças ativas. Esses lipossomas apresentavam a mesma composição daqueles utilizados por Dams et al. (2000_b), exceto pela inclusão do quelante HYNIC-DSPE na bicamada lipossomal. Entretanto, este estudo foi prematuramente interrompido devido aos efeitos adversos observados em três dos nove pacientes. Esses efeitos adversos caracterizaram-se, inicialmente, por dor na região do estômago ascendendo para o pescoço enquanto o exame físico mostrou hipertensão, elevação da pulsação, leve hiperventilação, eritema da face e extremidades superiores sem evidências de edema e, desaparecimento espontâneo e rápido (minutos) ao cessar a infusão. A ocorrência, durante a infusão, desses efeitos adversos sugeria que eles eram causados, provavelmente, pela interação dos ^{99m}Tc -lipossomas de longa circulação com o sistema complemento.

Sinais e sintomas semelhantes têm sido comumente relatados para preparações lipossomais comercialmente disponíveis para uso terapêutico tais como Doxorubicin (Doxil[®]/Calelyx[®]) (ALBERTS e GARCIA, 1997; GABIZON e MARTIN, 1997) e Anfotericina B (AmBisome[®]) (LEVINE et al., 1991). Esses efeitos adversos podem ser bem tolerados se os lipossomas são administrados como parte de um tratamento anticâncer, mas para um agente de diagnóstico clínico eles são inaceitáveis (BROUWERS et al., 2000).

Em suma, a viabilidade de se utilizar lipossomas de longa circulação e radiomarcados para imagem de focos inflamatórios ou infecciosos tem sido demonstrada em uma série de estudos pré-clínicos. Em vários modelos de infecção, os lipossomas de longa circulação pós-marcados mostraram-se iguais ou, às vezes, melhores do que os radiofármacos convencionais para imagem de infecção. Apesar dos primeiros estudos clínicos com ^{99m}Tc -lipossomas de longa circulação indicarem que esse novo agente de imagem pode constituir-se em um método auxiliar no diagnóstico cintilográfico de focos inflamatórios e infecciosos, a ocorrência dos efeitos adversos observados em alguns pacientes impede o uso desses sistemas e, por isso, uma nova formulação precisa ser desenvolvida (BOERMAN et al., 2000).

Assim, é importante conhecer as interações dos lipossomas com o sistema complemento quando esses são usados como sistemas carreadores de fármacos ou de agentes de diagnóstico, uma vez que a ativação do complemento pode reduzir a eficiência dos lipossomas, auxiliando o organismo na sua remoção da circulação (SZE BENI, 1998) bem como causando reações de hipersensibilidade (SZE BENI et al., 2002).

3 SISTEMA COMPLEMENTO

O sistema complemento constitui a primeira linha de defesa do organismo contra agentes microbianos ou partículas, assegurando sua citólise e/ou remoção fagocítica. Esse sistema é um complexo protéico polimolecular constituído de pelo menos 25 proteínas plasmáticas e de membrana, que interagem de maneira altamente regulada, gerando, como produtos, proteínas biologicamente ativas. A ligação das proteínas do complemento à superfície de microorganismos, partículas ou imunocomplexos é um processo conhecido como opsonização. Este mecanismo facilita a fagocitose uma vez que os fagócitos possuem receptores específicos para essas proteínas (MARZOCCHI-MACHADO e LUCISANO-VALIM, 1997). As proteínas que fazem parte desse sistema têm nomenclatura complexa, algumas são numeradas em ordem de sua descoberta (C1, C2 até C9) enquanto outras são referenciadas por nomes indicativos de seus efeitos (fator B, fator D, properdina) (PEREIRA e BOGLIOLO, 2000).

A ativação do complemento representa, portanto, a primeira preocupação em relação à biocompatibilidade de materiais particulados estranhos expostos ao sangue para fins terapêuticos ou de diagnóstico. Certos tipos de lipossomas são reconhecidos como estranhos e removidos rapidamente da circulação através da fagocitose mediada pelo complemento, reduzindo, assim, sua vida média plasmática. Além disso, as anafilatoxinas (C3a, C5a) liberadas após ativação do complemento causam uma ampla variedade de alterações fisiológicas, as quais podem variar entre as espécies, podendo ser até letal (SZE BENI et al., 1994).

3.1 Ativação do Complemento

Os componentes do complemento se encontram na circulação sob a forma inativa ou em baixos níveis de ativação espontânea. Para que esses componentes exerçam suas funções é necessário que o sistema complemento seja ativado. Essa ativação ocorre de maneira seqüencial, como um efeito cascata, pela clivagem proteolítica dos componentes por enzimas do sistema, originando assim uma série de fragmentos com diferentes características e funções específicas (MARZOCCHI-MACHADO e LUCISANO-VALIM, 1997). O sistema complemento pode ser ativado por diferentes vias, as quais são desencadeadas por fatores distintos, sendo o início da ativação diferente para cada uma delas, mas que convergem em uma via comum a partir da formação de C3b (Figura 7). Sua ativação pelas diferentes vias leva à formação do complexo lítico de membrana (CLM) C5b-9, que destrói células (DEVINE e BRADLEY, 1998; PEREIRA e BOGLIOLO, 2000; ROTE, 1998).

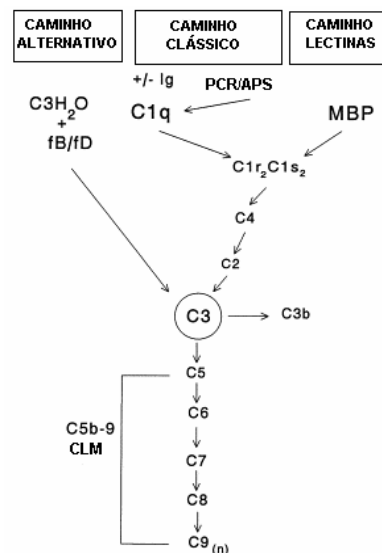


Figura 7. Representação esquemática da cascata do sistema complemento. Adaptado de DEVINE e BRADLEY (1998).

=====
A via clássica do complemento foi a primeira a ser identificada, sendo também conhecida como via anticorpo-dependente porque ela pode ser iniciada pela ligação de C1q (primeiro componente do complemento) à porção Fc (*fragment crystalline*) de uma imunoglobulina (IgM ou IgG) ativada (DEVINE e BRADLEY, 1998). Entretanto, estudos demonstram que muitas substâncias, incluindo materiais polianiónicos, podem ligar-se diretamente a C1q e iniciar a ativação pela via clássica na ausência de imunoglobulinas (RENT et al., 1975). A proteína C reativa (PCR) e amiloide P de soro (APS), membros da família pentraxina, tem considerável papel na ativação do complemento. Tanto a PCR quanto APS iniciam a ativação por meio da ligação de C1q e subsequente ativação da via clássica. A PCR interage com alguns fosfolípidos levando a ativação do complemento (VOLANAKIS e NARKATES, 1981).

A via alternativa não requer anticorpos específicos para ser ativada. Inicia-se pela facilitação da ação de ativadores do C3 existentes na circulação como pró-ativadores (fatores B e D). A hidrólise espontânea do C3 ocorre continuamente, na fase fluida, gerando moléculas conhecidas como C3H₂O, que se liga a um fator B, expondo esse fator à ação catalítica do fator D. Desse modo, o fator B é clivado em fragmentos Ba e Bb, ficando este último ligado ao C3H₂O. O complexo C3(H₂O)Bb é uma C3 convertase que cliva o C3 em C3a e C3b, que pode continuar a cascata da mesma forma que na via clássica. O fator C3b pode ligar-se covalentemente a grupos amina ou hidroxila da superfície de partículas ou microrganismos (DEVINE e BRADLEY, 1998; PEREIRA e BOGLIOLO, 2000).

A ativação do complemento pelo caminho das lectinas inicia-se pela ligação de uma lectina do plasma, denominada MBP (*mannose binding proteins*), a resíduos de manose sobre a superfície de microrganismos; o complexo adquire propriedades para se ligar nos primeiros componentes do caminho clássico (C1r e C1s) (COLLINS, 1999; PEREIRA e BOGLIOLO, 2000).

3.2 Interação de Lipossomas com o Sistema Complemento

Além dos efeitos de opsonização e de estabilidade, a interação dos lipossomas com o sistema complemento pode trazer riscos de toxicidade imune aguda, manifestada

na forma de reações de hipersensibilidade, quando estes sistemas são administrados por via intravenosa. Por isso, desde sua descoberta, a ativação do complemento por lipossomas tem sido investigada por um grande número de estudos (DEVINE e BRADLEY, 1998; SZEBENI, 2005).

Vários estudos têm relatado que preparações lipossomais, comercialmente disponíveis (Doxil[®], Caelyx[®], AmBisome[®], Abelcet[®], Amphocil[®] e DaunoXome[®]), podem causar reação de hipersensibilidade (RHS), que aparece imediatamente após o início da infusão e inclui sintomas e distúrbios cardiovasculares e pulmonares tais como dispnéia, taquipnéia, taquicardia, hipo e hipertensão, dor no peito e nas costas. Diferente da alergia mediada por IgE (tipo I), essa reação aparece na primeira exposição à preparação, sem sensibilização prévia, e os sintomas usualmente reduzem ou desaparecem em tratamentos posteriores (ALBERTS e GARCIA, 1997; CHANAN-KHAN et al., 2003; DE MARIE, 1996; GABIZON e MARTIN, 1997; LEVINE et al., 1991; RICHARDSON et al., 1997; RODEN et al., 2002; SCHNEIDER et al., 1998; SZEBENI et al., 2002). Por causa destes aspectos não comuns, esta reação foi chamada por Szebeni et al. (1999) de pseudoalergia relacionada à ativação do complemento (Complement activation-related pseudoallergy - CARPA).

Ainda, estudos demonstraram que os lipossomas causam ativação do complemento em ratos, cujos efeitos parecem estar relacionados com as alterações cardiovasculares, hematológicas e respiratórias observadas após administração intravenosa dessas preparações (SZEBENI et al., 1996). Usando o porco como modelo experimental, Szebeni et al. (2000) observaram a ocorrência de hipertensão pulmonar, o que foi atribuído à ativação do complemento pelo caminho clássico, induzida por lipossomas.

Vários estudos têm sido realizados buscando elucidar as condições e mecanismos da interação dos lipossomas com o complemento, bem como a influência da ativação do complemento na manifestação de reações pseudoalérgicas. Entretanto, resultados contraditórios foram relatados, possivelmente em decorrência dos estudos serem realizados em diferentes condições, tais como uso de preparações de lipossomas com diferentes componentes, concentrações lipídica, tamanhos e

métodos de preparo, além do uso de diferentes espécies animais e protocolos experimentais (DEVINE E e BRADLEY, 1998; ISHIDA et al., 2001).

A ativação do complemento mediada por lipossomas tem sido atribuída às características físico-químicas dos lipossomas como tamanho, carga superficial, composição fosfolipídica, conteúdo de colesterol, presença de lípidos modificados na superfície e a outros fatores tais como dose lipídica e método de administração (AWASTHI et al., 2003; DEVINE e BRADLEY, 1998; SZEBENI et al., 2000).

De acordo com a literatura lipossomas grandes são mais eficientes ativadores do complemento, do que lipossomas pequenos (< 200 nm) (AWASTHI et al., 2003; DEVINE et al., 1994; HARASHIMA et al., 1994).

Em geral, lipossomas contendo fosfolípidos carregados ativam o sistema complemento enquanto sistemas neutros são menos ativadores, sendo a natureza da carga determinante no caminho de ativação do complemento. Lipossomas com carga positiva ativam a via alternativa e os negativos ativam a via clássica (CHONN et al., 1991; DEVINE et al., 1994; ISHIDA et al., 2001; MARJAN et al., 1994).

Considerando que o grupo fosfato do fosfolípido no conjugado mPEG-DSPE é carregado negativamente em meio neutro, conferindo uma carga negativa à superfície da membrana lipossomal, tem sido sugerido que este constitui um potencial sítio de ligação de anticorpos (SZEBENI et al., 2002). Os anticorpos naturais têm um papel importante na ativação do complemento, sendo que a maior parte desses anticorpos encontra-se direcionados para as moléculas de fosfato na cabeça do fosfolípido da bicamada do lipossomas (SZEBENI et al., 1996). Isto indica que a densidade e a homogeneidade do PEG na superfície da membrana têm papel fundamental na proteção dos lipossomas contra o complemento.

A densidade do PEG na superfície da membrana pode assumir a configuração *mushroom* em baixas concentrações de PEG-DSPE, ou configuração *brush-like* quando as concentrações de PEG-DSPE são altas, como ilustrado na Figura 8. A configuração *mushroom* promove um menor efeito em termos de hidrofobicidade e barreira estérica e, conseqüentemente, uma menor proteção contra a interação dos

lipossomas com as proteínas plasmáticas. Outro fator, de grande importância, é a heterogeneidade da superfície entre as partículas da preparação, uma vez que isso pode gerar populações com diferentes configurações e comportamentos biológicos. Assim, a heterogeneidade na população bem como a sua proporção dentro de uma preparação, provavelmente, determinam a extensão da opsonização (GBADAMOSI et al., 2002; MOGHIMI e SZEBENI, 2003; NEEDHAM e KIM, 2000). Moghimi e Szebeni (2003) sugerem que, dependendo do método de preparação dos lipossomas podem ser produzidas nanopartículas mais homogêneas com relação as suas propriedades de superfície e, assim, menos susceptíveis a deposição de proteínas do complemento.

Quanto à incorporação de diestearilfosfatidiletanolamina acoplado ao aminopolietilenoglicol (aPEG-DSPE) na composição dos lipossomas, não existem estudos na literatura sobre sua interação com o complemento.

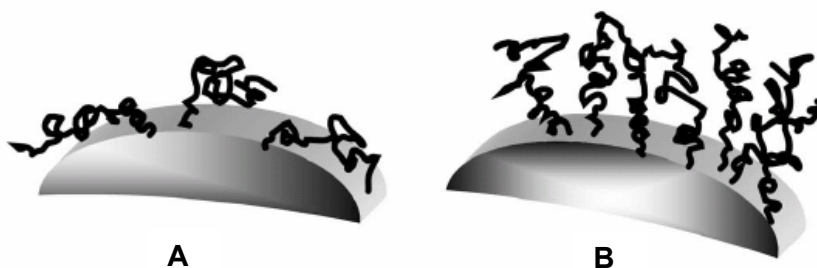


Figura 8. Diagrama esquemático da configuração PEG sobre a superfície de uma partícula. **A** - Configuração *mushroom* (baixa concentração do conjugado PEG); **B** - Configuração *brush-like* (alta concentração do conjugado PEG). Fonte: MOGHIMI (2003)

Outra importante propriedade da composição dos lipossomas no processo de interação com o complemento é o conteúdo de colesterol, uma vez que influencia a ativação do complemento de maneira dose-dependente (CHONN et al., 1991). Ishida et al. (2001) observaram, usando soro de rato, que lipossomas contendo 22 mol% ou 33 mol% de COL ativam o complemento pela via clássica enquanto concentração de 44 mol% de COL ativa a via alternativa. Esses mesmos autores relatam que,

antícorpos naturais (IgG e IgM) são os responsáveis por induzir a ativação do complemento pelos lipossomas e que, outro possível componente do soro responsável pela ativação via clássica é a PCR.

4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO/INFECÇÃO

A indução de processos inflamatórios no músculo da coxa constitui um modelo experimental de inflamação/infecção amplamente utilizado devido a sua reprodutibilidade, sua fácil e rápida execução além de ser aplicável a diferentes espécies animais como camundongos, ratos e coelhos. A indução de processos inflamatórios sépticos pode ser realizada por meio de vários microrganismos como *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Cândida albicans* (OYEN et al., 2001).

Para a indução de abscessos em ratos ou camundongos, o método usado consiste em anestésiar os animais e injetar no músculo da panturrilha ou coxa 0,1 mL de uma suspensão de sangue e salina normal (50:50) contendo a espécie de microrganismo desejada. Nos estudos para investigação dos agentes de diagnóstico de inflamação/infecção, esses devem ser injetados por via intravenosa 24 horas após a inoculação do microrganismo para indução do abscesso, quando o edema local é aparente. Dessa forma, resultados reprodutíveis podem ser obtidos em ratos e camundongos com todos os microrganismos supramencionados. A avaliação da gravidade da infecção é relativamente simples. A extensão do edema e da hiperemia pode ser estimada por meio da palpação e, histologicamente, caracteriza-se por infiltração de granulócitos (OYEN et al., 2001).

O modelo de inflamação asséptica frequentemente utilizado é o induzido pela carragenina na pata de diferentes espécies animais como camundongos, ratos e coelhos. Esse modelo foi originalmente proposto por Winter et al. (1962) para a indução do edema de pata em ratos. A carragenina, um polissacarídeo sulfatado presente em várias espécies de algas vermelhas do gênero *Rhodophyceae*, é pouco absorvida após administração subcutânea e induz resposta inflamatória local, cuja extensão apresenta várias fases no desenvolvimento do edema, com diversos mediadores envolvidos em cada fase. À medida que a resposta se desenvolve,

várias substâncias são produzidas e liberadas no sítio inflamatório. Inicialmente, há liberação de serotonina e produção de eicosanóides. Em seguida, há migração de neutrófilos para o sítio de injeção e liberação de citocinas (DI ROSA, 1972; VINEGAR et al., 1987). Estudos realizados por Costa (2004) mostraram que a administração subplantar de 0,05 mL de suspensão de carragenina 1% (p/v) induziu um aumento significativo no volume da pata a partir de 1 hora, persistindo até 24 após injeção. O período compreendido entre 150 a 360 minutos após injeção subplantar de carragenina (0,05 mL, 1% p/v) corresponde à fase do edema com resposta vascular máxima e, também, por migração celular, principalmente de células polimorfonucleares (DI ROSA, 1972).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo da década de 90, vários estudos foram realizados com a proposta de avaliar a habilidade de lipossomas marcados com ^{99m}Tc para identificar processos inflamatórios ou infecciosos por meio do método cintilográfico. Entretanto, esses estudos empregaram um número limitado de formulações de lipossomas convencionais e de longa circulação. Efeitos colaterais, como a indução de reações de hipersensibilidade, foram relatados após a injeção dos lipossomas, o que levou à interrupção das pesquisas. A revisão da literatura mostrou que seria importante investigar novas composições de lipossomas capazes de serem marcadas com ^{99m}Tc e com potencial uso na detecção cintilográfica de focos inflamatórios e infecciosos para auxiliar no diagnóstico dessas enfermidades. Outro aspecto relevante seria a investigação das interações dessas novas composições de lipossomas com componentes do complemento para inferir sobre a possível indução das reações de hipersensibilidade. Além disso, o desenvolvimento desse novo agente (radiofármaco) poderia representar um grande avanço na área de diagnóstico de inflamação e infecção, uma vez que se trata de um método rápido e de fácil execução, não necessitando o manuseio de sangue e, ainda, contribuindo para reduzir a taxa de dose de exposição do paciente à radiação. Nesse contexto, o desenvolvimento de pesquisas com esses objetivos constituem uma valiosa contribuição à área de diagnóstico de inflamação e infecção.

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTUDOS *IN VITRO* DE INTERAÇÕES DE LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS COM O SISTEMA COMPLEMENTO

RESUMO

A ativação do sistema complemento é um passo importante na aceleração do clearance de lipossomas pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM) e as anafilatoxinas liberadas após a ativação do complemento podem provocar inúmeras alterações fisiopatológicas expressas como reações de hipersensibilidade (RHS). No presente estudo, foi realizado a caracterização físico-química e estudos *in vitro* da interação do sistema complemento com lipossomas pH-sensíveis convencionais e de longa circulação bem como com lipossomas não-pH-sensíveis convencionais e de longa circulação. Os lipossomas foram caracterizados pelo diâmetro, potencial zeta e microscopia de força atômica (MFA). O estudo da interação dos lipossomas com o sistema complemento foi conduzido em soro de rato usando um ensaio hemolítico. O diâmetro médio dos lipossomas foi semelhante em todas as preparações (entre $99,8 \pm 3,9$ nm e $124,3 \pm 5,1$ nm) e apresentaram uma boa homogeneidade (Índice de polidispersão $\leq 0,25$). O potencial zeta foi negativo para todas as preparações, exceto para lipossomas preparados com aminoPolietilenoglicol₂₀₀₀ acoplado a distearilfosfatidilcolina (aPEG₂₀₀₀-DSPE), os quais apresentaram potencial zeta positivo. As imagens de MFA mostraram que lipossomas pH-sensíveis convencionais são propensos à agregação das vesículas e, portanto, apresentam menor estabilidade. Os lipossomas não-pH-sensíveis ativaram o sistema complemento enquanto os lipossomas pH-sensíveis mostraram ser menos ativadores do complemento.

1 INTRODUÇÃO

O sistema complemento (SC) é constituído tanto por proteínas plasmáticas quanto por proteínas de membranas celulares, as quais estão envolvidas na defesa imune inata ou adquirida. Essas proteínas também desempenham papel importante na remoção de imunocomplexos e materiais particulados da circulação sanguínea. Para que o SC exerça suas funções ele deve ser ativado, originando assim uma série de fragmentos com diferentes características e funções específicas. A ativação das proteínas do complemento ocorre por três caminhos conhecidos como: clássico, alternativo e lectinas. Cada um deles é desencadeado por fatores diferentes, sendo o início da ativação diferente para cada um, mas que convergem em uma via comum a partir da formação de C3b (COLLINS, 1999; KIRSCHFINK e MOLLNES, 2003; PEREIRA e BOGLIOLO, 2000). A ativação do SC gera componentes opsônicos, resultando na fagocitose e remoção de partículas pelo SFM. Um dos métodos para avaliar a atividade funcional do complemento pelos caminhos clássico e alternativo é o ensaio hemolítico (SEELEN et al., 2005).

Vesículas fosfolipídicas, conhecidas como lipossomas, têm sido usadas para a vetorização e liberação controlada de várias drogas bem como de agentes de diagnóstico. A deposição de proteínas do complemento ativadas sobre a superfície dos lipossomas é um fator crítico na sua velocidade de depuração pelo SFM. Assim, muitas das potenciais aplicações dos lipossomas requer uma minimização da depuração SFM com o concomitante aumento do seu tempo de circulação na corrente sanguínea. Tem sido relatado que a inclusão de moléculas anfipáticas tais como polietilenoglicóis (PEG) na composição dos lipossomas pode reduzir significativamente a sua captação pelo SFM e, conseqüentemente, resultar em um tempo de circulação prolongado (ALLEN et al., 1991; CHONN e CULLIS, 1992; KLIBANOV et al., 1990; MORI et al., 1991). Além disso, tem sido mostrado que os lipossomas podem causar RHS, as quais não envolvem IgE, mas que, também, surgem como uma conseqüência da ativação do SC. A freqüência da ocorrência das RHS, observada através do uso de drogas lipossomais comercialmente disponíveis, é muito ampla, estando compreendida entre 3% e 45% (SZE BENI, 1998, 2001, 2005).

Vários fatores têm sido descritos como responsáveis pela ativação do complemento pelos lipossomas, tais como tamanho, polidispersão, composição, fluidez da membrana, conteúdo de colesterol e carga superficial (AWASTHI et al., 2003; DEVINE e BRADLEY, 1998; MOGHIMI e SZEBENI, 2003; NAGAYASU et al., 1999; SZEBENI, 2005). Desta forma, é extremamente importante conhecer as interações dos lipossomas com o SC.

Neste contexto, o presente estudo investigou a interação do sistema complemento com lipossomas pH-sensíveis convencionais e de longa circulação bem como com lipossomas não-pH-sensíveis convencionais e de longa circulação. Nosso interesse em avaliar a habilidade dos lipossomas pH-sensíveis em induzir a ativação do complemento é devido ao potencial uso desses sistemas de liberação como carreador de drogas e de agentes de imagem para cintilografia. Muitos estudos têm avaliado o uso desses lipossomas como sistemas de liberação de drogas para o tratamento de tecidos patológicos, tais como tumores, áreas inflamadas e infectadas, os quais apresentam um meio ácido quando comparado ao meio do tecido normal (JÚNIOR et al., 2007; SIMÕES et al., 2004). Os lipossomas pH-sensíveis convencionais e de longa circulação consistiram de DOPE/CHEMS e aPEG₂₀₀₀-DSPE ou mPEG₂₀₀₀-DSPE/DOPE/CHEMS, respectivamente. Lipossomas não-pH-sensíveis convencionais e de longa circulação também foram preparados e a ativação do complemento produzida por eles foi comparada com os respectivos lipossomas pH-sensíveis. Esses lipossomas foram compostos de dioleilfosfatidilcolina (DOPC), colesterol (COL) e mPEG₂₀₀₀-DSPE ou aPEG₂₀₀₀-DSPE. Além disso, foram preparados lipossomas vazios com composição lipídica e diâmetro médio equivalentes ao produto comercializado Doxil[®], os quais foram utilizados como controle positivo no ensaio do complemento. Esses lipossomas continham de mPEG₂₀₀₀-DSPE/fosfatidilcolina de soja totalmente hidrogenada (HSPC)/COL. É conhecido que esses lipossomas são capazes de induzir RHS (ALBERTS e GARCIA, 1997; CHANAN-KHAN et al., 2003; GABIZON e MARTIN, 1997; SZEBENI et al., 2002).

A caracterização físico-química (diâmetro médio e potencial zeta) foi realizada para todas as formulações de lipossomas. Para as formulações de lipossomas pH-sensíveis foram feitas, também, análises morfológicas usando microscopia de força

atômica (MFA). Finalmente, a ativação do complemento induzida por lipossomas foi avaliada usando um ensaio hemolítico funcional em soro de rato previamente exposto aos lipossomas (BRADLEY et al., 1998; CHONN et al., 1991; DEVINE et al., 1994; MARJAN et al., 1994).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

DOPC, DOPE, mPEG₂₀₀₀-DSPE e HSPC foram adquiridos da Lipoid GmbH (Alemanha). O aPEG₂₀₀₀-DSPE foi comprado da Avanti Polar Lipids (EUA). CHEMS e COL foram comprados da Sigma Chemical Company (EUA). Todos os outros reagentes usados foram de grau analítico.

2.2 Métodos

2.2.1 Preparação dos lipossomas

Diferentes preparações de lipossomas foram usadas. A composição lipídica, a razão molar e a característica de cada preparação encontram-se descritas na Tabela 1. Inicialmente, os lípides foram dissolvidos em clorofórmio e alíquotas destas soluções de lípides foram transferidas para um balão de fundo redondo e utilizando um evaporador rotativo (Buchi R215, Suíça) sob pressão reduzida foi formado o filme lipídico. Em seguida, o filme lipídico foi hidratado com tampão Hepes (10 mM Hepes, 145 mM NaCl, pH 7,4) à temperatura ambiente. A dispersão de vesículas multilamelares obtida foi submetida a ciclos de 10 extrusões através de membranas de policarbonato (Millipore, EUA) de 0,4 µm, 0,2 µm e 0,1 µm usando um extrusor de pressão média (Lipex Biomembranes Inc., Canadá). A concentração de fosfolípides foi determinada usando o método colorimétrico descrito por Bartlett (1959). Os lipossomas foram estocados a 4 °C, em atmosfera de nitrogênio.

Tabela 1. Composição lipídica, razão molar e tipo de preparação de lipossomas.

Amostra	Composição	Razão Molar	Tipo
1	DOPC/COL	7/3	Lipossomas não-pH-sensível convencional
2	DOPE/CHEMS	7/3	Lipossomas pH-sensível convencional
3	mPEG ₂₀₀₀ -DSPE/DOPC/COL	6,5/0,5/3,0	Lipossomas não-pH-sensível de longa circulação
4	mPEG ₂₀₀₀ -DSPE/HSPC/COL	0,5/5,5/4,0	Lipossomas não-pH-sensível de longa circulação
5	mPEG ₂₀₀₀ -DSPE/DOPE/CHEMS	6,5/0,5/3,0	Lipossomas pH-sensível de longa circulação
6	aPEG ₂₀₀₀ -DSPE/DOPC/COL	6,5/0,5/3,0	Lipossomas não-pH-sensível de longa circulação
7	aPEG ₂₀₀₀ -DSPE/DOPE/CHEMS	6,5/0,5/3,0	Lipossomas pH-sensível de longa circulação

2.2.2 Caracterização dos lipossomas

2.2.2.1 Diâmetro médio das vesículas

O diâmetro médio e a distribuição do tamanho das vesículas (índice de polidispersão) foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons, a 25 °C a um ângulo de 90⁰, utilizando um contador de partículas equipado com raio laser monocromático (Zetasizer 3000HS, Malvern Instruments, Inglaterra). A análise é realizada em meio líquido e mede o volume hidrodinâmico das partículas atribuindo-se teoricamente a elas um formato esférico.

Amostras das diferentes preparações de lipossomas foram diluídas em tampão Hepes pH 7,4 filtrado em filtro de 0,45 µm (50 µL de lipossomas em 5 mL de tampão Hepes), para se obter uma contagem adequada de partículas. O índice de polidispersão das vesículas foi avaliado pela análise monomodal. Este índice avalia

=====

a distribuição da população de partículas em torno de um tamanho médio de partícula. As determinações foram realizadas em triplicata.

2.2.2.2 Potencial zeta

A carga da superfície das vesículas pode ser avaliada com base nas medidas do potencial zeta que é o potencial elétrico teórico entre o ambiente aquoso e uma região difusa de carga predominante oposta à superfície da célula. Este potencial pode ser calculado medindo-se a mobilidade eletroforética celular em um campo elétrico.

O potencial zeta foi determinado por espalhamento dinâmico da luz e análise da mobilidade eletroforética das vesículas utilizando o equipamento Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Inglaterra). As medidas foram feitas em triplicata com a mesma preparação utilizada para determinação de diâmetro.

2.2.2.3 Microscopia de força atômica (MFA)

A análise morfológica dos lipossomas pH-sensíveis convencionais e de longa circulação foi realizada por MFA utilizando os equipamentos Multimode e Dimension 3000, ambos monitorados por controlador Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Bárbara, CA, EUA), na Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC-MG).

Na MFA, uma sonda de silício é suavemente forçada sobre a amostra e, à medida que ela se move ao longo da superfície da amostra, seus movimentos são registrados e uma imagem tridimensional é produzida (NEVES et al., 1998). As amostras foram preparadas de forma semelhante à descrita por Ruozi et al. (2005) e Tavares et al. (2006). As imagens foram obtidas pela medida das forças de interação entre a sonda e a superfície da amostra. Os experimentos foram conduzidos no ar e a temperatura ambiente, operando no modo contato intermitente, utilizando sondas de silício (Nanosensors) com 228 μm de comprimento, frequência de ressonância

entre 75 e 98 khz e raio de curvatura nominal de 5 a 10 nm. Aproximadamente 10 µL de cada amostra foram depositadas sobre a superfície da mica clivada no momento do uso. As amostras, logo após a deposição na superfície da mica, foram secadas utilizando jatos de argônio. A mica é um mineral com superfície atômica plana e com plano basal de clivagem muito baixo, permitindo sua fácil utilização. Depois, um jato de argônio foi aplicado para eliminar o excesso de água. A varredura foi realizada com velocidade de 2 Hz e resolução de 256 x 256 pixels.

2.2.3 Estudos *in vitro* da atividade do complemento

O ensaio hemolítico (CH50) usando hemácias de carneiro sensibilizadas com anticorpos IgM monoclonal anti-eritrócitos de carneiro foi realizado para medir a atividade residual do complemento no soro de rato após incubação com os lipossomas, como previamente descrito por outros autores (DEVINE et al., 1994; MARJAN et al., 1994). A Figura 1 mostra o diagrama esquemático do fundamento deste método.

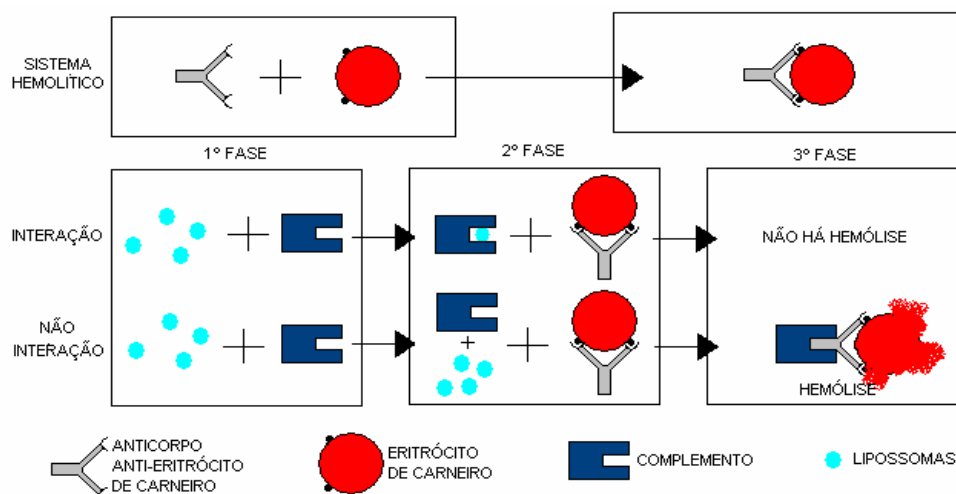


Figura 1. Diagrama esquemático da reação de ativação do complemento em soro de rato exposto aos lipossomas. Adaptado de CALICH e VAZ (1989).

2.2.3.1 Obtenção do soro de rato

Como fonte de proteínas do complemento foi usado o soro de rato como descrito por outros autores com pequenas modificações (MARJAN et al., 1994; PLATTS-MILLS e ISHIZAKA, 1974). O soro de rato foi obtido do sangue total de ratos Wistar, machos, com pesos de 350 ± 50 g. Os animais (n=6) foram anestesiados por via intraperitoneal com solução de cetamina (60 mg/kg) e xilazina (7,5 mg/kg), sacrificados por decapitação e o sangue coletado em tubos falcon de 15 mL. Após coagulação do sangue à temperatura ambiente (cerca de 30 minutos) fez-se a centrifugação em 740 g por 10 minutos (Centrífuga BABY® - 206 BL, FANEM, Brasil) para separação das células vermelhas. O pool do soro foi distribuído em tubos ependorff de 1,5 mL e estocado em freezer a -70°C .

Todos os protocolos foram aprovados pelo CETEA da Universidade Federal de Minas Gerais e estão em conformidade com o guia para o cuidado e uso de animais de laboratório recomendado pelo *Institute of Laboratory Animal Resources*.

2.2.3.2 Sensibilização do soro de rato com lipossomas

O soro de rato foi tratado com quantidades variáveis de fosfolípides. Os lipossomas (concentração lipídica total 20 mM) foram diluídos em tampão veronal (4,9 mM barbital sódico, 142 mM NaCl, pH 7,3-7,4) contendo 0,5 mM de cloreto de magnésio e 0,15 mM de cloreto de cálcio (STV^{2+}).

O soro de rato sensibilizado com lipossomas foi preparado incubando, por 30 minutos a 37°C , 100 μL da preparação de lipossomas diluída com 100 μL do soro previamente diluído 1:3 com STV^{2+} . Após incubação, foram adicionados 300 μL de STV^{2+} gelado e mantidos em banho de gelo para interromper a reação.

Como controle do complemento ativo do soro não exposto aos lipossomas, 100 μL de STV^{2+} e 100 μL do soro diluído 1:3 com STV^{2+} foram incubados nas mesmas condições e submetidos, também, ao ensaio hemolítico. Este tubo teve como finalidade o controle do percentual máximo de hemólise.

2.2.3.3 Ensaio Hemolítico

Neste teste foi avaliada a atividade do complemento residual, ou seja, o restante do complemento presente no soro do rato que não interagiu com os lipossomas após exposição a diferentes concentrações de fosfolípidos dos diversos tipos de lipossomas testados. Para tanto, foram utilizadas hemácias de carneiro sensibilizadas com anticorpos (hemolisina), medindo-se o grau de lise das hemácias mediada pelo complemento por meio da dosagem de hemoglobina liberada.

2.2.3.3.1 Preparo do sistema hemolítico (SH)

Inicialmente, o sangue de carneiro foi lavado três vezes com solução de cloreto de sódio 0,9% (p/v), centrifugando em 470 g por 10 minutos (Centrífuga BABY[®] - 206 BL, FANEM, Brasil). Em seguida, as hemácias foram suspensas em STV²⁺ para obter uma concentração de 5% v/v (aproximadamente 5×10^8 células/mL) (CALICH e VAZ, 1989). Esta concentração foi ajustada por meio da avaliação da densidade óptica resultante da lise de 0,1 mL de suspensão de hemácias com 0,9 mL de água, a qual deve apresentar uma leitura entre 5,2 e 5,4 de transmitância em espectrofotômetro (Schimadzu UV 1240, Japão) a 414 nm (LIMA et al., 1992).

A suspensão obtida foi incubada com igual volume de uma solução de hemolisina 1:5000 por 15 minutos a 37 °C, constituindo o SH a ser usado no ensaio.

2.2.3.3.2 Titulação do complemento residual

Neste ensaio, 50 µL do soro previamente exposto aos fosfolípidos foram incubados, por 30 minutos a 37 °C, com 50 µL do SH. Após incubação foram adicionados 2 mL de STV²⁺ gelado e os tubos transferidos para um banho de gelo para inibir alguma posterior hemólise. As hemácias não lisadas foram removidas por centrifugação (470 g, 5 minutos) e a percentagem de células lisadas foi determinada pela quantidade de hemoglobina liberada por meio da leitura da absorbância em espectrofotômetro (Schimadzu UV 1240, Japão) a 414 nm. A lise das hemácias está diretamente

relacionada com a quantidade de complemento residual ativo no soro do rato após exposição aos lipossomas. Um menor nível de complemento ativo após exposição aos lipossomas é interpretado como evidência de consumo de complemento durante a incubação do soro e lipossomas.

Foram preparadas, em paralelo, amostras branco contendo a mesma quantidade de fosfolípidos presente nas amostras teste e STV²⁺. Estas amostras tiveram como objetivo determinar a contribuição dos lipossomas nas leituras das amostras teste, uma vez que eles não foram retirados do meio (“efeito matriz”).

Para o cálculo da percentagem de hemólise, o valor da leitura da amostra branco foi diminuído do valor obtido na amostra teste da concentração fosfolipídica correspondente.

2.3 Análise Estatística

Todos os resultados foram apresentados como média \pm d.p. Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA *one-way* e corrigidos pelo teste de comparação múltipla de Dunnett usando o programa Prism 4 (GraphPad Software, Inc., EUA). Para todas as análises adotou-se o intervalo de confiança de 95%, sendo que as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização dos Lipossomas

3.1.1 Diâmetro e potencial zeta

Os valores para o diâmetro médio e o potencial zeta dos lipossomas podem ser vistos na Tabela 2. As preparações apresentaram vesículas com diâmetros médios compreendidos entre 99,8 nm e 124,3 nm, mostrando uma boa homogeneidade na distribuição do tamanho das partículas, como indicado pelo índice de polidispersão.

Tabela 2. Diâmetro, índice de polidispersão, mobilidade eletroforética e potencial zeta de lipossomas pH-sensíveis convencionais e de longa circulação bem como de lipossomas não-pH-sensíveis convencionais e de longa circulação

Composição lipídica	Diâmetro (nm)	Índice de polidispersão	Mobilidade eletroforética ($\mu\text{m.cm/V.s}$)	Potencial zeta (mV)
DOPC/COL	106,3 \pm 4,5	0,10 \pm 0,01	-0,59 \pm 0,09	-7,5 \pm 3,0
DOPE/CHEMS	121,6 \pm 6,6	0,24 \pm 0,09	-1,53 \pm 0,17	-19,5 \pm 2,1
mPEG ₂₀₀₀ -DSPE/DOPC/COL	99,8 \pm 3,9	0,08 \pm 0,01	-0,33 \pm 0,09	-4,2 \pm 1,1
mPEG ₂₀₀₀ -DSPE/HSPC/COL	111,5 \pm 3,1	0,06 \pm 0,01	-0,43 \pm 0,07	-5,3 \pm 0,9
mPEG ₂₀₀₀ -DSPE/DOPE/CHEMS	117,6 \pm 4,2	0,22 \pm 0,03	-0,51 \pm 0,15	-5,8 \pm 2,0
aPEG ₂₀₀₀ -DSPE/DOPC/COL	105,3 \pm 1,1	0,07 \pm 0,01	0,30 \pm 0,07	3,9 \pm 0,9
aPEG ₂₀₀₀ -DSPE/DOPE/CHEMS	124,3 \pm 5,1	0,23 \pm 0,03	0,78 \pm 0,07	9,2 \pm 1,1

Valores são expressos pela média \pm d.p. (n = 3)

Este índice reporta a distribuição do tamanho das vesículas dentro da dispersão e varia de 0,0 a 1,0 para sistemas totalmente monodisperso e completamente polidisperso, respectivamente. Muitos estudos têm demonstrado que lipossomas convencionais ou modificados com PEG com diâmetros entre 100 nm e 200 nm apresentam maior vida média de circulação sanguínea (AWASTHI et al., 2003; ISHIDA et al., 1999; LITZINGER et al., 1994). O menor tamanho dos lipossomas reduz seu reconhecimento pelo sistema complemento e dessa maneira, prolonga seu tempo de circulação no sangue.

Lipossomas estericamente estabilizados com mPEG₂₀₀₀-DSPE ou aPEG₂₀₀₀-DSPE apresentaram potenciais zeta negativo e positivo, respectivamente. Estes valores de potenciais zeta encontrados neste estudo são semelhantes àqueles observados por Woodle et al. (1992) e Zalipsky et al. (1994). Para os lipossomas contendo mPEG₂₀₀₀-DSPE foi observada uma pequena mobilidade eletroforética e, portanto, um menor valor de potencial zeta. De acordo com Woodle et al. (1992), bicamadas contendo mPEG-DSPE exibem um potencial de superfície negativo mas uma reduzida mobilidade eletroforética. O grupo amino da molécula de DSPE é derivatizado e não pode ser protonado e a ionização do grupo fosfato em pH neutro gera uma carga negativa. Apesar do potencial de superfície negativo, a reduzida mobilidade eletroforética pode ser atribuída a uma grande resistência hidrodinâmica devido a contribuição estérica do mPEG.

Por outro lado, os lipossomas contendo aPEG₂₀₀₀-DSPE mostraram um potencial zeta positivo e, como nos lipossomas modificados com mPEG₂₀₀₀-DSPE, uma reduzida mobilidade eletroforética. Segundo Zalipsky et al. (1994), lipossomas preparados com aPEG₂₀₀₀-DSPE, um fosfolípide neutro e *zwitterionic*, apresentam carga superficial positiva devido ao grupo amino que se encontra na porção terminal do polímero e, portanto, no exterior das vesículas. Em pH neutro esse grupo amino terminal é protonado e, assim, é carregado positivamente. Ao contrário, o grupo fosfato da molécula de DSPE apresenta carga negativa em meio fisiológico. Dessa maneira, tem-se uma carga resultante neutra na molécula global de aPEG₂₀₀₀-DSPE. Porém, a separação relativamente grande entre o grupo amino positivo e o grupo fosfato negativo, proporcionada pela cadeia do PEG, efetivamente resulta em uma superfície positiva como determinada pelo potencial zeta.

3.1.2 Imagens de MFA

A MFA é uma poderosa técnica de caracterização de lipossomas, sendo usada para analisar sua morfologia, distribuição de tamanho e presença ou ausência de fusão e ou agregação (MOZAFARI et al., 2005). Esta técnica possibilita a observação da amostra em três dimensões com a reconstrução exata dos aspectos morfológicos da sua superfície, sendo a preparação da amostra rápida e fácil, tornando-se desnecessário a aplicação de vácuo e a metalização da amostra com ouro (GARG e KOKKOLI, 2005; NEVES et al., 1998).

As imagens obtidas dos lipossomas pH-sensíveis convencionais e de longa circulação através da MFA são mostradas na Figuras 2 a 4. Os lipossomas pH-sensíveis convencionais (DOPE/CHEMS) apresentaram uma forma esférica e uma grande variação no tamanho das vesículas (117 nm a 580 nm) (Figura 2). Isto sugere a ocorrência de fusão de lipossomas, como também foi observado por Tavares et al. (2006) para lipossomas de composição similar. Este fenômeno de fusão pode ser resultante de interações entre o substrato mica e a superfície dos lipossomas. Entretanto, essa instabilidade física dos lipossomas DOPE/CHEMS também foi observada pelo método de espectroscopia de correlação de fótons durante o período de armazenagem.

Os lipossomas pH-sensíveis contendo mPEG₂₀₀₀-DSPE (Figura 3) ou aPEG₂₀₀₀-DSPE (Figura 4) na bicamada lipídica apresentaram estruturas esféricas menores e isoladas (aproximadamente 135 nm). A distribuição de tamanho nestas preparações foi homogênea e os lipossomas não mostraram tendência de espalhar-se sobre a superfície do substrato, revelando, assim, uma maior estabilidade. Estas observações indicam que o PEG₂₀₀₀-DSPE tem um papel importante na estabilização das vesículas.

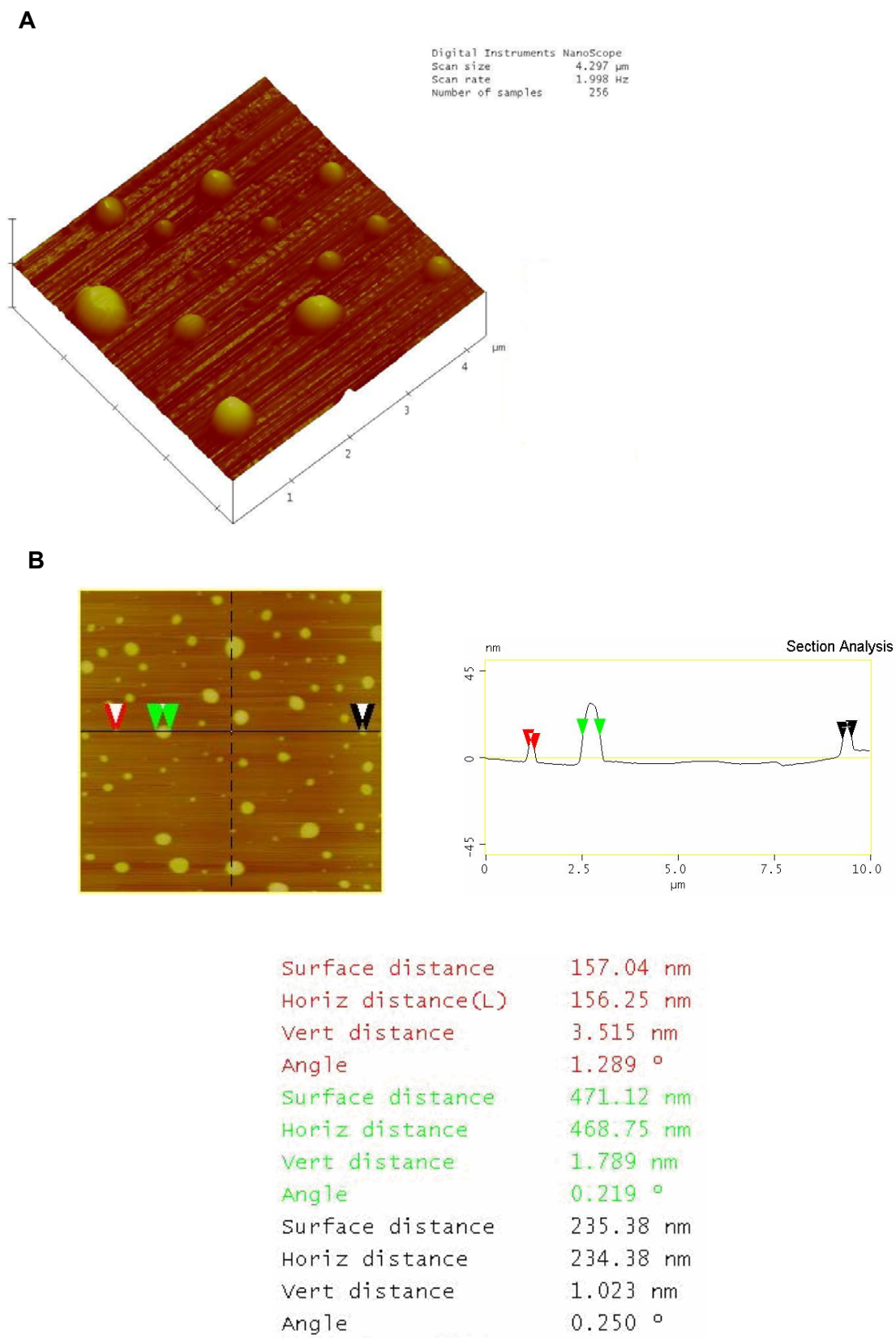


Figura 2. Imagens topográficas de lipossomas compostos de DOPE/CHEMS obtidas por microscopia de força atômica (modo contato intermitente) sobre substrato mica. **A** - Visão tridimensional. **B** - Perfil topográfico (10 x 10 μm).

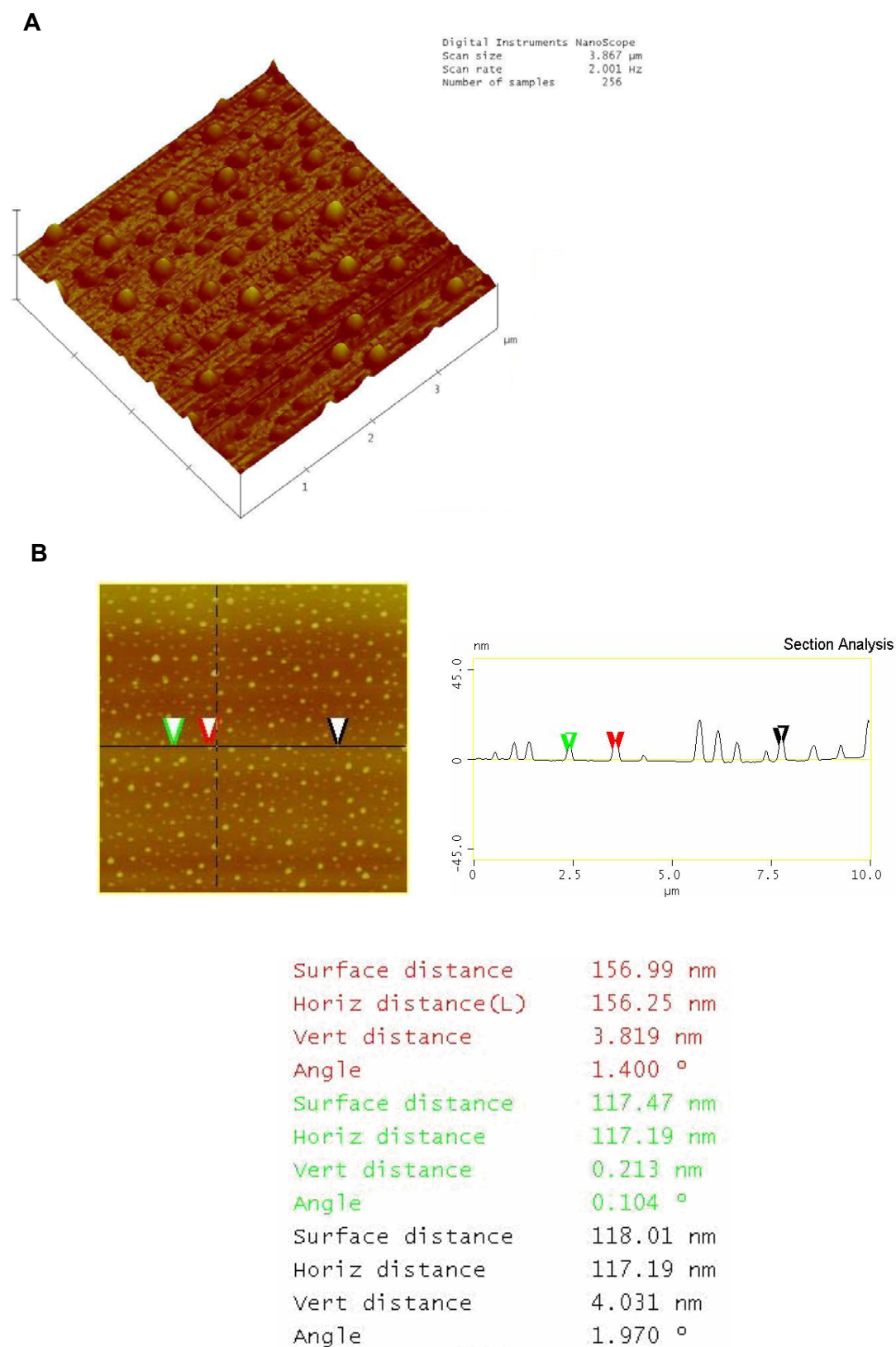


Figura 3. Imagens topográficas de lipossomas compostos de mPEG₂₀₀₀-DSPE/DOPE/CHEMS obtidas por microscopia de força atômica (modo contato intermitente) sobre substrato mica. **A** - Visão tridimensional. **B** - Perfil topográfico (10 x 10 μm).

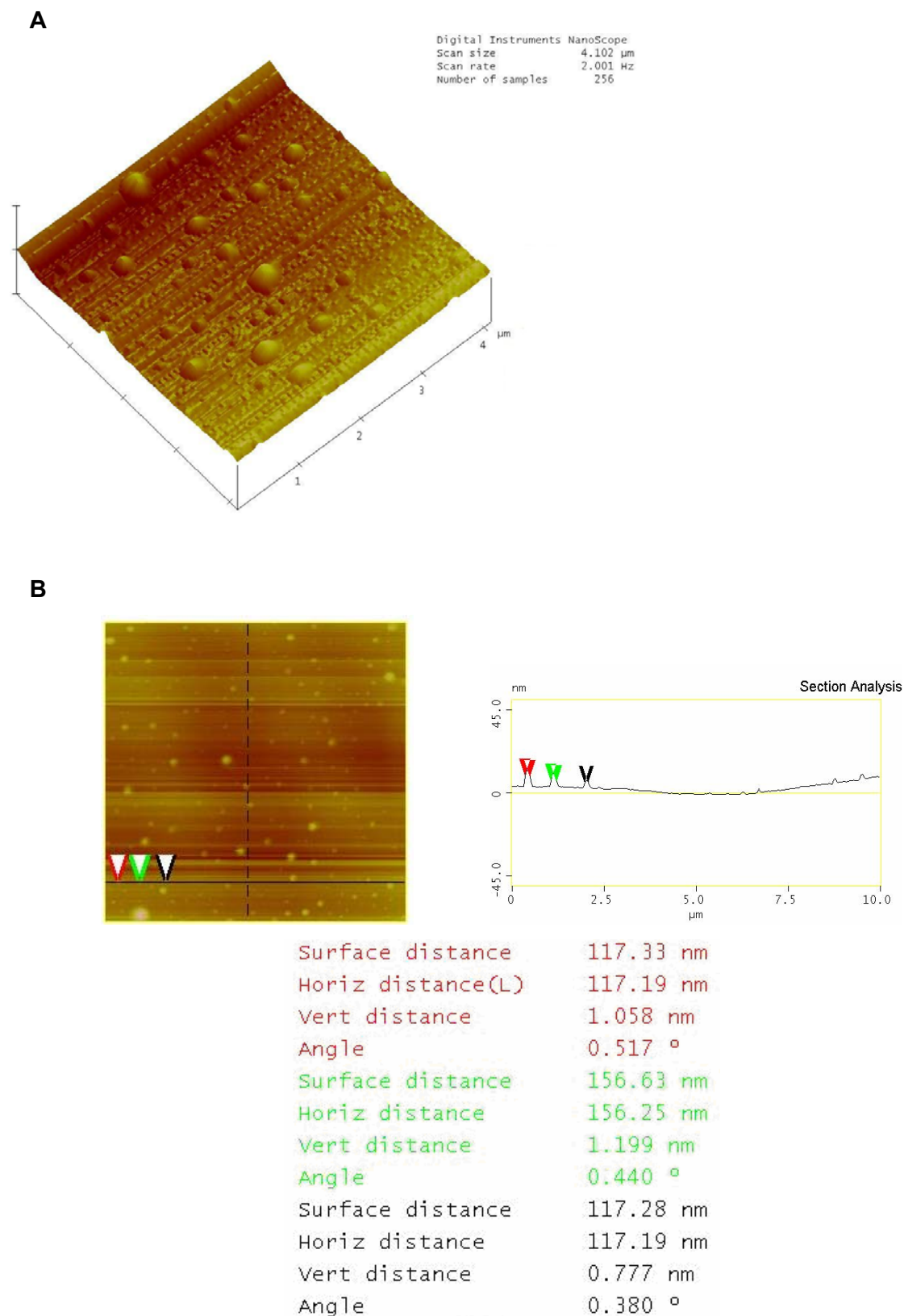


Figura 4. Imagens topográficas de lipossomas compostos de aPEG₂₀₀₀-DSPE/DOPE/CHEMS obtidas por microscopia de força atômica (modo contato intermitente) sobre substrato mica. **A** - Visão tridimensional. **B** - Perfil topográfico (10 x 10 μm).

3.2 Estudos *in vitro* da Atividade do Complemento

A influência da composição dos lipossomas e da quantidade de fosfolípidos sobre a ativação do complemento em soro de rato é demonstrada nas Figuras 5 a 7. Um ensaio hemolítico no qual o soro de rato, previamente exposto a diferentes formulações de lipossomas em concentrações fosfolípídicas variáveis, reagiu com hemácias de carneiro sensibilizadas com anticorpos foi usado para avaliar o efeito da exposição aos lipossomas sobre a atividade funcional do complemento. Na ausência de fosfolípidos observou-se que ocorreram 100% de lise dos eritrócitos de carneiro, indicando nenhum consumo de complemento. Entretanto, na presença de algumas formulações de lipossomas e quantidades de fosfolípidos ocorreu uma menor lise das células, indicando consumo de complemento do soro de rato durante exposição aos lipossomas.

A ativação do sistema complemento por lipossomas *in vivo* pode ter efeitos além da opsonização mediada pelo complemento. Os produtos gerados no processo de ativação do complemento podem ter efeitos fisiológicos significativos. Isto é particularmente um problema em animais sensíveis que recebem estas preparações sob a forma injetável. Os fragmentos anafiláticos do complemento são normalmente inativados pela ação de carboxipeptidases do soro; entretanto, em situações onde a taxa de produção de fragmentos da ativação excede sua inativação pode ocorrer anafilaxia expressa como reações de hipersensibilidade (DEVINE e BRADLEY, 1998). Estudos têm demonstrado que algumas características físico-químicas dos lipossomas fazem deles ativadores do complemento dentre as quais o tamanho, a carga superficial, a composição lipídica, a fluidez da membrana e o revestimento da superfície (DEVINE e BRADLEY, 1998; ISHIDA et al., 1997; MOGHIMI e SZEBENI, 2003).

Inicialmente, nós comparamos a ativação do complemento induzida pelos lipossomas convencionais compostos de DOPC/COL e DOPE/CHEMS (Figura 5). Para todas as quantidades de fosfolípidos investigadas foi observada uma menor percentagem de lise dos eritrócitos de carneiro na presença de soro de rato exposto aos lipossomas DOPC/COL, indicando um maior consumo de complemento por estes lipossomas quando comparado com os lipossomas compostos de

DOPE/CHEMS. Esse resultado pode, possivelmente, ser atribuído à presença de grupos fosforilcolina das moléculas de DOPC e ao uso de CHEMS no lugar do COL.

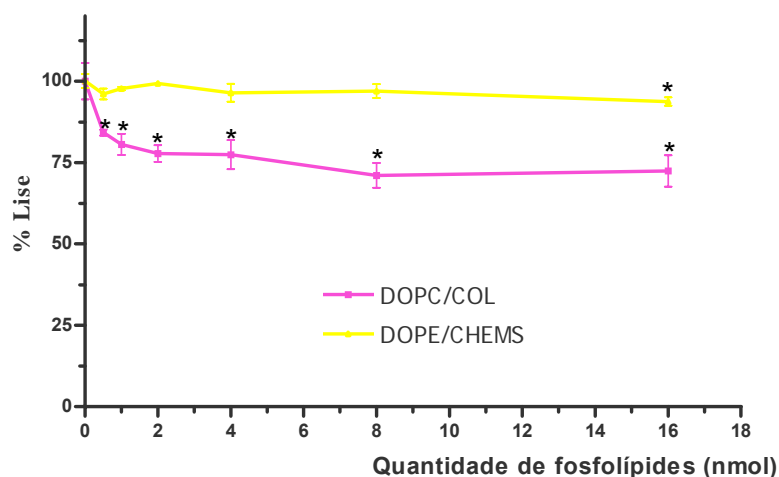


Figura 5. Consumo de complemento em soro de rato (1:3) previamente incubado (30 min, 37°C) com lipossomas pH-sensíveis ou não convencionais em diferentes concentrações. A atividade do complemento residual, expressa como % lise dos eritrócitos, foi medida pela hemólise de eritrócitos de carneiro sensibilizados com anticorpos. * Indicam uma diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (ausência de fosfolípides) (Teste de Dunnett, $p \leq 0,05$).

Lipossomas contendo grandes quantidades de fosfatidilcolina apresentam densas áreas de grupos fosforilcolina na membrana. É conhecido que a proteína C reativa (PCR) presente no soro é capaz de ativar o complemento pela via clássica anticorpo independente através de sua ligação covalente a resíduos fosforilcolina sobre a membrana lipossomal (DEVINE e BRADLEY, 1998; ISHIDA et al., 2001; SEMPLE et al., 1998).

O CHEMS é um éster derivado do COL e pode formar vesículas pH-sensíveis quando incorporado em bicamadas contendo fosfatidiletanolamina (DING et al., 2005; SIMÕES et al., 2004). O mecanismo pelo qual o CHEMS age como um estabilizador da membrana não é totalmente conhecido. Estudos sugerem que todo

o grupo succínico do CHEMS poderia se encaixar dentro da cabeça polar dos fosfolípides da bicamada e, o anel esterol ficaria na mesma posição como quando se utiliza o COL (Figura 6). Desta forma, as moléculas de CHEMS possuem a habilidade de interagir com as moléculas de fosfolípides através da formação de ligações de hidrogênio e atrações eletrostáticas entre seu grupo carboxílico aniônico e grupos amino positivo da cabeça polar dos fosfolípides. Estas interações podem produzir bicamadas mais compactas e estáveis do que as bicamadas contendo COL, as quais possuem apenas interações de ligações de hidrogênio (DING et al., 2005).

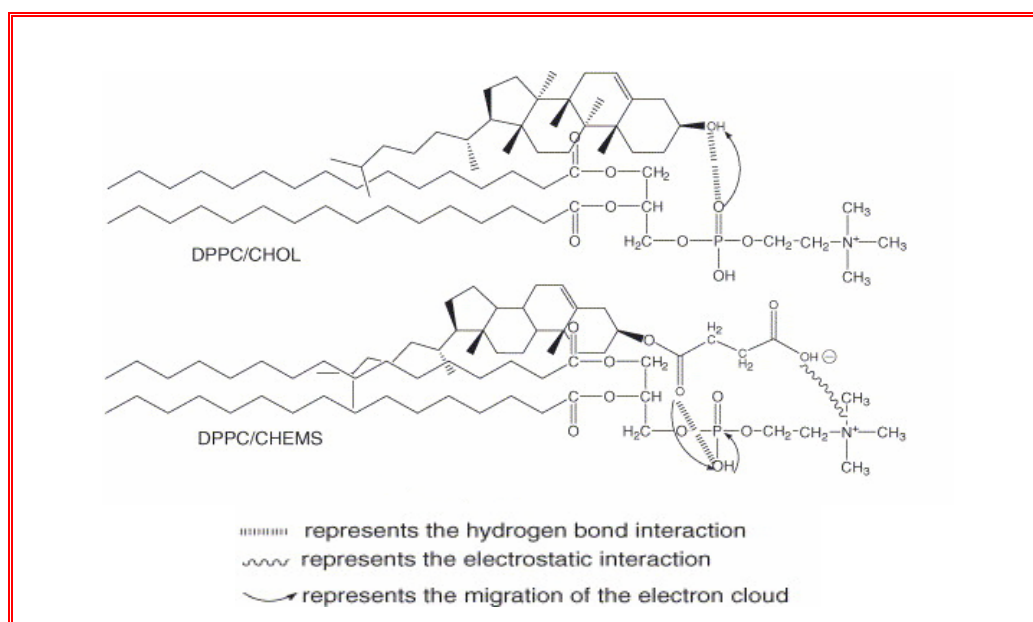


Figura 6. Diagrama esquemático da interação de fosfolípides (DPPC) com hemisuccinato de colesterila (CHEMS) e colesterol (CHOL). Fonte: DING (2005).

Além disso, o conteúdo de COL na bicamada dos lipossomas parece determinar o caminho pelo qual o sistema complemento é ativado. Concentrações entre 22 mol% e 33 mol% ativam a via clássica, através de IgG ou PCR, enquanto concentrações maiores do que 44 mol% ativam a via alternativa (ISHIDA et al., 2001). Estudos sugerem que o grupo hidroxila do COL constitui sítio de ligação para fragmentos C3 nos lipossomas. Assim, a esterificação do grupo hidroxila poderia prevenir a

deposição de fragmentos C3 sobre a superfície dos lipossomas causando significativa redução na ativação do complemento. A mesma redução na ativação do complemento foi observada com o uso de éter metil colesterila no lugar do COL na composição dos lipossomas (ISHIDA et al., 2000).

Quanto aos lipossomas de longa circulação, foi observado que os lipossomas pH-sensíveis contendo tanto mPEG₂₀₀₀-DSPE quanto aPEG₂₀₀₀-DSPE mostraram ser menos ativadores do sistema complemento quando comparados aos respectivos lipossomas não-pH-sensíveis (Figura 7). Os lipossomas pH-sensíveis foram capazes de induzir a ativação do complemento somente em quantidades de fosfolípides a partir de 8 nmol. Nós esperávamos uma menor ativação do complemento com a incorporação das cadeias de mPEG₂₀₀₀-DSPE ou aPEG₂₀₀₀-DSPE na bicamada dos lipossomas; entretanto, isto não foi observado. Alguns estudos têm relatado que lipossomas contendo PEG são propensos a opsonização por várias proteínas do soro, tais como componentes do sistema complemento e imunoglobulinas, apesar da presença da barreira estérica promovida pelo polímero PEG. Assim, parece que a incorporação de PEG na bicamada lipossomal não suprime, necessariamente, a opsonização pelo complemento. Estes estudos, porém, não mostram se as opsoninas estão associadas com o polímero protetor, com outros componentes da superfície da partícula ou com ambos (ISHIDA et al., 2006; MOGHIMI e SZEBENI, 2003).

Tem sido sugerido que o grupo fosfato carregado negativamente em meio fisiológico, em todos os fosfolípides é o epítipo do anticorpo envolvido na ativação do complemento (CHONN et al., 1991; MOGHIMI e SZEBENI, 2003). Assim, é provável que a ativação do complemento observada neste estudo seja devido à densidade das cadeias de mPEG₂₀₀₀-DSPE ou aPEG₂₀₀₀-DSPE na superfície dos lipossomas, a qual não foi suficiente para mascarar os grupos fosfatos carregados negativamente e, dessa maneira, evitar a interação dos lipossomas com as proteínas do complemento.

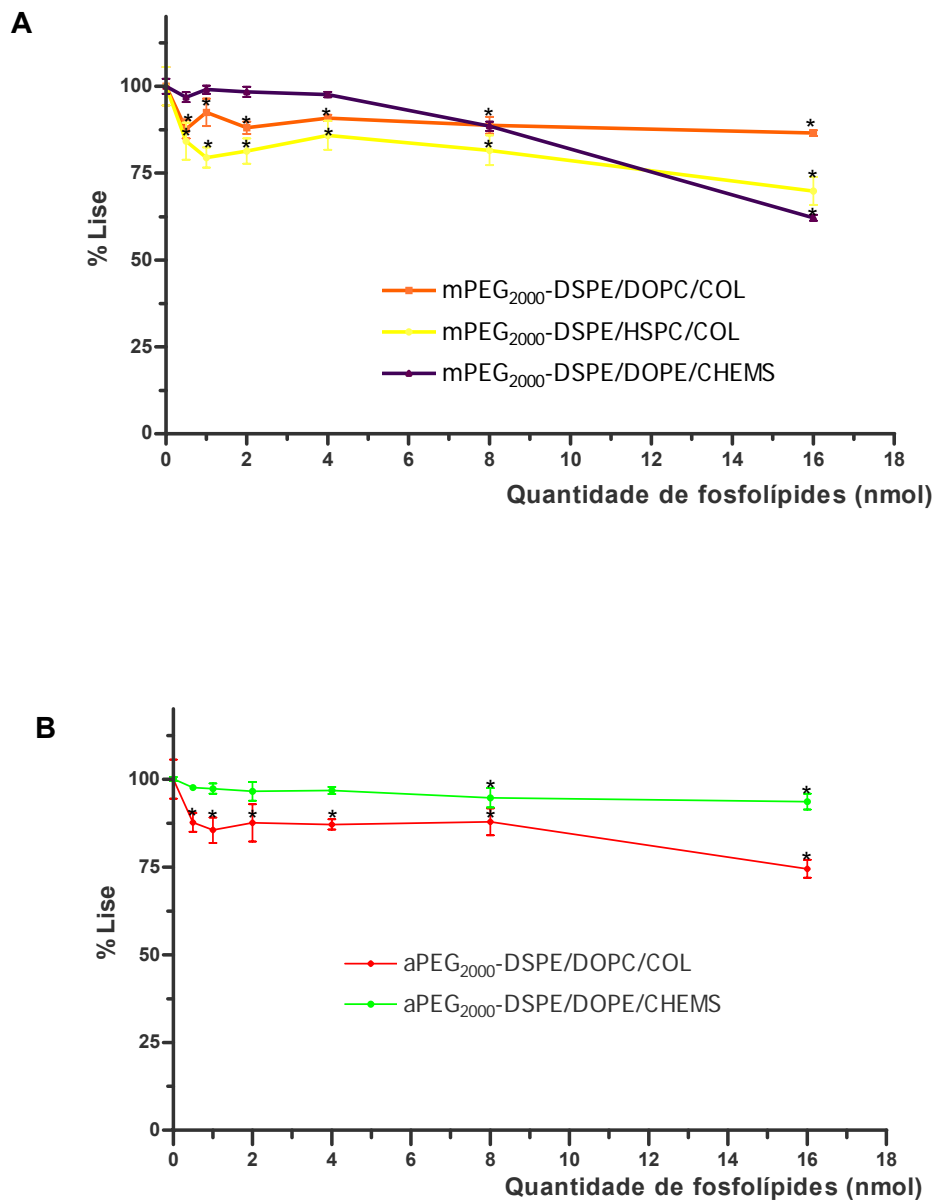


Figura 7. Consumo de complemento em soro de rato (1:3) previamente incubado (30 min, 37°C) com lipossomas pH-sensíveis ou não de longa circulação em diferentes concentrações. A atividade do complemento residual, expressa como % lise dos eritrócitos, foi medida pela hemólise de eritrócitos de carneiro sensibilizados com anticorpos. * Indicam uma diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (ausência de fosfolípides) (Teste de Dunnett, $p \leq 0,05$).

Por outro lado, lipossomas de longa circulação não-pH-sensíveis foram capazes de induzir a ativação do complemento em todas as quantidades de fosfolípides investigadas. Estes resultados corroboram a influência de outros fatores envolvidos nas interações entre os lipossomas e o sistema complemento. Como observado para os lipossomas convencionais não-pH-sensíveis, parece que a presença de grupos fosforilcolina e o colesterol na sua composição contribuem para uma maior ativação do complemento. Finalmente, como esperado, lipossomas vazios compostos de mPEG₂₀₀₀-DSPE/HSPC/COL, semelhantes ao Doxil[®] tanto em composição quanto em tamanho, usados como controle positivo no ensaio hemolítico, mostraram significativa ativação do complemento (Figura 7A), como relatado por outros autores (MOGHIMI e SZEBENI, 2003; SZEBENI et al., 1998, 2002, 2005).

4 CONCLUSÃO

Para obter sucesso no uso de lipossomas como carreadores de drogas ou agentes de imagens torna-se necessário o estudo da sua composição, das suas características físico-químicas e do seu comportamento biológico. Em nosso estudo, lipossomas convencionais e de longa circulação pH-sensíveis foram avaliados quanto ao seu tamanho, potencial zeta, morfologia e habilidade para induzir ativação do sistema complemento. Ambos os tipos de lipossomas pH-sensíveis mostraram tamanhos homogêneos após sua preparação. Valores de potencial zeta negativo foram encontrados para DOPE/CHEMS e mPEG₂₀₀₀-DSPE/DOPE/CHEMS, enquanto valor de potencial zeta positivo foi observado para aPEG₂₀₀₀-DSPE/DOPE/CHEMS. A análise morfológica revelou uma maior estabilidade de lipossomas pH-sensíveis de longa circulação quando comparados aos lipossomas convencional pH-sensíveis. A presença de PEG₂₀₀₀ contribuiu para uma maior estabilização dos lipossomas pH-sensíveis. Os lipossomas pH-sensíveis convencionais e de longa circulação mostraram ser fracos ativadores do sistema complemento em soro de rato. Esses resultados são conseqüências de vários fatores, tais como seu pequeno tamanho, a presença de PE e CHEMS no lugar de derivados de PC e COL, respectivamente, na membrana lipossomal. Assim, esses resultados fornecem informações úteis no desenvolvimento desses lipossomas para uso em terapêutica humana.

CAPÍTULO II

ESTUDO DE BIODISTRIBUIÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE SÍTIOS INFLAMATÓRIOS USANDO LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE LONGA CIRCULAÇÃO MARCADOS COM TECNÉCIO-99m

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar a biodistribuição e a habilidade de lipossomas pH-sensíveis de longa circulação radiomarcados com ^{99m}Tc para identificar regiões inflamadas em um modelo experimental de inflamação focal em rato. Os lipossomas pH-sensíveis de longa circulação contendo glutathione encapsulada foram marcados com ^{99m}Tc -HMPAO. Os lipossomas pH-sensíveis de longa circulação radiomarcados com (^{99m}Tc -LpHS) foram administrados, intravenosamente, em ratos machos Wistar com inflamação induzida por injeção subplantar de carragenina na pata direita. Em intervalos de tempos pré-estabelecidos os animais foram anestesiados, sacrificados e os tecidos foram removidos e analisados pela determinação da radioatividade usando um cintilador de poço automático. Imagens cintilográficas também foram obtidas com 2, 4 e 8 horas após administração intravenosa dos ^{99m}Tc -LpHS. Os ^{99m}Tc -LpHS foram significativamente captado pelo baço [$19,21 \pm 2,98\%$ dose injetada (% DI)/g após 30 minutos da injeção]. Baixos níveis de radioatividade foram encontrados no fígado, pulmões e rins. Além disso, a captação dos ^{99m}Tc -LpHS na pata inflamada foi significativamente maior quando comparada ao respectivo controle ($0,386 \pm 0,059\%$ DI/g e $0,215 \pm 0,018\%$ DI/g após 2 horas da injeção, respectivamente). O foco inflamatório pôde ser visualizado nas imagens cintilográficas 2 horas após administração dos ^{99m}Tc -LpHS. O valor da relação entre a radioatividade contada no sítio inflamado e não inflamado foi superior a cinco. Esses resultados indicam que os ^{99m}Tc -LpHS apresentam alto tropismo para regiões inflamadas e podem ser úteis como um radiofármaco para identificar esses focos.

1 INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias e infecciosas são uma das causas mais comuns de morbidade e mortalidade de pacientes apesar dos avanços obtidos na terapia antimicrobiana (CIRINO, 1998; LOVE E PALESTRO, 2004). O diagnóstico precoce e a localização dessas lesões são essenciais para o tratamento adequado. O conhecimento da fisiopatologia dos processos inflamatórios associado ao progresso das ciências radiofarmacêuticas tem impulsionado as técnicas em medicina nuclear com relação ao diagnóstico de inflamações e infecções (CHIANELLI et al., 1997). A cintilografia tem um importante papel na avaliação de pacientes suspeitos de estarem acometidos por essas enfermidades, uma vez que este método baseia-se na distribuição *in vivo* dos compostos radiomarcados, a qual é determinada pelas características fisiológicas dos tecidos. Dessa forma, esse método permite a visualização de processos fisiopatológicos no estágio inicial, ao contrário das técnicas convencionais de imagem que se baseiam em alterações anatômicas (BOERMAN et al., 2001; RENNEN et al., 2001, 2005).

Nas duas últimas décadas, alguns radiofármacos foram desenvolvidos para aplicação no diagnóstico por cintilografia de inflamação e infecção, sendo o ^{67}Ga -Citrato e leucócitos autólogos marcados com ^{111}In ou $^{99\text{m}}\text{Tc}$ os agentes de imagem mais usuais na clínica médica. O ^{67}Ga -Citrato é de fácil preparação, porém apresenta uma baixa especificidade e expõe o paciente a uma alta dose de radiação. O uso de leucócitos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é considerado “padrão ouro” dentre as técnicas de medicina nuclear para imagem de inflamação e infecção. Entretanto, esse método envolve um longo período de preparação do radiofármaco além de manusear sangue potencialmente contaminado o que limita seu uso (CORSTEN e VAN DER MEER, 1999; LOVE e PALESTRO, 2004; RENNEN et al., 2005). Assim, existe uma constante busca por novos radiofármacos que possibilitem a identificação de focos inflamatórios e infecciosos de forma rápida, com alta sensibilidade e especificidade e, que não apresentem as desvantagens dos radiofármacos comumente usados (LAVERMAN et al., 1999; LOVE e PALESTRO, 2004; VAN EERD et al., 2005).

Vários estudos demonstraram a viabilidade do uso de lipossomas marcados com ^{99m}Tc como agente de imagem para identificação de processos inflamatórios e infecciosos (BOERMAN et al., 2000; DAMS et al., 2000_b). Considerando que lipossomas pH-sensíveis são sistemas carreadores de drogas para tratamento de tecidos patológicos, tais como áreas inflamadas e infectadas, eles são também potenciais agentes de imagem para identificação de processos inflamatórios e infecciosos (SIMÕES et al., 2004). Até o momento, não é do nosso conhecimento que exista algum estudo avaliando esse tipo de lipossoma para identificar focos inflamatórios. Assim, neste trabalho, nós desenvolvemos um novo radiofármaco baseado em lipossomas pH-sensíveis de longa circulação marcados com ^{99m}Tc -HMPAO. A membrana lipossomal é composta de DOPE, CHEMS e mPEG₂₀₀₀-DSPE. A estabilização dos lipossomas em pH neutro é obtida pela presença do CHEMS na bicamada. Este lípide promove repulsões eletrostáticas as quais diminuem as interações intermoleculares da molécula de DOPE prevenindo, assim, o aparecimento de propriedades fusogênicas. Entretanto, em meio ácido, tais como em áreas de inflamação e infecção, as moléculas de CHEMS são protonadas e as vesículas tornam-se instáveis com a subsequente liberação do marcador radioativo encapsulado.

Este trabalho investiga a biodistribuição e a habilidade de identificação de focos inflamatórios por imagem cintilográfica, através da administração dos ^{99m}Tc -LpHS em ratos com inflamação na pata direita induzida por carragenina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

DOPE e mPEG₂₀₀₀-DSPE foram doados pela Lipoid GmbH (Alemanha). CHEMS, glutathione (GSH) e carragenina foram comprados da Sigma Chemical Company (EUA). ^{99m}Tc foi obtido de um gerador de molibdênio-99 (IPEN/Brasil) e o HMPAO foi obtido por reconstituição do kit Ceretec[®] (Amersham Health, Inglaterra). O Sephadex G-25 foi adquirido da Pharmacia[®] (Suécia). Todos os outros reagentes usados foram

de grau analítico. Os ratos machos Wistar foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Farmácia/UFMG e mantidos no laboratório de Radioisótopos da Faculdade de Farmácia/UFMG durante o período de experimentos, tendo livre acesso à ração e água.

2.2 Métodos

2.2.1 Preparação dos lipossomas

Inicialmente, alíquotas das soluções de DOPE, CHEMS e mPEG₂₀₀₀-DSPE em clorofórmio (concentração lipídica de 80 mM; razão molar 6,5/3,0/0,5, respectivamente) foram transferidas para um balão de fundo redondo e um filme lipídico foi formado pela evaporação do clorofórmio em um rotavapor (Buchi R215, Suíça) sob pressão reduzida. O filme lipídico obtido foi hidratado, à temperatura ambiente, com tampão Hepes pH 7,4 (10 mM Hepes, 135 mM NaCl, 5 mM EDTA) contendo 50 mM de GSH. As vesículas multilamelares resultantes foram submetidas a filtração através de membranas de policarbonato (Millipore, EUA) de 0,4 µm, 0,2 µm e 0,1 µm (10 ciclos cada) usando um extrusor de pressão média (Lipex Biomembranes Inc., Canadá). Finalmente, a GSH não encapsulada foi removida por ultracentrifugação (Ultracentrifuga Sorvall Ultra 80, EUA) em 150 000 g a 4 °C por 90 minutos.

O diâmetro médio e a distribuição do tamanho dos lipossomas contendo GSH encapsulada foram determinados pela análise monomodal por espectroscopia de correlação de fótons, a 25 °C a um ângulo de 90°. A medida de diâmetro foi realizada em triplicata usando o equipamento Zetasizer (Malvern Instruments, Inglaterra). As amostras foram diluídas usando um tampão Hepes pH 7,4. A concentração de fosfolípides foi determinada usando o método colorimétrico descrito por Bartlett (1959).

2.2.2 Procedimento de marcação

Um kit de HMPAO, comercialmente disponível, foi marcado com ^{99m}Tc , sem adição do estabilizador azul de metileno, de acordo com as instruções do fabricante. A eficiência de marcação foi determinada mediante o emprego do método de extração com solvente usando solução de NaCl a 0,9% (p/v) como fase aquosa e clorofórmio como fase orgânica (BARTHEL et al., 1999). A marcação dos lipossomas pH-sensíveis de longa circulação contendo GSH encapsulada foi realizada como descrito previamente por Phillips et al. (1992) com pequenas modificações. Os lipossomas pré-formados foram marcados pelo transporte do ^{99m}Tc como um complexo lipofílico ^{99m}Tc -HMPAO através da bicamada lipídica. Os lipossomas foram incubados por 30 minutos a 37°C com ^{99m}Tc -HMPAO preparado imediatamente antes do uso (1 MBq/ μmol de fosfolípide). O complexo ^{99m}Tc -HMPAO foi irreversivelmente encapsulado na fase aquosa interna das vesículas devido a sua redução por meio da reação com grupos sulfidríla da GSH encapsulada tornando-se mais hidrofílico e, assim, permanecendo dentro dos lipossomas (BALLINGER et al., 1988; PHILLIPS et al., 1992).

A eficiência de marcação foi determinada por cromatografia em papel (Whatman n. 1) usando solução de NaCl a 0,9% (p/v) como eluente. Usando essa técnica, os lipossomas permanecem na origem enquanto o ^{99m}Tc e o ^{99m}Tc -HMPAO livres são eluídos com o solvente (GOINS et al., 1993; NEW, 1990).

O complexo ^{99m}Tc -HMPAO não encapsulado foi removido por filtração em gel usando uma coluna de Sephadex G-25 e tampão Hepes pH 7,4 como eluente. Os ^{99m}Tc -LpHS foram administrados intravenosamente, imediatamente após purificação, em ratos com inflamação na pata direita.

2.2.3 Modelo animal

O foco inflamatório estéril foi induzido na pata direita de ratos machos Wistar, pesando entre 180-220 g (Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil), por injeção subplatar de 0,05 mL de suspensão de

carragenina a 1% (p/v). Na pata esquerda, usada como controle, foram injetados 0,05 mL de solução estéril de NaCl a 0,9% (p/v) (VINEGAR et al., 1987). Transcorridas 4 horas da injeção de carragenina, quando o intumescimento da pata era aparente, o radiofármaco foi injetado na veia da cauda dos animais.

Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais e estão de acordo com o guia para o cuidado e uso de animais de laboratório recomendado pelo *Institute of Laboratory Animal Resources*.

2.2.4 Estudos histopatológicos

Amostras do tecido da pata inflamada e da pata contralateral normal foram retiradas 4 horas após indução do foco inflamatório para exames histopatológicos. Os fragmentos dos tecidos foram fixados em formaldeído a 4% (v/v) e incluídos em parafina. Foram realizados cortes de 5 µm, os quais foram corados com hematoxilina-eosina. As imagens foram obtidas com ocular micrométrica e objetiva de imersão do microscópio óptico conectado a uma câmera (AxioKop 2 com câmera digital Axocam, Zeiss, Alemanha).

2.2.5 Estudos de biodistribuição

Após 4 horas da indução do foco inflamatório 1,5 MBq dos ^{99m}Tc -LpHS e 1,5 MBq do complexo ^{99m}Tc -HMPAO livre foram injetados na veia da cauda dos ratos (n=5). Em tempos pré-estabelecidos (30 minutos, 2, 4, 8 e 18 horas) após administração dos radiofármacos, os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina (7,5 mg/kg) e cetamina (60 mg/kg) e depois sacrificados. Foram retirados o fígado, o baço, os pulmões, os rins, a pata direita (inflamada) e a pata esquerda (controle), lavados com água destilada, secos com papel de filtro e pesados. A quantidade de radioatividade de cada órgão e das patas foi medida em um cintilador de poço automático (ANSR – Abbot, EUA) programado para detectar a radiação gama na janela de 70-210 keV de energia referente ao ^{99m}Tc . Uma dose padrão contendo a

mesma quantidade de radioatividade injetada foi contada simultaneamente em um tubo separado, para corrigir o decaimento físico e para calcular a captação do radiofármaco em cada órgão. Os resultados foram expressos como percentagem da dose injetada por grama de tecido (% DI/g), calculados pela seguinte equação:

$$\% \text{ DI/g} = \frac{\text{cpm/g de tecido}}{\text{cpm da dose padrão}} \times 100$$

Onde: cpm = contagem por minuto

2.2.6 Identificação de sítios de inflamação

Os ^{99m}Tc -LpHS (50 MBq) foram injetados na veia da cauda de ratos machos Wistar (n=5) os quais apresentavam sítio de inflamação na pata direita. Nos tempos de 2, 4 e 8 horas após a injeção, os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina (7,5 mg/kg) e cetamina (60 mg/kg), colocados em decúbito dorsal sob uma gama-câmara (Vertex Plus, Adac Laboratórios, Holanda) equipada com um colimador de baixa energia e alta resolução. Foram obtidas imagens estáticas planares (5 minutos) usando uma matriz 64x64 pixels. As imagens foram analisadas determinando-se a radioatividade nas regiões de interesse (ROI) pelo delineamento em torno da área inflamada (alvo) e da área contralateral não inflamada (não-alvo). A relação alvo/não-alvo foi calculada.

2.3 Análise Estatística

Todos os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão (d.p.). Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) *one-way* e corrigidos pelo teste de comparação múltipla de Tukey usando programa Prism 4 (GraphPad Software, Inc., EUA). Para todas as análises adotou-se o intervalo de confiança de 95%, sendo que as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$).

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização dos ^{99m}Tc -LpHS

O diâmetro médio e o índice de polidispersão das vesículas foi de $123,2 \pm 0,02$ nm e $0,19 \pm 0,02$, respectivamente, mostrando uma boa homogeneidade. O nível de lipofilicidade do HMPAO foi de 80%. A eficiência média de marcação dos LpHS foi de 85%. Estes dados foram obtidos a partir de cinco experimentos.

3.2 Estudos Histopatológicos

A carragenina causou um processo inflamatório significativo observado através da inspeção visual e palpação, apresentando edema e hiperemia (Figura 1). Não foi observada a presença de secreção purulenta.



Figura 1. Inflamação da pata direita de rato Wistar, 4 horas após administração subplantar de 0,05 mL de suspensão de carragenina a 1% (p/v).

O exame histológico dos fragmentos da derme e epiderme das patas controle e inflamada mostrou diferenças significativas entre os tecidos. Sob microscopia ótica, o tecido da pata inflamada apresentou características típicas de inflamação, tais como afrouxamento do tecido conjuntivo e espaços claros devido ao extravasamento vascular de fluidos, mas com pequena infiltração celular (Figura 2).

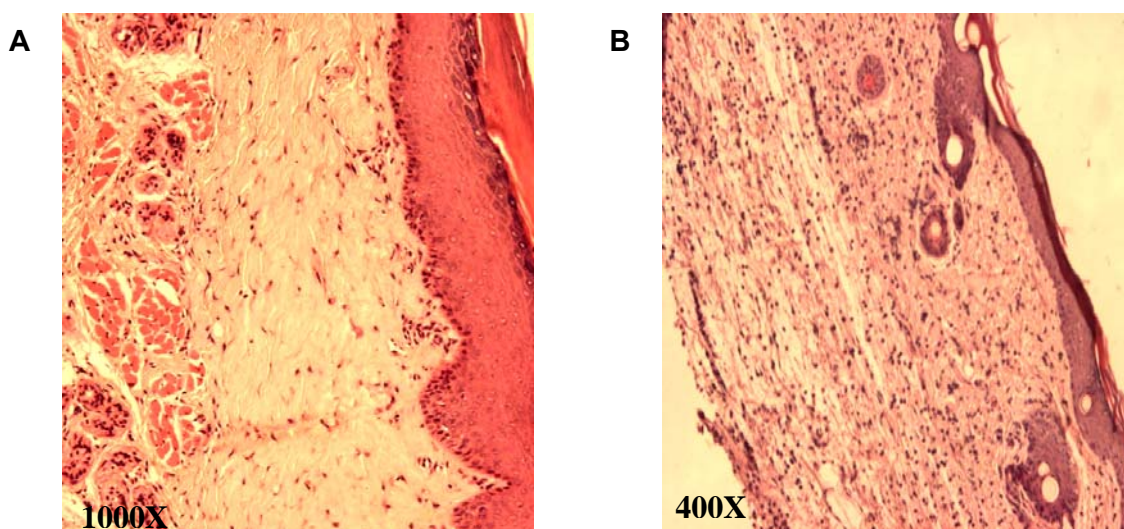


Figura 2. Microfotografias de tecidos da pata normal (A) e inflamada (B) de rato Wistar, 4 horas após injeção subplantar de solução estéril de NaCl 0,9% (p/v) e suspensão de carragenina a 1% (p/v), respectivamente. As amostras foram fixadas em formaldeído a 4% (v/v), incluídas em parafina e cortes de 5 µm foram corados com hematoxilina-eosina.

3.3 Biodistribuição

O perfil de biodistribuição dos ^{99m}Tc -LpHS e do complexo ^{99m}Tc -HMPAO livre administrados por via intravenosa em ratos Wistar foram diferentes (Tabela 1). Os ^{99m}Tc -LpHS foram captados principalmente pelo baço, atingindo o pico máximo em 30 minutos após a sua administração. Essa captação de ^{99m}Tc -LpHS pelo baço manteve-se constante até 4 horas após injeção e, à partir de 8 horas foi observada uma redução da concentração de ^{99m}Tc -LpHS. Para o grupo tratado com ^{99m}Tc -HMPAO livre, o pico de radioatividade também foi atingido 30 minutos após

administração. Entretanto, a quantidade captada de ^{99m}Tc -HMPAO pelo baço foi 18,4 vezes menor do que a observada para ^{99m}Tc -LpHS ($p < 0,001$). A partir de quatro horas, foi observada uma redução significativa da concentração de ^{99m}Tc -HMPAO no baço. No fígado, o pico de radioatividade foi atingido 30 minutos após injeção de ^{99m}Tc -LpHS e de ^{99m}Tc -HMPAO livre. Contudo, a captação de ^{99m}Tc -LpHS foi aproximadamente duas vezes maior do que após a administração de ^{99m}Tc -HMPAO livre ($p < 0,001$). Em duas horas, foi observado no fígado um declínio da radioatividade para ambos os tratamentos. No pulmão, observou-se uma captação de ^{99m}Tc -HMPAO livre maior do que após a administração de ^{99m}Tc -LpHS (cerca de três vezes, $p < 0,001$). Para ambos os tratamentos, a % DI/g máxima foi atingida 30 minutos após injeção do radiofármaco. A quantidade de ^{99m}Tc -HMPAO livre permaneceu constante no pulmão até 4 horas após sua administração. Nos rins, a quantidade de radioatividade máxima para ^{99m}Tc -LpHS ocorreu em 8 horas, seguida por uma diminuição em 18 horas após administração. Para o grupo tratado com ^{99m}Tc -HMPAO livre, a quantidade de radioatividade nos rins apresentou uma flutuação durante todo o período do experimento.

Após administração dos ^{99m}Tc -LpHS o nível de radioatividade na pata direita (foco inflamatório) foi 1,7 vezes maior do que após injeção de ^{99m}Tc -HMPAO livre. A retenção de ^{99m}Tc -LpHS no sítio inflamatório foi mantida constante até 8 horas, enquanto foi observada uma redução na acumulação de ^{99m}Tc -HMPAO livre após 30 minutos da sua administração. Na pata esquerda (controle), foi detectada uma menor captação dos ^{99m}Tc -LpHS em comparação com a pata direita ($p < 0,05$), indicando que a administração de ^{99m}Tc -LpHS leva a uma maior acumulação no sítio inflamatório. Além disso, a captação de ^{99m}Tc -HMPAO nas patas direita e esquerda foi equivalente, com nenhuma diferença significativa observável na captação deste radiofármaco tanto pelo sítio inflamatório quanto pelo sadio ($p > 0,05$).

Tabela 1. Resultados da biodistribuição dos ^{99m}Tc -LpHS e ^{99m}Tc -HMPAO livre em ratos com inflamação na pata direita induzida por carragenina (n = 5)

Órgão	% DI/g de tecido (média ± d.p.)				
	0,5 h	2 h	4 h	8 h	18 h
% DI/g de ^{99m}Tc-LpHS					
Baço	19,21±2,98 *	19,91±1,26*	17,82±0,79*	10,29±0,54*	9,16±2,24*
Fígado	1,847±0,302*	1,371±0,040*	1,555±0,220*	1,203±0,107*	0,667±0,169
Pulmão	0,808±0,111*	0,429±0,060*	0,207±0,045*	0,146±0,022*	0,171±0,032*
Rins	1,393±0,192*	2,994±0,325*	3,352±0,211	4,623±0,179*	1,707±0,123*
Pata direita	0,431±0,060 [#]	0,386±0,059 [#]	0,403±0,045 [#]	0,342±0,076 [#]	0,241±0,031 [#]
Pata esquerda	0,337±0,039 [#]	0,215±0,018 [#]	0,180±0,026 [#]	0,112±0,024 [#]	0,126±0,019 [#]
% DI/g de ^{99m}Tc-HMPAO livre					
Baço	1,043±0,225*	0,539±0,077*	0,752±0,045*	0,248±0,054*	0,386±0,063*
Fígado	1,025±0,128*	0,698±0,118*	0,844±0,059*	0,456±0,063*	0,357±0,051
Pulmão	2,263±0,175*	2,052±0,417*	1,651±0,331*	0,726±0,059*	0,795±0,118*
Rins	2,982±0,408*	1,676±0,189*	2,882±0,285	2,058±0,240*	2,730±0,310*
Pata direita	0,249±0,025*	0,188±0,021*	0,164±0,019*	0,195±0,017 [#]	0,153±0,013
Pata esquerda	0,256±0,035*	0,197±0,035	0,164±0,011	0,146±0,010 [#]	0,121±0,011

* Indicam uma diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos com ^{99m}Tc -LpHS e ^{99m}Tc -HMPAO livre (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$). # Indicam uma diferença estatisticamente significativa entre a pata direita (inflamada) e a pata esquerda (controle) (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

3.4 Identificação de Sítios de Inflamação

O tropismo dos ^{99m}Tc -LpHS para sítios inflamatórios foi confirmado por meio das imagens cintilográficas. As imagens obtidas 2, 4 e 8 horas após administração intravenosa dos ^{99m}Tc -LpHS em ratos Wistar apresentando foco inflamatório na pata direita induzido por carragenina, mostraram uma acumulação de radioatividade na região inflamada (Figura 3). A quantidade de radioatividade nessa região tornou-se

mais proeminente em 4 horas e foi observado até 8 horas após administração dos ^{99m}Tc -LpHS.

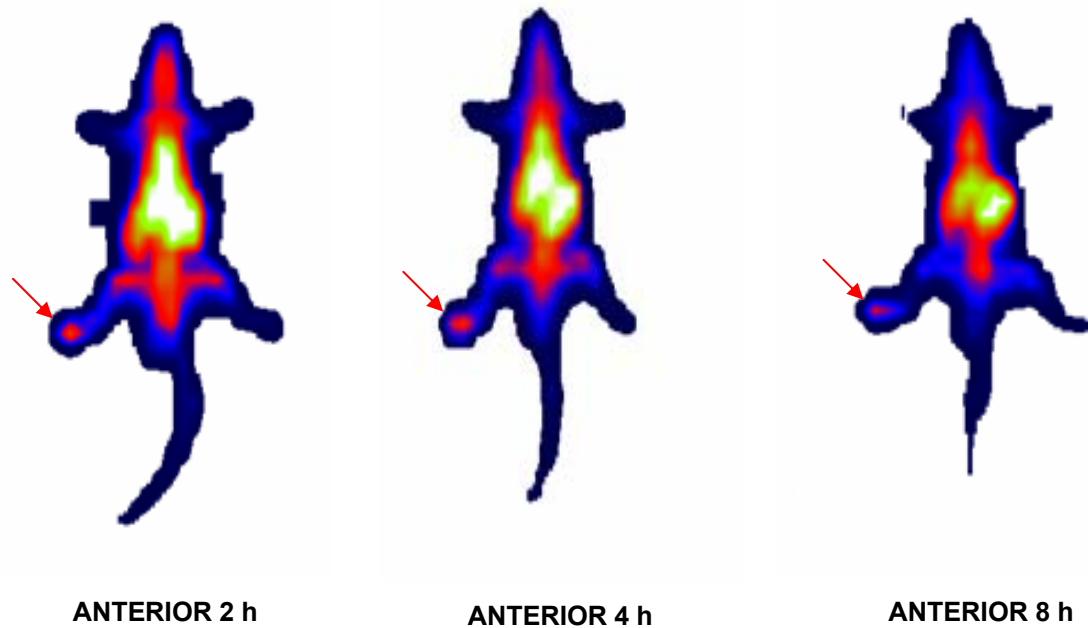


Figura 3. Imagens cintilográficas de rato Wistar com inflamação na pata direita induzida por carragenina, em 2, 4 e 8 horas após injeção dos ^{99m}Tc -LpHS. As setas indicam o foco inflamatório na pata direita.

O radiofármaco foi, também, removido pelos órgãos do SFM, tais como fígado e baço.

A quantidade de radioatividade nas regiões de interesse e a relação alvo/não-alvo determinadas para cada intervalo de tempo são mostradas na Figura 4.

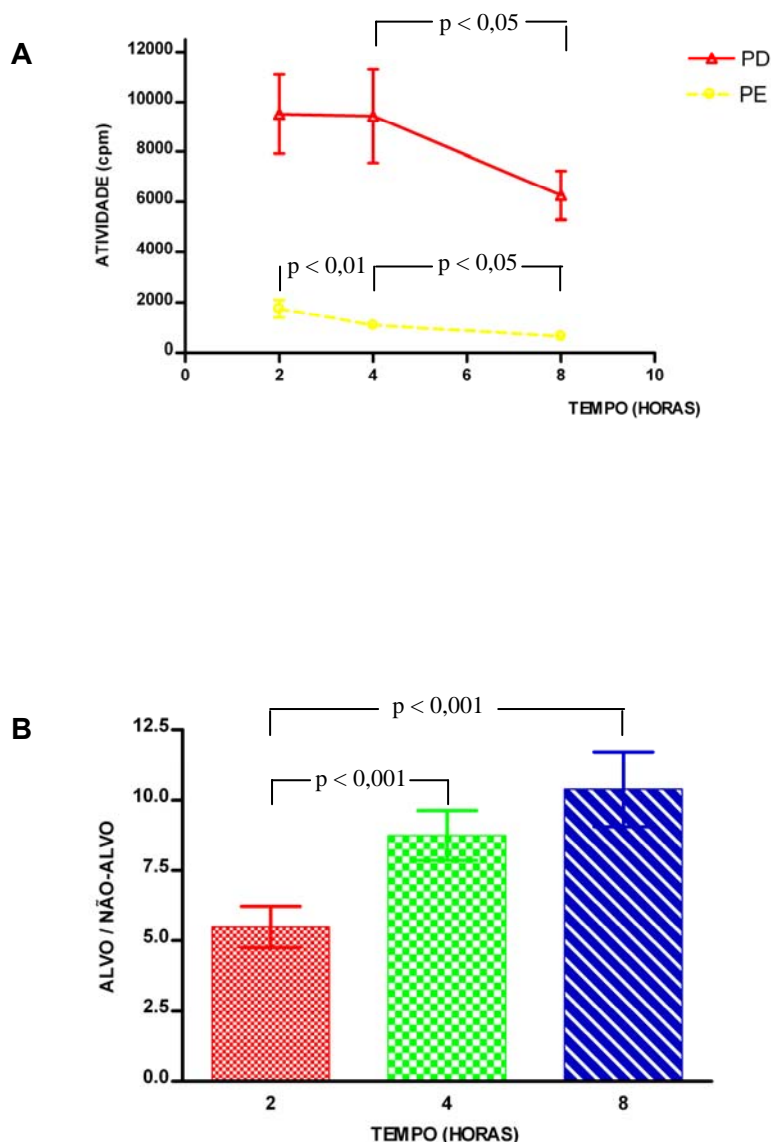


Figura 4. Análise quantitativa (média \pm d.p.) das imagens cintilográficas de ratos injetados com ^{99m}Tc -LpHS após injeção subplantar de carragenina (n=5). **A** - Atividade retida no foco inflamatório (PD = pata direita) e na área contralateral não inflamada (PE = pata esquerda). **B** - Relação alvo/não-alvo. Diferenças estatisticamente significativa são indicadas.

O sítio inflamatório (pata direita) mostrou uma elevada atividade (9500 cpm) 2 horas após administração dos ^{99m}Tc -LpHS. Essa atividade permaneceu suficientemente elevada até 8 horas após injeção. Por outro lado, o controle (pata esquerda) mostrou uma menor atividade durante todo o tempo de investigação (Figura 4A). O valor da

relação alvo/não-alvo foi de $5,49 \pm 0,74$ em 2 horas, com um aumento nesta relação ocorrendo com o decorrer do tempo ($10,39 \pm 1,33$ em 8 horas), como mostrado na Figura 4B. Esses resultados indicam uma localização preferencial dos $^{99m}\text{Tc-LpHS}$ no sítio de inflamação em relação à pata contralateral não-inflamada.

4 DISCUSSÃO

Tem sido demonstrado que a eficiência de marcação de lipossomas usando $^{99m}\text{Tc-HMPAO}$ depende da sua lipofilicidade. Essa característica permite que o complexo $^{99m}\text{Tc-HMPAO}$ passe através da membrana lipídica dos lipossomas. Neste estudo, a lipofilicidade do $^{99m}\text{Tc-HMPAO}$ estava de acordo com as recomendações para o seu transporte através de membranas lipofílicas (GOINS et al., 1993) e, conseqüentemente, a marcação dos lipossomas pH-sensíveis de longa circulação foi eficiente (85%).

O diâmetro pequeno dos $^{99m}\text{Tc-LpHS}$ foi apropriado para uso na identificação de focos inflamatórios. O tamanho pequeno dos lipossomas é importante para o seu extravasamento da corrente sanguínea numa região caracterizada por um maior fluxo sanguíneo e um aumento da permeabilidade vascular, como ocorre na região inflamada (CROMMELIN et al., 1999; ERDOGAN et al., 2000). Ao contrário, lipossomas grandes não se acumulam em sítios inflamatórios uma vez que são rapidamente retirados da circulação pelos órgãos do SFM (OYEN et al., 1996_a).

Além disso, o presente trabalho propôs uma nova formulação de lipossoma para diagnóstico de inflamação, composta de DOPE, CHEMS e mPEG₂₀₀₀-DSPE, conhecidos como lipossomas pH-sensíveis de longa circulação. Esses lipossomas foram marcados com $^{99m}\text{Tc-HMPAO}$ devido à sua irreversível encapsulação na presença de glutathione. Este tipo de lipossoma é, por si só, uma estratégia para a identificação de sítios de inflamação como uma conseqüência de sua habilidade para liberar, preferencialmente, o radiotraçador nessa região devido ao seu mais baixo pH quando comparado ao tecido normal. Ainda, um sistema de diagnóstico adequado deve ter uma quantidade suficiente de atividade acima da radiação de

fundo do tecido normal. Para identificação de uma região inflamada, a relação alvo/não-alvo deve ser de pelo menos 1,5, a qual permite aquisição de imagens de melhor qualidade (ERDOGAN et al., 2000; PHILLIPS, 1999).

Lipossomas não-pH-sensíveis tem sido usados em estudos para identificação de focos inflamatórios. Contudo, nos tempos iniciais de aquisição de imagem, esses sistemas mostram uma relação alvo/não-alvo muito próxima do limite ideal, requerendo um tempo prolongado para obtenção de imagens cintilográficas de melhor qualidade (AWASTHI et al., 1998; BOERMAN et al., 1995; GOINS et al., 1993; OYEN et al., 1996_a). Esse fato representa um inconveniente para o paciente. Assim, é notável que os ^{99m}Tc-LpHS forneceram, em um mais curto espaço de tempo, uma alta relação alvo/não-alvo, sendo essa maior do que a observada para outros lipossomas não-pH-sensíveis. Isso pode ser observado em nossos estudos de biodistribuição, quando foi possível detectar 0,43% DI/g em 30 minutos após injeção dos ^{99m}Tc-LpHS. Ao contrário, o mesmo nível de captação foi obtido por Goins et al. (1993) usando lipossomas convencionais não-pH-sensíveis, compostos de diestearilfosfatidilcolina, dimiristilfosfatidilglicerol e colesterol, somente 24 horas após injeção. Com o uso de lipossomas de longa circulação não-pH-sensíveis, Oyen et al. (1996_a) também relataram à mesma captação absoluta somente 2 horas após administração. Os resultados de biodistribuição também foram confirmados pelas análises das imagens cintilográficas mostrando uma relação alvo/não-alvo maior do que em outros estudos no tempo de 2 horas após administração dos ^{99m}Tc-LpHS. A relação alvo/não-alvo obtida com ^{99m}Tc-LpHS mostrou um constante aumento entre os intervalos de tempo (5,5 em 2 horas; 8,7 em 4 horas e 10,4 em 8 horas). Ao contrário, em outros estudos de imagem usando lipossomas de longa circulação não-pH-sensíveis como radiofármaco para identificar foco inflamatório estéril, a maior relação alvo/não-alvo foi igual a 8 em 10 horas após injeção (OYEN et al., 1996_a).

Assim, nossos resultados indicam uma forte contribuição dos ^{99m}Tc-LpHS para acumularem-se especifica e rapidamente no foco inflamatório, além de serem depurados de forma contínua e rápida dos tecidos não-alvo, permitindo a visualização da lesão em um curto espaço de tempo após a sua administração.

Além da acumulação no foco inflamatório, uma alta captação dos ^{99m}Tc -LpHS também foi observada no baço, a qual diminuiu com o tempo, como observado por outros autores usando lipossomas não-pH-sensíveis de longa circulação (AWASTHI et al., 1998; OYEN et al., 1996_a). Esses resultados eram esperados considerando que o baço é o órgão do SFM responsável pela depuração sanguínea de partículas. O aumento da captação absoluta dos ^{99m}Tc -LpHS nos rins, observado em 2 e 8 horas, pode ser resultado da degradação dos lipossomas no fígado e no baço, assim liberando ^{99m}Tc -HMPAO das células para sua eliminação renal, como citado na literatura (PHILLIPS et al., 1992).

5 CONCLUSÃO

Em conclusão, os lipossomas pH-sensíveis de longa circulação, como carreadores de agentes de imagem para a identificação de focos inflamatórios em modelo de rato, demonstraram ser uma interessante estratégia para obter imagem cintilográfica em curto espaço de tempo após sua administração. Esse resultado aponta para um produto que poderá propiciar um diagnóstico mais rápido e eficiente diagnóstico, além de contribuir para uma menor dose de radiação.

CAPÍTULO III

LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE LONGA CIRCULAÇÃO MARCADOS COM TECNÉCIO-99m: UMA NOVA ESTRATÉGIA PARA IDENTIFICAR INFECÇÃO EM MODELO EXPERIMENTAL

RESUMO

O diagnóstico de processos inflamatórios e infecciosos é importante em medicina, pois permite o tratamento adequado. O uso de radiofármacos para identificação de focos de inflamação e infecção tem recebido considerável atenção. O objetivo deste trabalho foi avaliar a biodistribuição e o potencial de imagem de lipossomas pH-sensíveis de longa circulação radiomarcados com ^{99m}Tc ($^{99m}\text{Tc-LpHS}$) para identificar sítios de infecção em camundongos. Os lipossomas contendo glutationa foram marcados com o complexo $^{99m}\text{Tc-HMPAO}$. Os $^{99m}\text{Tc-LpHS}$ foram injetados, por via intravenosa, em camundongos com infecção induzida por *S. aureus* no músculo da coxa direita. Estudos de biodistribuição e imagem cintilográfica foram realizados em diferentes tempos após injeção do radiofármaco. Os $^{99m}\text{Tc-LpHS}$ foram captados significativamente pelo abscesso quando comparado ao respectivo controle. O abscesso foi visualizado 30 minutos após injeção dos $^{99m}\text{Tc-LpHS}$. A atividade no tecido não-infectado (não-alvo) diminuiu com o tempo e, conseqüentemente, nas imagens tardias uma maior relação abscesso/não-alvo foi obtida. Esses resultados indicam que o $^{99m}\text{Tc-LpHS}$ pode constituir-se em um promissor radiofármaco para identificação de focos infecciosos.

1 INTRODUÇÃO

As imagens cintilográficas adquiridas por meio da medicina nuclear permitem a identificação de processos inflamatórios e infecciosos em várias partes do corpo mediante a administração intravenosa de substâncias radiomarcadas e pela detecção de radioatividade usando uma gama-câmara. Em geral, a sensibilidade dessa técnica permite a detecção de processos fisiopatológicos no estágio inicial, antes do desenvolvimento de alterações anatômicas que são identificadas por técnicas radiográficas convencionais, e antes dos sintomas clínicos da doença (SIGNORE et al., 2002).

Os radiofármacos mais comumente usados para imagens de inflamação e infecção são o ^{67}Ga -Citrato e leucócitos autólogos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO. O ^{67}Ga -Citrato tem sido usado para identificar processos infecciosos por mais de três décadas, mas apresenta uma baixa especificidade e expõe o paciente a uma alta dose de radiação. Além disso, as imagens são obtidas com 18 a 72 horas após sua administração (CHIANELLI et al., 1997; LOVE e PALESTRO, 2004). O uso de leucócitos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é considerado “método padrão ouro” para imagens de infecção e inflamação. Entretanto, o processo de marcação *in vitro* é laborioso e envolve o manuseio direto de sangue potencialmente contaminado (CORSTEN e VAN DER MEER, 1999; LOVE e PALESTRO, 2004; RENNEN et al., 2005). Considerando as desvantagens desses radiofármacos, muitos esforços têm sido dedicados à pesquisa de novos agentes de imagens cintilográficas que possibilitem a identificação rápida e eficiente de focos de inflamação e infecção com um alto nível de sensibilidade e especificidade (LAVERMAN et al., 1999; LOVE e PALESTRO, 2004; VAN EERD et al., 2005).

Lipossomas de longa circulação radiomarcados, em geral compostos de EPC, COL e um polímero hidrofílico ligado a uma molécula de fosfolípide (mPEG₂₀₀₀-DSPE) têm sido estudados como agentes de imagem para identificação de processos inflamatórios e infecciosos. Entretanto, nos estudos clínicos usando estas composições de lipossomas foi observado que alguns pacientes apresentaram reações de hipersensibilidade atribuídas à ativação do sistema complemento

(BROUWERS et al., 2000; DAMS et al., 2000_b). Assim, de acordo com a literatura é de fundamental importância investigar uma nova composição lipossomal com objetivo de evitar ou minimizar esse inconveniente (BOERMAN et al., 2000; BROUWERS et al., 2000; DEVINE e BRADLEY, 1998; MOGHIMI e SZEBENI, 2003; SZEBENI, 2005).

Os lipossomas pH-sensíveis são planejados para promover uma eficiente liberação do agente encapsulado em resposta ao baixo pH de um tecido patológico, tais como áreas inflamadas e infectadas (SIMÕES et al., 2004). Dessa forma, eles são potenciais candidatos para preparação de radiofármacos para auxiliar no diagnóstico de processos inflamatórios e infecciosos.

Neste estudo, um novo radiofármaco foi desenvolvido baseando-se em lipossomas pH-sensíveis de longa circulação marcados com ^{99m}Tc -HMPAO. Esses lipossomas são compostos de DOPE, CHEMS e mPEG₂₀₀₀-DSPE. O DOPE forma estruturas que não são lamelares devido a sua geometria molecular em forma de cone. Porém, na presença de moléculas anfifílicas fracamente ácidas, como por exemplo o CHEMS, e em pH neutro tem-se sua organização supramolecular na forma de bicamadas (lamelar). A adição de moléculas anfifílicas fracamente ácidas às moléculas de DOPE ocasiona o aparecimento de repulsões eletrostáticas entre as mesmas, reduzindo as interações intermoleculares entre as moléculas de DOPE e suas propriedades fusogênicas. Entretanto, sob condições ácidas, tais como em regiões de inflamação e infecção, as moléculas anfifílicas ácidas, como o CHEMS, tornam-se parcialmente protonadas, perdendo sua capacidade de estabilizar a bicamada das vesículas com a subsequente liberação do marcador radioativo encapsulado.

Neste estudo, os ^{99m}Tc -LpHS foram investigados quanto ao seu potencial uso como radiofármaco para imagem de infecção em um modelo experimental.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

DOPE e mPEG₂₀₀₀-DSPE foram doados pela Lipoid GmbH (Alemanha). CHEMS e glutathiona (GSH) foram comprados da Sigma Chemical Company (EUA). O ^{99m}Tc foi obtido de um gerador de molibdênio-99 (IPEN/Brasil) e o HMPAO foi obtido por reconstituição do kit Ceretec[®] (Amersham Health, Inglaterra). O Sephadex G-25 foi adquirido da Pharmacia[®] (Suécia). Todos os outros reagentes usados foram de grau analítico. Camundongos machos Swiss foram fornecidos pelo biotério da Faculdade de Farmácia/UFMG e mantidos no laboratório de Radioisótopos da Faculdade de Farmácia/UFMG durante os experimentos, tendo livre acesso à ração e água.

2.2 Métodos

2.2.1 Preparação dos lipossomas

Os lipossomas contendo glutathiona (GSH) encapsulada foram preparados usando o procedimento de extrusão em membranas de policarbonato, como descrito previamente por Laverman et al. (1999). Inicialmente, alíquotas das soluções clorofórmicas de DOPE, CHEMS e mPEG₂₀₀₀-DSPE (concentração lipídica de 40 mM; razão molar 6,5/3,0/0,5, respectivamente) foram transferidas para um balão de fundo redondo e um filme lipídico foi formado pela evaporação do clorofórmio em um rotavapor (Buchi R215, Suíça) sob pressão reduzida. O filme lipídico foi hidratado, a temperatura ambiente, com tampão Hepes (10 mM Hepes, 135 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7,4) contendo 50 mM de GSH. A suspensão de lipossomas obtida foi submetida à filtração através de membranas de policarbonato (Millipore, EUA) de 0,4 µm, 0,2 µm e 0,1 µm (10 ciclos para cada) usando um extrusor de pressão média (Lipex Biomembranes Inc., Canadá). A GSH não encapsulada foi separada dos lipossomas por ultracentrifugação (Ultracentrifuga Sorvall Ultra 80, EUA) em 150 000 g a 4 °C por 90 minutos.

O diâmetro médio dos lipossomas contendo GSH encapsulada foi determinado pela análise monomodal por espectroscopia de correlação de fótons, a 25 °C a um ângulo de 90°. A medida de diâmetro foi realizada em triplicata usando o equipamento Zetasizer (Malvern Instruments, Inglaterra). As amostras foram diluídas usando tampão Hepes pH 7,4.

2.2.2 Procedimento de marcação

O kit de HMPAO comercialmente disponível foi marcado com ^{99m}Tc , sem adição do estabilizador azul de metileno, de acordo com as instruções do fabricante. A eficiência de marcação foi determinada mediante o emprego do método de extração com solvente usando solução de NaCl a 0,9% (p/v) como fase aquosa e clorofórmio como fase orgânica (BARTHEL et al., 1999). A marcação dos lipossomas pH-sensíveis de longa circulação contendo GSH encapsulada foi realizada como descrito previamente por Phillips et al. (1992), com pequenas modificações. Os lipossomas pré-formados foram marcados pelo transporte do ^{99m}Tc como um complexo lipofílico ^{99m}Tc -HMPAO através da bicamada lipídica. Os lipossomas foram incubados por 30 minutos a 37 °C com ^{99m}Tc -HMPAO preparado imediatamente antes do uso (1 MBq/ μmol de fosfolípides). O complexo ^{99m}Tc -HMPAO lipofílico passa através da bicamada lipídica atingindo a fase aquosa dos lipossomas, onde é convertido pela ação da glutatona em ^{99m}Tc -HMPAO hidrofílico, tornando-se irreversivelmente encapsulado na fase aquosa interna das vesículas (BALLINGER et al., 1988; PHILLIPS et al., 1992). O complexo ^{99m}Tc -HMPAO não encapsulado foi removido por filtração em gel usando uma coluna de Sephadex G-25 e tampão Hepes (pH 7,4) como eluente. A eficiência de marcação foi avaliada pela determinação da atividade antes e após a separação dos ^{99m}Tc -LpHS usando um calibrador de dose (Capintec CRC.15R, EUA). Os ^{99m}Tc -LpHS foram administrados, imediatamente após purificação, em camundongos com infecção por *S. aureus* no músculo da coxa direita.

2.2.3 Preparo da suspensão de *Staphylococcus aureus*

Para o preparo da suspensão de *S. aureus* (ATCC 6538), colônias da bactéria foram transferidas, com o auxílio de uma alça de platina, para uma placa de Petri contendo o meio ágar antibiótico número 1 estéril. Incubou-se em estufa a 37 °C durante 20 horas. Após o tempo de incubação, com auxílio de uma alça de platina, as colônias de *S. aureus* foram transferidas para 10 mL de solução de NaCl 0,9% (p/v) estéril contidos em um tubo de ensaio. Fez-se a agitação em vórtex para dispersão e, em seguida, a leitura da transmitância em espectrofotômetro (Coleman 6120, Maywood, EUA) a 580 nm. Este procedimento foi realizado até que o número de bactérias dispersas na solução de NaCl 0,9% (p/v) fornecesse uma leitura de 13% de transmitância, equivalente a aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. Em seguida, a suspensão foi transferida para um tubo falcon de 15 mL e centrifugada (740 g) durante 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi disperso em 1,0 mL de solução de NaCl 0,9% (p/v) estéril, com agitação no vórtex.

2.2.4 Modelo animal

Para os estudos *in vivo* foram usados camundongos Swiss, machos, com peso entre 20 g a 25 g (Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil). O foco infeccioso no músculo da coxa direita foi induzido por injeção intramuscular de 0,05 mL de uma suspensão contendo 2×10^7 UFC de *S. aureus* em solução de NaCl 0,9% (p/v) estéril. No músculo da coxa esquerda, usado como controle, foram injetados 0,05 mL de solução estéril de NaCl 0,9% (p/v). Transcorridas 24 horas da indução do foco infeccioso, quando o intumescimento do músculo era aparente, os ^{99m}Tc -LpHS foram injetados na veia da cauda dos camundongos.

Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais e estão em conformidade com o guia para o cuidado e uso de animais de laboratório recomendado pelo *Institute of Laboratory Animal Resources*.

2.2.5 Estudos de biodistribuição

Após 24 horas da indução do foco infeccioso, 1,5 MBq dos ^{99m}Tc -LpHS foram injetados na veia da cauda dos camundongos (n=3). Em tempos pré-estabelecidos de 30 minutos, 2, 4, 8 e 18 horas após administração do radiofármaco os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina (7,5 mg/kg) e cetamina (60 mg/kg) e, depois, sacrificados por deslocamento cervical. Amostras de sangue foram coletadas e o fígado, o baço, os pulmões, os rins, os músculos das coxas direita (infectado) e esquerda (controle) foram removidos. Os tecidos dissecados foram lavados com água destilada, secos com papel de filtro, pesados e a quantidade de radioatividade foi determinada em um cintilador de poço automático (ANSR – Abbot, EUA) programado para detectar a radiação gama na janela de 70-210 keV de energia referente ao ^{99m}Tc . Uma dose padrão contendo a mesma quantidade de radioatividade injetada foi contada simultaneamente em um tubo separado, para corrigir o decaimento físico e para calcular a captação do radiofármaco em cada órgão. A radioatividade medida em cada órgão foi expressa como percentagem da dose injetada por grama de tecido (% DI/g), calculados pela seguinte equação:

$$\% \text{ DI/g} = \frac{\text{cpm/g de tecido}}{\text{cpm da dose padrão}} \times 100$$

Onde: cpm = contagem por minuto

2.2.6 Estudos de imagem

Os ^{99m}Tc -LpHS (50 MBq) foram injetados na veia da cauda de camundongos Swiss machos (n=5), os quais apresentavam sítio de infecção no músculo da coxa direita. Nos tempos de 30 minutos, 1, 2, 4, 6 e 18 horas após injeção dos ^{99m}Tc -LpHS, os camundongos foram anestesiados com uma mistura de xilazina (7,5 mg/kg) e cetamina (60 mg/kg), colocados em decúbito dorsal sob uma gama-câmara (NucleineTM TH, Mediso, Hungria) equipada com um colimador de baixa energia e alta resolução. Foram adquiridas imagens estáticas planares de 5 minutos em todos

os tempos, exceto para o tempo de 18 horas (tempo de aquisição de imagem foi de 10 minutos), usando uma matriz 256 x 256 pixels.

As imagens foram analisadas determinando-se a radioatividade nas regiões de interesse (ROI) pelo delineamento em torno do músculo infectado (abscesso), do músculo contralateral não infectado (não-alvo) e de todo o corpo do animal para determinar a contagem total do corpo. A relação abscesso/não-alvo e a percentagem de atividade no abscesso nos vários tempos investigados foram determinadas pelas seguintes equações:

$$\text{Relação abscesso/não-alvo} = \frac{\text{Contagem no abscesso}}{\text{Contagem no músculo contralateral}} \times 100$$

$$\% \text{ Atividade no abscesso} = \frac{\text{Contagem do abscesso}}{\text{Contagem total do corpo}} \times 100$$

2.3 Análise Estatística

Todos os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (e.p.). Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) *one-way* e corrigidos pelo teste de comparação múltipla de Tukey usando o programa Prism versão 4 (GraphPad Software, Inc., EUA). Para todas as análises adotou-se o intervalo de confiança de 95%, sendo que as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de *p* foi menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$).

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização dos ^{99m}Tc -LpHS

O diâmetro médio e o índice de polidispersão das vesículas foi de $116,3 \pm 3,96$ nm e $0,17 \pm 0,01$, respectivamente, mostrando uma boa homogeneidade. O nível de lipofilicidade do HMPAO, obtido pelo método de extração com solvente, foi de 80%. A eficiência média de marcação dos LpHS foi de 77%.

3.2 Estudos de Biodistribuição

Os dados de biodistribuição obtidos da contagem de radioatividade nos tecidos dissecados de camundongos Swiss apresentando infecção induzida por *S. aureus* no músculo da coxa direita após administração intravenosa dos ^{99m}Tc -LpHS são mostrados na Tabela 1. Os resultados indicam que os ^{99m}Tc -LpHS foram captados principalmente pelo fígado e baço, atingindo o pico máximo em 30 minutos e 2 horas após sua administração, respectivamente. No fígado, a percentagem captada dos ^{99m}Tc -LpHS manteve-se constante até 4 horas ($p > 0,05$) após injeção, sendo observado um declínio do nível de radioatividade a partir de 4 horas ($p < 0,01$). Para o baço, a quantidade de radioatividade foi constante entre 2 e 8 horas ($p > 0,05$) e após esse tempo observou-se uma redução da concentração dos ^{99m}Tc -LpHS. No pulmão, a % DI/g máxima ocorreu em 30 minutos e permaneceu constante até 4 horas após administração dos ^{99m}Tc -LpHS. As análises das amostras de sangue indicaram que a quantidade de radioatividade foi constante até 4 horas ($p > 0,05$). Nos tempos subseqüentes (8 e 18 horas), a concentração dos ^{99m}Tc -LpHS no sangue foi reduzida em torno de duas vezes em relação ao tempo anterior. A quantidade de radioatividade nos rins apresentou uma flutuação durante o experimento, com a retenção máxima de radioatividade ocorrendo em 30 minutos e 4 horas, seguida por uma diminuição após esses tempos. No músculo da coxa direita (abscesso) não foi observada diferença estatisticamente significativa na % DI/g entre os tempos investigados após administração dos ^{99m}Tc -LpHS. Por outro lado, no músculo da coxa esquerda (não-alvo) foi observada uma menor captação

dos ^{99m}Tc -LpHS em todos os tempos investigados, exceto em 30 minutos, quando comparado com o músculo da coxa direita (abscesso) ($p > 0,05$). Esses resultados indicam que a administração de ^{99m}Tc -LpHS leva a uma maior acumulação de radioatividade no abscesso.

Tabela 1. Biodistribuição dos ^{99m}Tc -LpHS administrados por via intravenosa em camundongos Swiss com infecção, induzida por *S. aureus*, no músculo da coxa direita (n=3)

Órgão	% DI/g de tecido (média ± e.p.)				
	0,5 h	2 h	4 h	8 h	18 h
Pulmão	1,86±0,17	1,64±0,29	1,56±0,12	0,83±0,10	0,85±0,13
Fígado	21,34±1,89	16,83±1,98	16,71±1,01	12,63±0,89	9,56±0,64
Baço	21,08±2,10	34,69±4,25	33,75±1,74	22,72±1,60	16,96±2,52
Rins	9,26±0,23	6,83±0,89	9,08±0,96	6,55±0,41	5,66±0,37
Coração	1,84±0,20	1,29±0,26	1,33±0,25	0,59±0,04	0,42±0,09
Sangue	3,58±0,58	3,17±0,62	3,69±0,45	1,80±0,18	0,74±0,18
Músculo coxa direita	1,21±0,05	1,36±0,22*	1,55±0,11*	1,11±0,06*	0,91±0,12*
Músculo coxa esquerda	1,03±0,03	0,80±0,12*	0,97±0,15*	0,51±0,02*	0,33±0,06*

Os asteriscos indicam uma diferença estatisticamente significativa entre o músculo da coxa direita (abscesso) e o músculo da coxa esquerda (não-alvo). (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

3.3 Estudos de Imagem

A Figura 1 mostra as imagens cintilográficas obtidas em diferentes tempos após administração por via intravenosa dos ^{99m}Tc -LpHS em camundongos Swiss com infecção no músculo da coxa direita. As imagens mostraram que ocorre uma maior captação dos ^{99m}Tc -LpHS no músculo da coxa direita (abscesso) em relação ao

tecido não infectado (coxa esquerda), com o abscesso sendo visualizado 30 minutos após injeção dos ^{99m}Tc -LpHS. Observa-se também um alto nível de radioatividade no abdômen, sugerindo captação dos ^{99m}Tc -LpHS pelos órgãos do sistema fagocitário mononuclear (SFM), tais como fígado e baço. Os resultados da biodistribuição observados nas imagens estão de acordo com os dados da biodistribuição obtidos dos tecidos dissecados, mostrando alto nível de radioatividade nos órgãos do SFM. Ressalta-se, ainda, uma alta concentração de radioatividade na bexiga.

A análise quantitativa das imagens é mostrada na Figura 2. A relação entre o abscesso e o não-alvo foi de $1,58 \pm 0,08$ em 30 minutos, aumentando significativamente para $2,62 \pm 0,20$ em 18 horas após injeção dos ^{99m}Tc -LpHS (Figura 2A, $p < 0,01$). A percentagem de atividade no abscesso foi de $1,76 \pm 0,06$ % DI/g em 30 minutos com um aumento significativo para $3,44 \pm 0,24$ % DI/g em 18 horas (Figura 2B, $p < 0,01$). Esses resultados indicam uma acumulação preferencial dos ^{99m}Tc -LpHS no abscesso quando comparado ao músculo contralateral não infectado.

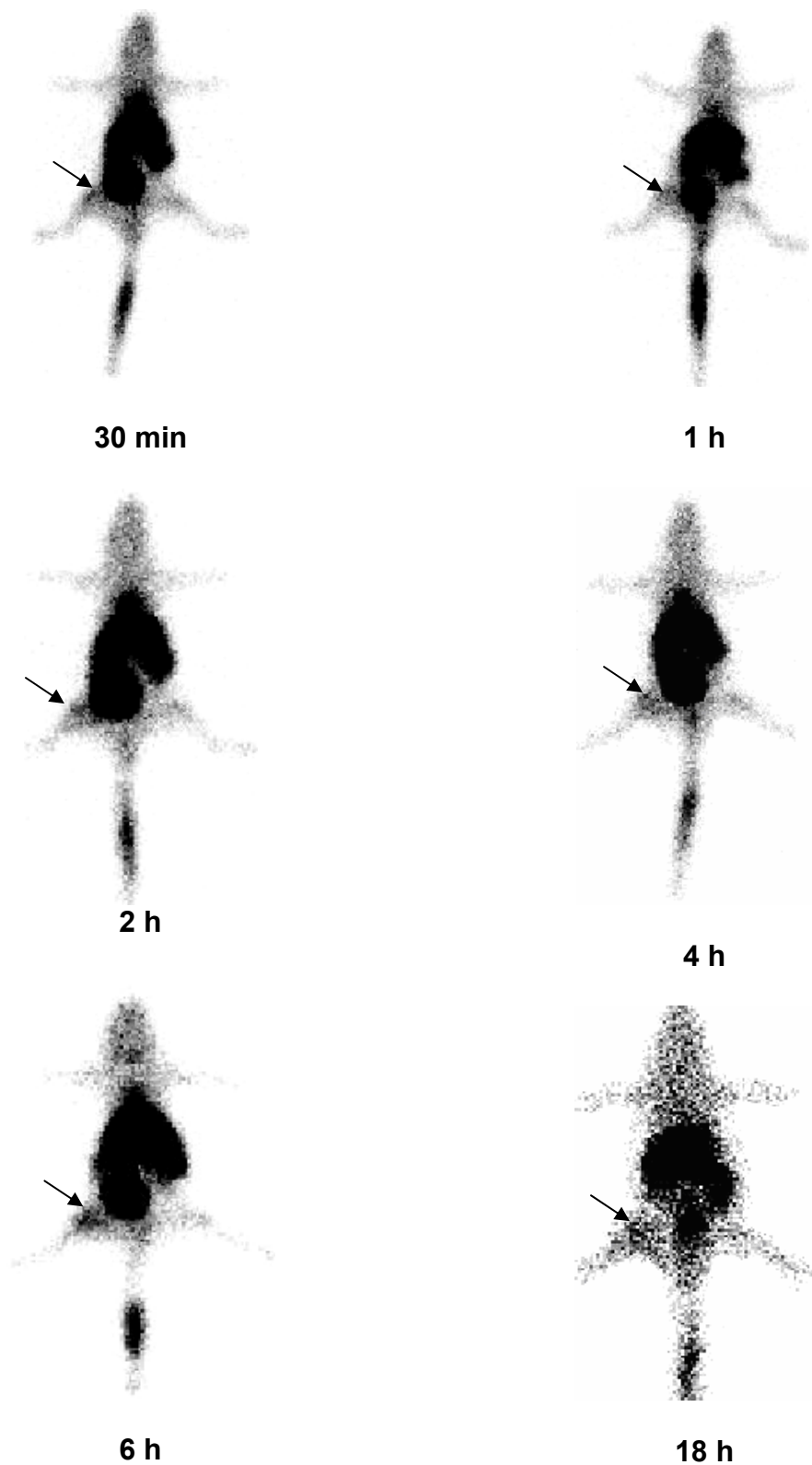
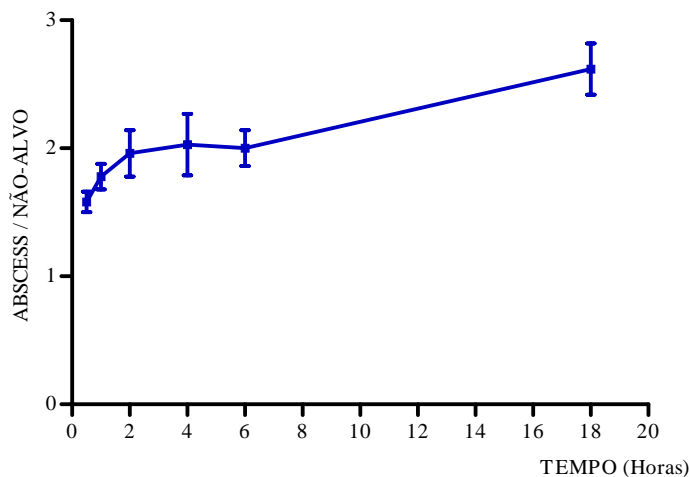


Figura 1. Imagens cintilográficas (visão ventral) de camundongo Swiss com infecção por *S. aureus* no músculo da coxa direita nos tempos de 30 minutos, 1, 2, 4, 6 e 18 horas após injeção dos ^{99m}Tc -LpHS. As setas indicam o sítio de infecção.

A



B

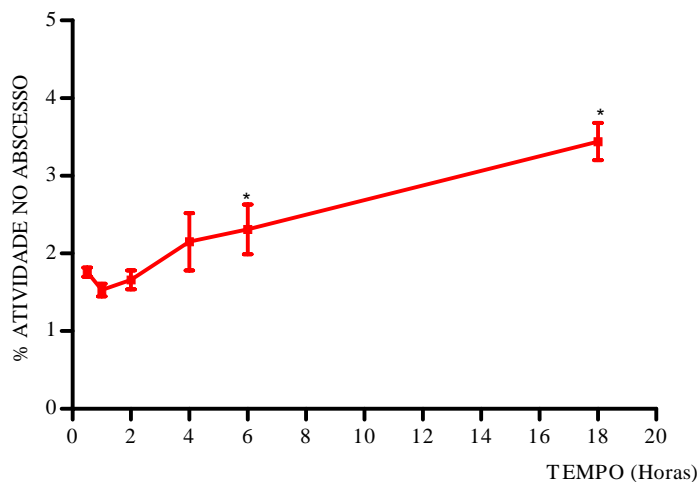


Figura 2. Análise quantitativa das imagens cintilográficas de camundongos com infecção por *S. aureus* no músculo da coxa direita após injeção intravenosa de ^{99m}Tc -LpHS (n = 5). **A** - Relações abscesso/não-alvo calculadas a partir da análise do ROI das imagens. **B** - Percentagem de atividade no abscesso determinada a partir da análise do ROI das imagens. *Indicam diferença estatisticamente significativa (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

4 DISCUSSÃO

Tem sido mostrado que lipossomas radiomarcados são potenciais agentes de imagem para auxiliar no diagnóstico de focos inflamatórios e infecciosos uma vez que eles são capazes de se acumularem nestas áreas (BOERMAN et al., 2000). O mecanismo pelo qual os lipossomas radiomarcados se acumulam em sítios de infecção e inflamação é decorrente do extravasamento das vesículas através dos vasos sanguíneos devido à permeabilidade aumentada observada nesses processos e subsequente fagocitose pelos macrófagos presentes nos tecidos infectados (ERDOGAN et al., 2000; GOINS et al., 1993; LAVERMAN et al., 2001). Além disso, no tecido inflamado os vasos sanguíneos apresentam junções endoteliais que permitem o escape de partículas menores que 200 nm da circulação sanguínea (CROMMELIN et al., 1999). Os lipossomas usados neste trabalho apresentaram um tamanho pequeno ($116,3 \pm 3,96$ nm). Os dados de biodistribuição e imagens cintilográficas (região de interesse) mostraram que os ^{99m}Tc -LpHS foram significativamente captados pelo alvo indicando o seu extravasamento da circulação sanguínea para os tecidos.

Estudos têm demonstrado que lipossomas pequenos (100 – 200 nm) permanecem na circulação sanguínea por um longo período, resultando em uma maior acumulação no sítio de infecção (AWASTHI et al., 2003; BOERMAN et al., 1997; CROMMELIN et al., 1999; ERDOGAN et al., 2000; LITZINGER et al., 1994). Ao contrário, lipossomas grandes não são retidos em focos infecciosos uma vez que eles são rapidamente retirados da circulação pelos órgãos do SFM (OYEN et al., 1996_a). Desta forma, os dados obtidos nesse estudo estão de acordo com a literatura no que diz respeito à relação entre o tamanho dos lipossomas e a acumulação em sítios infecciosos.

Os lipossomas pH-sensíveis de longa circulação contendo glutationa foram marcados com o complexo lipofílico ^{99m}Tc -HMPAO. De acordo com Phillips et al. (1992), esse método de marcação apresenta alta eficiência e fornece lipossomas radiomarcados estáveis *in vivo*. Contudo, a lipofilicidade do complexo ^{99m}Tc -HMPAO é crucial na eficiência de marcação dos lipossomas, pois é essa característica que

possibilita sua passagem através da membrana lipídica das vesículas. Neste estudo, o nível de lipofilicidade do ^{99m}Tc -HMPAO estava de acordo com as recomendações do fabricante e, assim, promoveu uma boa eficiência de marcação dos lipossomas pH-sensíveis de longa circulação (77%). Além disso, foi usado o isótopo ^{99m}Tc que apresenta características ideais de dosimetria, sendo adequado para imagens de focos infecciosos (ERDOGAN et al., 2000).

Neste trabalho, uma nova formulação de lipossomas contendo DOPE, CHEMS e mPEG₂₀₀₀-DSPE em sua composição, conhecidos como lipossomas pH-sensíveis de longa circulação, foi preparada e avaliada a sua biodistribuição e habilidade para identificar foco infeccioso. A característica pH-sensível desse tipo de lipossoma constitui, naturalmente, uma estratégia direcionada para a identificação de sítios de infecção como uma consequência de sua capacidade de liberar o radiotraçador preferencialmente nessa região devido ao pH ácido em relação ao tecido normal.

O agente de imagem para diagnóstico de infecção deve acumular-se especifica e rapidamente no foco, bem como ser rapidamente depurado dos tecidos normais para permitir a visualização do foco em um tempo curto após a sua administração (CORSTEN e VAN DER MEER, 1999; RENNEN et al., 2001). Os estudos de biodistribuição e de imagem demonstraram o tropismo dos ^{99m}Tc -LpHS para focos infecciosos. A captação no músculo infectado foi significativamente maior do que no músculo não infectado (controle). Estes resultados foram confirmados pelas imagens cintilográficas que mostraram acumulação dos ^{99m}Tc -LpHS no abscesso possibilitando a sua visualização dentro do tempo de 30 minutos. Segundo Phillips (1999), para imagem de lesões inflamatórias e infecciosas a relação entre abscesso e o não-alvo deve ser de, pelo menos, 1,5 para permitir a aquisição de imagens cintilográficas com melhor qualidade. Os resultados obtidos mostraram que a percentagem de atividade no abscesso em relação ao corpo total aumentou significativamente de $1,76 \pm 0,06$ em 30 minutos para $3,44 \pm 0,24$ em 18 horas ($p < 0,01$). Por outro lado, a atividade no tecido não infectado diminuiu com o tempo e, conseqüentemente, nas imagens tardias foi obtida uma maior relação abscesso/não-alvo ($1,58 \pm 0,08$ em 30 minutos e $2,6 \pm 0,20$ em 18 horas, $p < 0,01$). Os valores da relação alvo/não-alvo encontrados nesse estudo são semelhantes àqueles descritos por Erdogan et al. (2000) utilizando lipossomas não-pH-sensíveis para investigar

processo inflamatório em modelo experimental (relação igual a 1,67, 1,78, 2,27 e 2,23 para os tempos de 1, 2, 3 e 6 horas, respectivamente). Entretanto, os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que a relação alvo/não-alvo manteve-se alta ($2,6 \pm 0,20$) até 18 horas após administração dos ^{99m}Tc -LpHS, sugerindo sua retenção no foco infeccioso. Os dados obtidos indicam que os ^{99m}Tc -LpHS acumulam-se no abscesso além de apresentar rápida depuração do tecido não-alvo (músculo controle). Dessa maneira, pôde-se constatar que os ^{99m}Tc -LpHS possuem características adequadas que os tornam radiofármacos potenciais para identificar áreas infectadas.

Os resultados mostraram, também, uma elevada captação no baço e no fígado, a qual diminuiu com o decorrer do tempo. Estes resultados eram esperados uma vez que os órgãos do SFM constituem o caminho normal de depuração dos lipossomas, estando de acordo com os resultados observados por outros autores usando lipossomas não-pH-sensíveis (ANDREOPOULOS e KASI, 1997; ERDOGAN et al., 2000; GABIZON et al., 2003; LAVERMAN et al, 2001).

O maior nível de radioatividade observado nos rins nos tempos de 30 minutos e 4 horas pode ser o resultado da degradação do ^{99m}Tc -LpHS pelas células fagocíticas do fígado e baço, assim liberando o complexo ^{99m}Tc -HMPAO para subsequente excreção renal, como descrito por Laverman et al. (2000). Esta hipótese é confirmada nos estudos de imagem que mostram uma elevada atividade na bexiga. Além disso, nós observamos que ocorreu retenção urinária durante o período em que os animais permaneceram anestesiados, fato que levou ao tamanho extremamente grande da bexiga visualizada nas imagens.

5 CONCLUSÃO

Esse estudo mostrou que os ^{99m}Tc -LpHS apresentam-se com potencial uso como agentes de imagem para auxiliar no diagnóstico de sítios de infecção.

CONCLUSÕES INTEGRADAS E PERSPECTIVAS

1 CONCLUSÕES INTEGRADAS

O objetivo deste trabalho foi preparar e caracterizar, do ponto de vista físico-químico e biológico, lipossomas pH-sensíveis contendo um radiotraçador, ^{99m}Tc -HMPAO, para fins de auxiliar no diagnóstico de processos inflamatórios e/ou infecciosos.

O método de formação do filme lipídico seguido de extrusão em membranas de policarbonato mostrou-se adequado para obtenção de vesículas lipídicas com diâmetro apropriado (<130 nm) e boa homogeneidade (índice de polidispersão <0,25), sendo essas as características desejáveis para uso nos estudos de identificação de focos inflamatórios e infecciosos bem como para os estudos de interação do complemento.

Os lipossomas pH-sensíveis convencionais e de longa circulação contendo mPEG₂₀₀₀-DSPE apresentaram potencial zeta negativo, enquanto que as preparações contendo aPEG₂₀₀₀-DSPE mostraram potencial zeta positivo. Por meio da microscopia de força atômica verificou-se que os lipossomas pH-sensíveis convencionais apresentam maior variação de tamanho do que os lipossomas pH-sensíveis de longa circulação, independente do derivado PEG₂₀₀₀-DSPE (mPEG ou aPEG) usado, sugerindo que a inclusão do polímero contribui para a estabilidade das vesículas.

Os estudos de interação dos lipossomas pH-sensíveis convencionais e de longa circulação com o complemento indicaram que esses sistemas são fracos ativadores do sistema complemento.

Nos modelos de inflamação asséptica e séptica, os lipossomas pH-sensíveis de longa circulação (mPEG₂₀₀₀-DSPE/DOPE/CHEMS) marcados com ^{99m}Tc -HMPAO (^{99m}Tc -LpHS) mostraram uma captação significativamente maior nas lesões quando

comparada com os tecidos controles (não-alvo). As lesões foram identificadas por meio de imagens cintilográficas. As relações alvo/não-alvo nos modelos de inflamação e infecção foram superiores a 1,5, sugerindo que os ^{99m}Tc -LpHS apresentam características adequadas para identificação de focos inflamatórios/infecciosos.

Os órgãos do sistema fagocitário mononuclear (SFM), tais como fígado e baço, apresentaram os maiores níveis de radioatividade após administração intravenosa dos ^{99m}Tc -LpHS.

Os resultados obtidos com os lipossomas pH-sensíveis de longa circulação apontam para um produto que poderá ser útil como carreador de agentes de imagem para identificar focos inflamatórios e infecciosos.

2 PERSPECTIVAS

Diante das investigações realizadas nesse trabalho, pode-se propor como perspectivas o emprego de um quelante na bicamada lipídica visando à melhoria do rendimento marcação dos lipossomas com ^{99m}Tc e, assim, eliminar a etapa de purificação dos lipossomas radiomarcados em coluna de Sephadex.

No que se refere à caracterização biológica dos lipossomas pH-sensíveis de longa circulação, é de grande interesse a realização de estudos *in vivo* para avaliar a ocorrência das reações de hipersensibilidade induzida por estes sistemas.

Finalmente, faz-se também necessário o estudo de otimização do preparo de uma formulação liofilizada de lipossomas pH-sensíveis de longa circulação para posterior reconstituição e radiomarcação de forma a possibilitar sua dispensação sob forma de kit para uso na clínica de medicina nuclear.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER-MOORE, J. P.; PROFFITT, T. Development, characterization, efficacy and mode of action of Ambisome, a unilamellar liposomal formulation of amphotericin B. *J. Liposome Res.*, v. 3, p. 429-450, 1993.

AHKONG, Q. F.; TILCOCK, C. Attachment of ^{99m}Tc to lipid vesicles containing the lipophilic chelate dipalmitoylphosphatidylethanolamina-DTTA. *Nucl. Med. Biol.*, v. 19, p. 831-840, 1992.

ALBERTS, D. S.; GARCIA, D. J. Safety aspects of pegylated liposomal doxorubicin in patients with cancer. *Drugs*, v. 54, p. 30-35, 1997.

ALLEN, T. M.; CHONN, A. Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Lett.*, v. 223, p. 42-46, 1987.

ALLEN, T. M.; HANSEN, C. Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes effect of dose. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1068, p. 133-141, 1991.

ALVING, C. R. Immunologic aspects of liposomes: presentation and processing of liposomal protein and phospholipid antigens. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1143, p. 307-322, 1992.

ANDREOPOULOS, D.; KASI, L. P. ^{99m}Tc -labelled diphytanoylphosphatidylcholine liposomes: *in vitro* and *in vivo* studies. *J. Microencapsul.*, v. 14, p. 427-436, 1997.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. J. Sólidos perorais, cápsulas, comprimidos e sistemas de liberação controlada. In: OPPIDO, T.; OLIVEIRA, E. G. de; BENEDETTI, I.C. (Trad.). *Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. 6. ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000. cap. 5. p. 175-250.

ARAÚJO, J. G. V. C. *Estudos biológicos em hamsters infectados com Leishmania amazonensis empregando anticorpos (anti-mastigotas) marcados com ^{99m}Tc Tecnécio*. 1998. 79f. (Dissertação mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 1998.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 6023: informação e documentação – referências – elaboração*. Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 10520*: informação e documentação – citações em documentos – apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 14724*: informação e documentação – trabalhos acadêmicos – apresentação. Rio de Janeiro, 2005.

AWASTHI, V. D. et al. Imaging experimental osteomyelites using radiolabeled liposomes. *J. Nucl. Med.*, v. 39, p. 1089-1094, 1998.

AWASTHI, V. D. et al. Circulation and biodistribution profiles of long-circulating PEG-liposomes of various sizes in rabbits. *Int. J. Pharm.*, v. 253, p. 121-132, 2003.

BAKKER-WOUDENBERG, I. A. J. M. et al. Enhanced localization of liposomes with prolonged blood circulation infected lung tissue. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1138, p. 318-326, 1992.

BAKKER-WOUDENBERG, I. A. J. M. et al. Liposomes with prolonged blood circulation and selective localization in *Klebsiella Pneumoniae*-infected lung tissue. *J. Infect. Dis.*, v. 168, p. 164-171, 1993.

BALLINGER, J. R.; REID, R. H.; GULENCHYN, K. Y. Technetium-99m HM-PAO stereoisomers: differences in interaction with glutathione. *J. Nucl. Med.*, v. 29, p. 1998-2000, 1988.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.*, v. 13, p.238-252, 1965.

BARTHEL, H. et al. Improvement of brain SPECT by stabilization of Tc-99m-HMPAO with methylene blue or cobalt chloride. *Nuklearmedizin*, v. 38, p. 80-84, 1999.

BARTLETT, G.R. Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.*, p. 466-468, 1959.

BOERMAN, O.C. et al. Sterically stabilized liposomes labeled with ¹¹¹In to image focal infection in rats. *J. Nucl. Med.*, v. 36, p. 1639-1644, 1995.

BOERMAN, O. C. et al. Optimization of technetium-99m-labeled PEG liposomes to image focal infection: effects of particle size and circulation time. *J. Nucl. Med.*, v. 38, p. 489-493, 1997.

BOERMAN, O. C. et al. Radiolabeled liposomes for scintigraphic imaging. *Prog. Lipid Res.*, v. 39, p. 461-475, 2000.

BOERMAN, O. C. et al. Radiopharmaceuticals to image infection and inflammation. *Semin. Nucl. Med.*, v. 31, p. 286-295, 2001.

BRADLEY, A. J. et al. Inhibition of liposome-induced complement activation by incorporated poly(ethylene glycol)-lipid. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 357, p. 185-194, 1998.

BROUWERS, A. H. et al. Tc-99m-PEG-Liposomes for the evaluation of colitis in Crohn's disease. *J. Drug Target*, v. 8, p. 225-233, 2000.

CALICH, V. L. G.; VAZ, C. A. C. *Imunologia básica*. São Paulo: Artes Médicas, 1989, p. 161-163.

CARDOSO, V. N. et al. Assessment of inflammatory bowel disease by using two different ⁹⁹Tc leucocyte labeling methods. *Nucl. Med. Commun.*, v. 23, p. 715-720, 2002.

CHANAN-KHAN, A. et al. Complement activation following first exposure to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil): possible role in hypersensitivity reactions. *Ann. Oncol.*, v. 14, p. 1430-1437, 2003.

CHIANELLI, M. et al. Radiopharmaceuticals for the study of inflammatory processes: a review. *Nucl. Med. Commun.*, v. 18, p. 437-455, 1997.

CHONN, A.; CULLIS, P. R.; DEVINE, D. V. The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes. *J. Immunol.*, v. 146, p. 4234-4241, 1991.

CHONN, A.; CULLIS, P. R. Ganglioside G_{M1} and hydrophilic polymers increase liposome circulation times by inhibiting the association of blood proteins. *J. Liposome Res.*, v. 2, p. 397-410, 1992.

CIRINO, G. Multiple controls in inflammation. *Biochem. Pharmacol.*, v. 55, p. 105-111, 1998.

COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: Robbins pathologic basis of disease. COTRAN, R.; KUMAR, V.; COLLINS, T. 6. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999, cap. 3, p. 50-88.

CORSTENS, F. H. M.; VAN DER MEER, J. W. M. Nuclear Medicine's role in infection and inflammation. *Lancet*, v. 354, p 765-770, 1999.

COSTA, K. A. *Alodínia mecânica e edema de pata induzidos por um ativador da proteína quinase C, PPD: caracterização e comparação com as respostas induzidas pela carragenina*. 2004. 108f. (Dissertação mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2004.

CROMMELIN, D. J. A. et al. Liposomes in autoimmune diseases: selected applications in immunotherapy and inflammation detection. *J. Control. Release*, v. 62, p. 245-251, 1999.

DAMS, E. T. et al. Scintigraphic evaluation of experimental chronic osteomyelitis. *J. Nucl. Med.*, v. 41, p. 896-902, 2000_a.

DAMS, E. T. et al. ^{99m}Tc-PEG liposomes for the scintigraphic detection of infection and inflammation: clinical evaluation. *J. Nucl. Med.*, v. 41, p. 622-630, 2000_b.

DE MARIE, S. Liposomal and lipid-based formulations of amphotericin B. *Leukemia*, v. 10, p. S93-S96, 1996.

DEUTSCH, E. Technetium chemistry and technetium radiopharmaceutical. In: LIPPAR, S.J. (Ed.). *Progress in inorganic chemistry*. New York: J Wiley & Sons Inc., 1983. v. 30, p. 75-139.

DEVINE, D. V. et al. Liposome-complement interactions in rat serum: implications for liposome survival studies. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1191, p. 43-51, 1994.

DEVINE, D. V.; BRADLEY, A.J. The complement system in liposome clearance: can complement deposition be inhibited? *Adv. Drug Delivery Rev.*, v. 32, p.19-29, 1998.

DING, W. et al. Cholesteryl hemisuccinate as a membrane stabilizer in dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes containing saikosaponin-d. *Int. J Pharm.*, v. 300, p. 38-47, 2005.

DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 24, p. 89-102, 1972.

DRUMOND, D. C.; ZIGNANI, M.; LEROUX, J. C. Current status of pH-sensitive liposomes en drug delivery. *Prog. Lip. Res.*, v. 39, p. 409-460, 2000.

DUMAREY, N. et al. Imaging infection with ^{18}F -FDG-labeled leukocyte PET/CT: initial experience in 21 patients. *J. Nucl. Med.*, v. 47, p. 625-632, 2006.

ERDOGAN, S. et al. Scintigraphic imaging of infections with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labelled glutathione liposomes. *J. Microencapsul.*, v. 17, p. 459-465, 2000.

FATTAL, E. et al. Colloidal drug carriers of antibiotics as na alternative approach for the treatment of intracellular infections. *In: RAOULT, D. (Ed). Antimicrobial agents and intracellular pathogens.* Boca Raton, Florida, CRC press, p. 63-72, 1993.

FATTAL, E.; COUVREUR, P.; DUBERNET C. "Smart" delivery of antisense oligonucleotides by anionic pH-sensitive liposomes. *Adv. Drug Delivery Rev.*, v. 56, p. 931-946, 2004.

GABIZON, A.; MARTIN, F. Polyethylene glycol-coated (pegylated) liposomal doxorubicin. Rationale for use in solids tumor. *Drugs*, v. 54, p. 15-21, 1997.

GABIZON, A.; SHMEEDA, H.; BARENHOLZ, Y. Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin: review of animal and human studies. *Clin. Pharmacokinetics*, v. 42, p. 419-436, 2003.

GARG, A.; KOKKOLI, E. Characteriring particulate drug-delivery carriers with atomic force microscopy. *IEEE Engineering Med. Biol. Magazine*, p. 87-95, 2005.

GBADAMOSI, J. K.; HUNTER, A. C.; MOGHIMI, S. M. PEGylation of microspheres generates a heterogeneous population of particles with differential surface characteristics and biological performance. *FEBS Lett.*, v. 532, p. 338-344, 2002.

GOINS, B. et al. Biodistribution and imaging studies of technetium- $^{99\text{m}}$ -labeled liposomes in rats with focal infection. *J. Nucl. Med.*, v. 34, p. 2160-2168, 1993.

GREGORIADIS, G.; LEATHWOOD, P. D.; RYMAN, B. E. Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Lett.*, v. 14, p. 95-99, 1971.

HARASHIMA, H. et al. Enhanced uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes. *Pharm. Res.*, v. 11, p. 402-406, 1994.

HWANG, K. J. et al. Encapsulation, with high efficiency, of radioactive metal ions in liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 716, p. 101-109, 1982.

ISHIDA, T. et al. Enhancing effect of cholesterol on the elimination of liposomes from circulation is mediated by complement activation. *Int. J. Pharm.*, v. 156, p. 27-37, 1997.

ISHIDA, T. et al. Size-dependent extravasation and interstitial localization of polyethyleneglycol liposomes in solid tumor-bearing mice. *Int. J. Pharm.*, v. 190, p. 49-56, 1999.

ISHIDA, T. et al. Biodistribution of liposomes and C3 fragments associated with liposomes: evaluation of their relationship. *Int. J. Pharm.*, v. 205, p. 183-193, 2000.

ISHIDA, T. et al. Effect of cholesterol content in activation of the classical versus alternative pathway of rat complement system induced by hydrogenated egg phosphatidylcholine-based liposomes. *Int. J. Pharm.*, v. 224, p. 69-79, 2001.

ISHIDA, T. et al. Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes. *J. Control. Release*, v. 112, p. 15-25, 2006

JONES, A. G. Technetium in nuclear medicine. *Radiochim. Acta*, v. 70/71, p. 289-297, 1995.

JÚNIOR, A. D. C. et al. Tissue distribution evaluation of stealth pH-sensitive liposomal cisplatin versus free cisplatin in Ehrlich tumor-bearing mice. *Life Sci.*, v. 80, p. 659-664, 2007.

KIRSCHFINK, M.; MOLLNES, T. E. Modern complement analysis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v. 10, p. 982-989, 2003.

KLIBANOV, A. L. et al. Amphipatic polyetyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett.*, v. 268, p. 235-237, 1990.

LASIC, D. D.; PAPAHAJOUPOLOS, D. Liposomes revisited. *Science*, v. 267, p. 1275-1276, 1995.

LAVERMAN, P. et al. A novel method to label liposomes with ^{99m}Tc by the hydrazino nicotinyl derivative. *J. Nucl. Med.*, v. 40, p. 192-197, 1999.

LAVERMAN, P. et al. Preclinical and clinical evidence for disappearance of long-circulating characteristics of polyethylene glycol liposomes at low lipid dose. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 293, p. 996-1001, 2000.

LAVERMAN, P. et al. Microscopic localization of PEG-liposomes in a rat model of focal infection. *J. Control. Release*, v. 35, n. 3, p. 347-355, 2001.

LEVINE, S. J. et al. Cardiopulmonary toxicity after liposomal amphotericin B infusion. *Ann. Int. Med.*, v. 114, p.664-666, 1991.

LIMA, A. O. et al. Diagnóstico da doença de chagas. In:_____. *Métodos de Laboratório aplicados à clínica: técnica de interpretação*. 7. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1992. Cap. 16, p. 16.8-16.13.

LITZINGER, D. C. et al. Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly(ethylene glycol)-containing liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1190, p. 99-107, 1994.

LOVE, C.; PALESTRO, C.J. Radionuclide imaging of infection. *J. Nucl. Med. Technol.*, v. 32, p. 47-57, 2004.

LOVE, W.G. et al. Effect of liposome surface charge on the stability of technetium (^{99m}Tc) radiolabeled liposomes. *J. Microencapsul.*, v. 6, p. 105-113, 1989.

MARJAN, J.; XIE, Z.; DEVINE, D. V. Liposome-induced activation of the classical complement pathway does not require immunoglobulin. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1192, p. 35-44, 1994.

MARTIN-COMIN, J.; PRATS, E. Clinical applications of radiolabeled blood elements in inflammatory bowel disease. *Q. J. Nucl. Med.*, v. 43, n.1, p. 74-82, 1999.

MARUYAMA et al. Prolonged circulation time in vivo of large unilamellar liposomes composed of distearoylcholine phosphatidylcholine and cholesterol containing amphipathic poly(ethylene glycol). *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1128, p. 44-49, 1992.

MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Clearance de imunocomplexos: papel do complemento e dos polimorfonucleares neutrófilos. *Med. Ribeirão Preto*, v. 30, p. 234-242, 1997.

McAFEE, J. G.; THAKUR, M.L. Survey of radioactive agents for the in vitro labeling of phagocytic leucocytes. *J. Nucl. Med.*, v. 17, p. 480-492, 1976.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory and practice. *Pharmacol. Rev.*, v. 53, p. 283-318, 2001.

MOGHIMI, S. M.; SZEBENI, J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog. Lipid. Res.*, v. 42, p. 463-478, 2003.

MORGAN, J. R. et al. Localisation of experimental staphylococcal abscesses by ^{99m}Tc-labelled liposomes. *J. Med. Microbiol.*, v. 14, p. 213-217, 1981.

MORI, A. et al. Influence of the steric barrier of amphipathic poly(ethylene glycol) and ganglioside G_{M1} on the circulation time of liposomes and on the target binding of immunoliposomes in vivo. *FESB Lett.*, v. 284, p. 263-266, 1991.

MOZAFARI, M. R. A review of scanning probe microscopy investigations of liposome-DNA complexes. *J. Liposome Res.*, v. 15, p. 93-107, 2005.

NAGAYASU, A.; UCHIYAMA, K.; KIWADA, H. The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. *Adv. Drug Delivery Rev.*, v. 40, p. 75-87, 1999.

NEEDHAM, D.; KIM, D. PEG-covered lipid surfaces: bilayers and monolayers. *Colloids Surf. B*, v. 18, p. 183-195, 2000.

NEVES, B. R. A.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M.S. Microscopia de varredura por sonda mecânica: uma introdução. *Cerâmica 44*, v. 290, p. 212-219, 1998.

NEW, R. R. C. (Ed.). *Liposomes: a practical approach*. New York: IRL Press, 1990. 301 p.

OLIVEIRA, A. C. P. de. *Formulação e caracterização físico-química de carreadores coloidais de penicilina G benzatina e estudo comparativo da cinética de liberação in vitro*. 1998. 75f. (Dissertação mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 1998.

OUSSOREN, C. et al. Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection II: influence of liposomal size, lipid composition and lipid dose. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1328, p.261-272, 1997.

OYEN, W. J. G. et al. Detecting infection and inflammation with technetium-99m-labeled stealth liposomes. *J. Nucl. Med.*, v. 37, n.8, p. 1392-1397, 1996_a.

OYEN, W. J. G. et al. Labeled stealth liposomes in experimental infection: an alternative for leukocyte scintigraphy? *Nucl. Med. Comm.*, v. 17, p. 742-748, 1996_b.

OYEN, W. J. G.; BOERMAN, O. C.; CORSTENS, F. H. M. Animal models of infection and inflammation and their role in experimental nuclear medicine. *J. Microbiol. Meth.*, v. 47, n.2, p. 151-157, 2001.

PAPAHADJOPOULOS, D. A new perspective on liposomes. *J. Liposome. Res.*, v. 2, p. lii-xviii, 1992.

PATEL, H.M. Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, v. 9, p. 39-90, 1992.

PEREIRA, F. E. L.; BOGLIOLO, L. Inflamações. In: BOGLIOLO, L.; BRASILEIRO FILHO, G. (Org.). *Bogliolo patologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 7, p. 112-148.

PETERS, A. M. et al. Clinical experience with ^{99m}Tc-hexamethylpropyleneamineoxime for labelling leucocytes and imaging infection. *Lancet*, v. II, p. 946-949, 1986.

PHILLIPS, W. T. et al. A simple method for producing a technetium-99m-labeled liposome which is stable in vivo. *Nucl. Med. Biol.*, v. 19, p. 539-547, 1992.

PHILLIPS, W. T. Use of radiolabeled liposomes for PEG-liposome-based drug targeting and diagnostic imaging applications. In: GREGORIADIS, G.; McCORMACK, B. (Ed). *Targeting of drugs 6: strategies for stealth therapeutic systems*. New York: Plenum Press, 1998. p. 109-120.

PHILLIPS, W. T. Delivery of gamma-imaging agents by liposomes. *Adv. Drug Delivery Rev.*, v. 37, p. 13-32, 1999.

PLATTS-MILLS, T. A.E.; ISHIZAKA, K. Activation of the alternative pathway of human complement by rabbit cells. *J. Immunol.*, v. 113, p. 348-358, 1974.

RAHMAN, Y. E., WRIGHT, B. J. Liposomes containing chelating agents. Cellular penetration and a possible mechanism of metal removal. *J. Cell. Biol.*, v. 65, p.112-117, 1975.

RENNEN, H. J. J. M. et al. Imaging infection/inflammation in the new millennium. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 28, n. 2, p. 241-252, 2001.

RENNEN, H. J. J. M.; BOERMAN, O. C.; OYEN, W. J. G. Radiomarcadores para el diagnóstico de infecciones e inflamaciones. In: MARTIN-COMIN, J. (Ed.). *Diagnóstico de la inflamación y de la infección en medicina nuclear*. [s.l.: s.n.], 2005. p. 53-75.

RENT, R. et al. C activation by interaction of polyanions and polycations. I. heparin-protamine induced consumption of complement. *J. Immunol.*, v. 114, p. 120-124, 1975.

RICHARDSON, D. S. et al. Early evaluation of liposomal daunorubicin (DaunoXome, Nexstar) in the treatment of relapsed and refractory lymphoma. *Invest. New Drugs*, v. 15, p. 247-253, 1997.

RODEN, M. M. et al. Triad of acute infusion-related reactions associated with liposomal amphotericin B: analysis of clinical and epidemiological characteristics. *Clin. Infect. Dis.*, v. 36, p.1213-1220, 2003.

ROTE, N. Inflammation. In: McCANCE, K. L.; HUETHER, S. E. (Ed.). *Pathophysiology: the biologic basis for disease in adults and children*. 3. ed. St Louis: Mosby, 1998. Cap. 7, p. 205-236.

ROUX, E. et al. Serum-stable and long-circulating, PEGylated, pH-sensitive liposomes. *J. Control. Release*, v. 94, p. 447-451, 2004.

RUOZI, B. et al. Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: two techniques for rapid characterization of liposomes. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 25, p. 81-89, 2005.

SANTAELLA, C. et al. Extended in vivo blood circulation time of fluorinated liposomes. *FEBS Lett.*, v. 336, p. 481-484, 1993.

SCHNEIDER, P. et al. Anaphylactic reaction to liposomal amphotericin (AmBisome). *Br. J. Haematol.*, v. 102, p. 1108, 1998.

SEELLEN, M. A. et al. Functional analysis of the classical, alternative, and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. *J. Immunol. Meth.*, v. 296, p. 187-198, 2005.

SEMPLE, S. C.; CHONNN, A.; CULLIS, P. R. Interactions of liposomes and lipid-based carrier systems with blood proteins: relation to clearance behaviour in vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 32, p. 13-17, 1998.

SENIOR, J.; ALVING, C. R. Fate and behaviour of liposomes *in vivo*. *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Syst.*, v. 3, p. 123-193, 1987.

SHUKLA, S.K.; MANNI, G.B.; CIPRIANI, C. Technetium in biology and medicine. *Inorg. Chim. Acta*, v. 79, p. 286, 1983.

SIGNORE, A. et al. Biological imaging for the diagnosis of inflammatory conditions. *Biodrugs*, v. 16, p. 241-259, 2002.

SIMÕES, S. et al. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 56, p. 947-965, 2004.

SLEPUSHKIN, V. A. et al. Sterically stabilized pH-sensitive liposomes: intracellular delivery of aqueous contents and prolonged circulation in vivo. *J. Biol. Chem.*, v. 272, p. 2382-2388, 1997.

STANFORD DOSIMETRY, LCC. Radar Medical Procedure Radiation Dose Calculator and Consent Language Generator. Disponível em:

<http://www.doseinforadar.com/RADARDoseRiskCalc.html>>. Acesso em: 25 set. 2007.

STORM, G. et al. Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, v. 17, p. 31-48, 1995.

STORM, G. et al. Diagnostic and therapeutic targeting of infectious and inflammatory diseases using sterically stabilized liposomes. In: GREGORIADIS, G.; McCORMACK, B (Ed). *Targeting of Drugs 6: strategies for stealth therapeutic systems*. New York: Plenum Press, 1998. p. 121-130.

SZEBENI, J. et al. Complement activation in rats by liposomes and liposome-encapsulated hemoglobin: evidence for anti-lipid antibodies and alternative pathway activation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v. 205, n. 1, p. 255-263, 1994.

SZEBENI, J. et al. Complement activation in human serum by liposome-encapsulated hemoglobin: the role of natural anti-phospholipid antibodies. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1285, p. 127130, 1996

SZEBENI, J. The interaction of liposomes with the complement system. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, v. 15, p.57-88, 1998.

SZEBENI, J. et al. Hemodynamic changes induced by liposomes and liposome-encapsulated hemoglobin in pigs: a model for pseudoallergic cardiopulmonary reactions to liposomes: role of complement and inhibition by soluble CR1 and anti-C5a antibody. *Am. Heart Assoc.*, v. 99, n. 17, p. 2302- 2309, 1999.

SZEBENI, J. et al. Liposome-induced pulmonary hypertension: properties and mechanism of a complement-mediated pseudoallergic reaction. *Am. J. Heart Circ. Physiol.*, v. 279, p. H1319-H1328, 2000.

SZEBENI, J. Complement activation-related pseudoallergy caused by liposomes, micellar carriers of intravenous drugs and radiocontrast agents. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, v. 18, p. 567-606, 2001.

SZEBENI, J. et al. Role of complement activation in hypersensitivity reactions to doxil and hynic peg liposomes: experimental and clinical studies. *J. Liposome Res.*, v. 12, p. 165-172, 2002.

SZEBENI, J. Complement activation-related pseudoallergy: a new class of drug-induced acute immune toxicity. *Toxicology*, v. 216, p. 106-121, 2005.

TAVARES, G. D. et al. Development and physico-chemical characterization of cyclodextrin-DNA complexes loaded liposomes. *Chem. Phys. Lett.*, v. 439, p. 507-512, 2006.

TORCHILIN, V. P.; TRUBETSKOY, V. S. In vivo visualizing of organs and tissues with liposomes. *J. Liposome Res.*, v. 5, p. 795-812, 1995.

VAN DER LAKEN, C. J. et al. Scintigraphic detection of infection and inflammation: new developments with special emphasis on receptor interaction. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 25, p. 535-546, 1998.

VAN EERD, J. E. M. et al. Imaging of infection and inflammation with an improved 99mTc-labeled LTB4 antagonist. *J. Nucl. Med.*, v. 46, p. 1546-1551, 2005.

VINEGAR, R. et al. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. *Fed. Proc.*, Washington, v. 46, n. 1, p. 118-126, 1987.

VOLANAKIS, J. E.; NARKATES, A. J. Interaction of C-reactive protein with artificial phosphatidylcholine bilayers and complement. *J. Immunol.*, v. 126, p. 1820-1827, 1981.

ZALIPSKY, S. et al. Long circulating, cationic liposomes containing amino-PEG-phosphatidylethanolamine. *FEBS Lett.*, v. 353, p. 71-74, 1994.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenan induced oedema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.111, p. 544-547, 1962.

WOODLE, M. C. et al. Sterically stabilized liposomes: reduction in electrophoretic mobility but not electrostatic surface potential. *Biophys J.*, v. 61, p. 902-910, 1992.

WOODLE, M. C.; LASIC, D. D. Sterically stabilized liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 113, p. 171-199, 1992.

APÊNDICE A – Método espectrofotométrico para dosagem de fosfolípidos

1 INTRODUÇÃO

A concentração de fosfolípidos nas diferentes preparações de lipossomas foi realizada de acordo com o método de Bartlett (1959), que consiste em um doseamento colorimétrico baseado na formação de um complexo entre íons fosfato e molibdato, apresentando coloração azulada em meio ácido. A intensidade da coloração obtida é proporcional à concentração de fosfato presente na amostra. A sensibilidade do método está compreendida entre 0,5 a 5 µg de fósforo.

2 PROTOCOLO

Em tubos de borosilicato de 13x100 mm, adicionar 250 µL da solução padrão de fósforo ou da amostra a dosar. Adicionar 400 µL de uma solução de ácido sulfúrico 10 N em todos os tubos para promover a mineralização do fósforo orgânico. Transferir os tubos para o dry-block (MA 4004, Marconi, Brasil) à temperatura de 180-195 °C e aquecer durante 30 minutos. Após resfriamento dos tubos, adicionar 100 µL de uma solução de água oxigenada 10% (v/v) recentemente preparada à partir de uma solução de água oxigenada a 30 volumes (Sigma, H1009). Transferir novamente os tubos para o dry-block à temperatura de 180-195 °C e aquecer durante 30 minutos. A solução deve permanecer transparente, caso contrário repetir o procedimento anterior. Após resfriamento, adicionar 4,6 mL de solução de molibdato de amônio (22,2g de molibdato de amônio, 7 mL de H₂SO₄ 36N e água destilada qsp 1 litro) e 0,5 mL de solução de ácido ascórbico a 10% (p/v), recentemente preparada. Agitar vigorosamente com auxílio de vórtex e aquecer à temperatura de 90 °C, durante 20 minutos. Uma cor azulada aparecerá devido a formação de um complexo de composição incerta. A densidade ótica da solução foi medida em espectrofotômetro (Schimadzu, UV 1240, Japão) usando $\lambda = 800\text{nm}$.

A curva de calibração de fósforo foi obtida utilizando cinco diferentes concentrações (1, 2, 3, 4 e 5 µg) desse elemento (solução padrão de fósforo 0,65 mM – P3869, SIGMA) tendo sido realizados três testes, em triplicatas. A linearidade da equação foi determinada por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados apresentando o coeficiente de correlação linear, o coeficiente angular e o intercepto da reta.

Para dosagem da concentração de fósforo presente nas preparações de lipossomas, as amostras foram preparadas de acordo com a concentração teórica de fosfolípidos de modo a se obter uma concentração de 3 µg de fósforo.

3 RESULTADOS

A curva de calibração obtida é mostrada na Figura 1. Os dados se mostraram adequados com coeficiente de correlação (r^2) de 0,9959, não havendo desvio de linearidade estatisticamente significativo e mostrando uma reta de regressão significativa para $p \leq 0,05$.

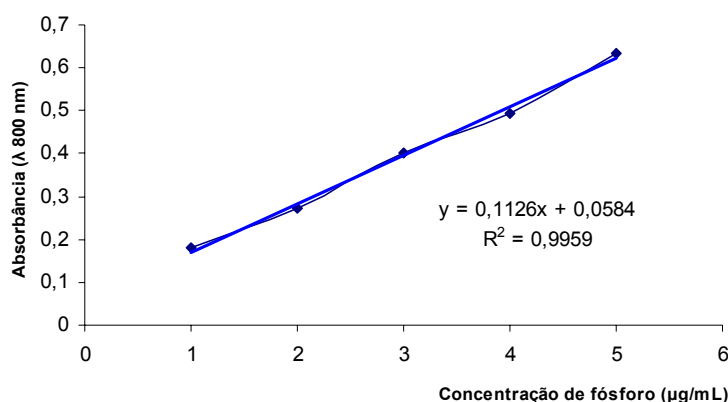


Figura 1. Curva de calibração do doseamento de fósforo pelo método de Bartlett (1959)

Os valores da concentração dos fosfolípidos, em mM, foram calculadas a partir da curva de calibração. Na tabela 1 encontram-se as concentrações fosfolipídicas

determinadas para cada formulação analisada. Todas as formulações de lipossomas foram preparadas com tampão Hepes (10 mM Hepes, 135 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7,4), para uma concentração lipídica total de 20 mM.

TABELA 1. Composição, razão molar e resultado da concentração de fosfolípidos das preparações de lipossomas analisadas.

Composição	Razão molar	Concentração de fosfolípidos (mM)
DOPE/CHEMS	7/3	7,1
mPEG ₂₀₀₀ -DSPE/ DOPE/CHEMS	0,5/6,5/3	11,1
aPEG ₂₀₀₀ -DSPE/ DOPE/CHEMS	0,5/6,5/3	12,4
DOPC/COL	7/3	11,8
mPEG ₂₀₀₀ -DSPE/ DOPC/COL	0,5/6,5/3	13,8
aPEG ₂₀₀₀ -DSPE/ DOPC/COL	0,5/6,5/3	13,0
mPEG ₂₀₀₀ -DSPE/ HSPC/COL	0,5/5,5/4	7,8

APÊNDICE B – Produção bibliográfica e técnica

1 PUBLICAÇÕES

CARMO, V. A. S.; FERRARI, C. S.; REIS, E. C. O.; RAMALDES, G. A.; PEREIRA, M. A.; De OLIVEIRA, M. C.; CARDOSO, N. C. Biodistribution study and identification of inflammation sites using technetium-99m-labeled stealth pH-sensitive liposomes. Aceito em 03 de setembro de 2007 dentro da Nuclear Medicine Communications.

CARMO, V. A. S.; De OLIVEIRA, M. C.; MOTA, L. G.; FREIRE, L. P.; FERREIRA, R. L. B.; CARDOSO, N. C. Technetium-99m-labeled stealth pH-sensitive liposomes: a new strategy to identify infection in experimental model. Aceito em 11 de setembro de 2007 dentro da Brazilian Archives of Biology and Technology.

CARMO, V. A. S.; De OLIVEIRA, M. C.; REIS, E. C. O.; GUIMARÃES, T. M. D.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; MICHALICK, M. S. M.; CARDOSO, N. C. Physicochemical characterization and study of *in vitro* interactions of pH-sensitive liposomes with the complement system. Aceito em 01 de novembro de 2007 dentro da Journal of Liposome Research.

3 PATENTE

CARMO, V. A. S.; RAMALDES, G. A.; De OLIVEIRA, M. C.; CARDOSO, V. N. Processo de preparação de formulações de lipossomas pH-sensíveis radiomarcados com 99mTecnécio, produto e usos. Depósito em 02 de março de 2007, PI 0700940-2.