

# Lipossomas de longa circulação: estrutura e aplicações.

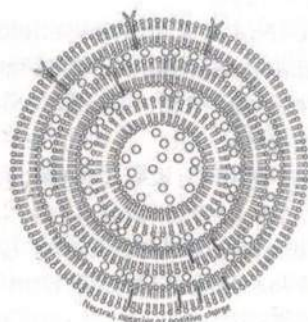
LUCIANA BIAGINI LOPES  
ANSELMO GOMES DE OLIVEIRA

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Fármacos e Medicamentos, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - Unesp - Rodovia Araraquara-Jau km 01 - 14801-902 Araraquara - São Paulo.  
e-mail: [oliveiag@fcfar.unesp.br](mailto:oliveiag@fcfar.unesp.br)

## Introdução

Desde que os lipossomas foram descritos por Bangham, na década de 60, eles têm sido extensivamente estudados como modelo de membrana e como transportadores de fármacos. Podem ser definidos como vesículas formadas por bicamada lipídica, alternadas por compartimentos aquosos. Devido à sua versatilidade estrutural, independentemente da sua solubilidade, podem encapsular compostos polares e apolares. Substâncias hidrofílicas podem ser encapsuladas no compartimento aquoso, enquanto que as lipofílicas podem ser incorporadas na bicamada lipídica.

**Figura 1. Representação esquemática de lipossoma convencional multilamelar**



Vários mecanismos de interação entre lipossomas e células no meio biológico foram descritos, sendo que alguns relacionam-se com a desestabilização da estrutura dos lipossomas, enquanto que outros, com a liberação do conteúdo encapsulado. Entre eles podemos citar:

- Troca de materiais, principalmente de lipídios e proteínas, entre os lipossomas e células. Esse processo pode ser mediado por proteínas de transferência da membrana celular.
- Fusão do lipossomas com células. Esse foi o modelo idealizado para liberação do conteúdo dos lipossomas diretamente no citoplasma celular. Esse processo envolve troca de lipídios do organismo com os lipossomas, sendo rara sua ocorrência *in vivo*.
- Adsorção ou ligação de lipossomas à proteínas da superfície celular. Os lipossomas podem ficar ligados ou adsorvidos, até que sejam removidos, internalizados ou degradados, por mecanismos diversos, como pela eliminação de compostos tóxicos por macrófagos.
- Fagocitose por células do Sistema Retículo Endotelial. Este é o principal mecanismo de retirada dos lipossomas e de outros sistemas coloidais da corrente circulatória. Dependendo da via de administração e biodistribuição, os lipossomas podem ser removidos por monócitos circulantes ou macrófagos dos diversos tecidos.

dos, principalmente do fígado (células de Kupfer) e do baço. A fagocitose envolve duas etapas:

1. opsonização: consiste na ligação de fatores séricos, chamados opsoninas, à superfície celular. Embora cada opsonina confira um determinado destino no organismo, geralmente a opsonização por proteínas do complemento resulta na captação pelo fígado, enquanto que a opsonização por anticorpos, na captação pelo baço.

2. internalização: depois de opsonizados, os lipossomas são reconhecidos pelas células do Sistema Retículo Endotelial como não próprios do organismo, e são, então, internalizados por elas.

- Troca ou perda de lipídios com HDL (Lipoproteínas de alta densidade). Este é outro importante processo que contribui largamente para a redução da estabilidade dos lipossomas no plasma. Após incubação com o HDL, os fosfolipídios estruturais dos lipossomas foram encontrados associados ao HDL, o que resulta na formação em falhas na bicamada dos lipossomas, provocando extravasamento do conteúdo encapsulado, com conseqüente desestabilização das vesículas.

## Lipossomas convencionais

Os chamados lipossomas convencionais são aqueles formados, geralmente, por fosfatidilcolina e colesterol ou outro anfifílico estrutural simples, contendo uma cabeça polar e duas cadeias carbônicas. Esses sistemas apresentam elevada captação pelo Sistema Retículo Endotelial, com conseqüente remoção rápida da circulação sanguínea e degradação nos lipossomas das células fagocitárias. Esse aspecto pode constituir desvantagem na utilização dos lipossomas na terapêutica, quando deseja-se direcioná-los, fazendo com que seu uso seja restrito a aplicações não limitadas pelo Sistema Retículo Endotelial e criando a necessidade de utilização de alternativas para aumentar o tempo de circulação das vesículas, tais com a saturação do Sistema Retículo Endotelial e alterações na composição de lipossomas.

### Pré-saturação do Sistema Retículo Endotelial

Sabe-se que quanto maior a dose de lipídio administrada, maior é o tempo de circulação dos lipossomas, devido à saturação do Sistema Retículo Endotelial. Assim, seria conveniente a administração de uma dose prévia da lipossomas vazios para saturação do sistema fagocitário de modo que a preparação de lipossomas contendo fármaco administrada subsequentemente tenha um maior tempo de circulação.

### Aumento da estabilidade de lipossomas no plasma

Sabe-se que a remoção dos lipossomas da circulação e a perda de seus componentes estruturais é decorrente de colisões entre estes e as substâncias séricas, o que resulta na perda dos lipídios estruturais dos

lipossomas para o HDL e/ou opsonização. Assim, o aumento a estabilidade dos lipossomas no plasma frente a essas interações resultaria em aumento do tempo de circulação desses sistemas. Para tal, é necessária a alteração de fatores, como a composição, tamanho e carga de lipossomas.

Sabe-se que vesículas compostas por fosfolipídios saturados e colesterol apresentam maior empacotamento da bicamada. Estes fosfolipídios apresentam elevada temperatura de transição de fase, a qual é ainda aumentada pela incorporação de colesterol na bicamada dos lipossomas, de modo que, à temperatura ambiente, a bicamada apresenta-se em estado ordenado de gel e mais rígida, o que dificulta a penetração de opsoninas e a perda dos seus constituintes.

O tamanho dos lipossomas também influencia sua estabilidade no plasma. Vesículas de diâmetro pequeno geralmente apresentam maior tempo de circulação. Por outro lado, essas vesículas podem ter seu tempo de circulação reduzido em decorrência da sua penetração por poros de vasos sanguíneos com conseqüente acúmulo no fígado, tecidos de inflamação, infecção e tumores.

A carga superficial dos lipossomas é outro parâmetro que influencia seu tempo de circulação. Vesículas compostas por fosfolipídios de carga negativa, como a fosfatidilserina, apresentam elevada captação pelo Sistema Retículo Endotelial. A carga positiva em lipossomas, além de conferir toxicidade à formulação, também promove maior captação pelo Sistema Retículo Endotelial. São os lipossomas neutros que apresentam maior estabilidade no plasma, uma vez que reações entre opsoninas e lipossomas envolve interações eletrostáticas, de modo que superfícies neutras reduzem esse tipo de interação.

Os melhores resultados em termos de estabilidade no plasma foram obtidos com vesículas compostas por diestearoilfosfatidilcolina e colesterol numa proporção molar de 2:1 ou 1:1.

Com isso, percebeu-se que, reduzindo-se o reconhecimento pelo Sistema Retículo Endotelial, os lipossomas apresentariam um maior tempo de circulação, o que permitiria sua interação com os sítios alvo e a expansão da sua utilização na terapêutica. Foi no final da década de 80, que se percebeu que a inclusão de determinados lipídios na bicamada de lipossomas levava a um maior tempo de circulação desses sistemas.

Posteriormente, percebeu-se que a presença de determinados polímeros na superfície dos lipossomas também apresentava o mesmo efeito. Dessa forma, foram iniciados estudos, a fim de obter sistemas que fossem imperceptíveis pelo Sistema Retículo Endotelial e, por isso, permanecessem mais tempo na circulação. Esses sistemas foram posteriormente conhecidos como lipossomas Stealth ou lipossomas de longa circulação.

## Tipos de lipossomas de longa circulação

### Primeira geração

A primeira geração de lipossomas de longa cir-

culação foi caracterizada pela tentativa de mimetizar a superfície externa das hemáceas, dada a sua habilidade de permanecer na circulação por longos períodos, sendo para isso, utilizados componentes naturais dessas células, como glicolipídios e glicoproteínas.

Foram feitas modificações na composição de lipossomas, utilizando-se gangliosídeos, que foram incorporados na bicamada. No entanto, apenas o gangliosídeo GM1 promoveu maior tempo de circulação aos lipossomas, sendo necessária uma concentração mínima de 7 mol%.

O gangliosídeo GM1 pode ser obtido, a partir de fontes naturais, através de sua extração do cérebro de boi, ou sinteticamente, mas sua utilização é limitada pelo seu elevado custo e contaminação decorrente da sua extração da fonte natural.

O tempo de circulação dos lipossomas contendo GM1 mostrou-se dependente da sua composição e tamanho, sendo que os lipossomas compostos por bicamadas rígidas e tamanho entre 90-200nm apresentavam maior tempo de circulação.

Foi demonstrada a importância da porção do ácido siálico, um açúcar n-acetilado contendo um grupo carboxílico, no gangliosídeo GM1 para conferir longo tempo de circulação aos lipossomas, sendo que a incorporação do ácido siálico na bicamada das vesículas promoveu aumento no seu tempo de circulação. No entanto, seu elevado custo criou a necessidade de pesquisar outros compostos de estrutura semelhante que também apresentassem habilidade de conferir longos períodos de circulação à sistemas, mas cujo custo não fosse um fator limitante à sua utilização.

Chegou-se ao ácido glucurônico que, mediante obtenção de um derivado de cadeia hidrocarbonada, foi incorporado à bicamada dos lipossomas. O sistema resultante apresentou elevado tempo de circulação, baixa captação pelo fígado, mas não pelo baço, fato esse que não apresenta uma explicação clara.

### Segunda geração

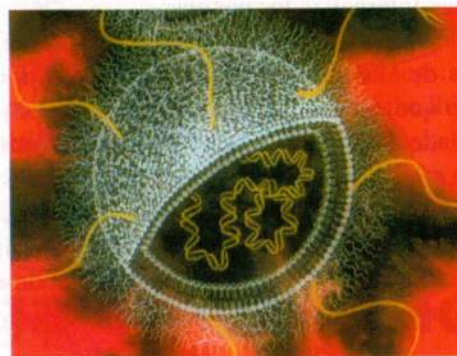
A segunda geração dos lipossomas de longa circulação foi caracterizada pela incorporação de derivados lipídicos contendo a cabeça polar polimerizada na bicamada dos lipossomas. Utilizou-se para a preparação de tais derivados o polietilenoglicol (PEG), obtendo-se os chamados lipossomas estericamente estabilizados. Esses lipossomas apresentam captação pelo Sistema Retículo Endotelial reduzida quando comparada aos contendo GM1, com as vantagens do baixo custo e do seu tempo de circulação não ser dependente da composição da vesícula, apenas do peso molecular do PEG utilizado.

A fosfatidiletanolamina é o fosfolípido mais utilizado para obtenção do derivado polimérico, sendo que o derivado carbamato é o mais utilizado devido à facilidade de obtenção e maior rendimento da síntese. O colesterol e o fosfatidilglicerol também podem ser utilizados para obtenção de derivado contendo PEG, havendo necessidade da formação prévia de um epóxido.

Os lipossomas estericamente estabilizados podem ser obtidos, mediante adição do derivado fosfolípido

aos demais fosfolípídios e constituintes das vesículas, que mediante métodos específicos, resultam nos lipossomas. Os derivados fosfolipídicos contendo PEG não incorporados aos lipossomas podem ser separados por cromatografia de exclusão. Ainda, lipossomas pré-formados que conttenham a fosfatidiletanolamina na sua composição também podem ser utilizados, sendo que, nesse caso, as cadeias de PEG vão encontrar-se apenas na superfície externa da bicamada.

**Figura 2. Representação de lipossoma estericamente estabilizado. (Lasic, A.A. e Martin, F. 1995).**

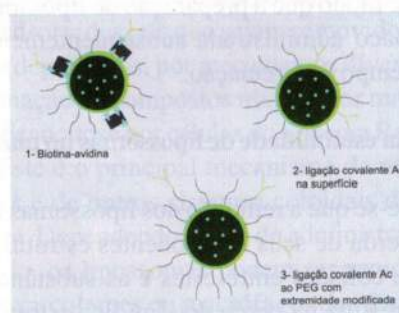


### Terceira geração

A terceira geração dos lipossomas de longa circulação foi marcada pela obtenção dos imunolipossomas, mediante a ligação de anticorpos ou ligantes específicos de um sítio alvo diretamente na superfície dos lipossomas. Havia sido tentada a utilização de lipossomas convencionais para a obtenção dos imunolipossomas, mas o elevado clearance característico desses sistemas impedia a interação com o seu sítio alvo. Dessa forma, a obtenção de imunolipossomas requer a utilização dos lipossomas de longa circulação.

Esses sistemas apresentam a vantagem de terem seu "acesso" facilitado à região de interesse, agindo mediante a liberação do conteúdo encapsulado diretamente na superfície celular. No entanto, sua utilização envolve alguns problemas decorrentes da imunogenicidade dos anticorpos e da própria presença de cadeias de PEG, que podem dificultar a ligação dos anticorpos à superfície dos lipossomas e o reconhecimento do sítio alvo, de modo que se deve atentar para o peso molecular do PEG utilizado e a barreira estérica por ele conferida.

**Figura 3. Representação esquemática da ligação de anticorpos à lipossomas de longa circulação.**



## Propriedades biológicas dos lipossomas de longa circulação

### 1 - Longo tempo de circulação

O longo tempo de permanência na circulação é a característica básica dos lipossomas Stealth<sup>®</sup>, sendo decorrente do reduzido reconhecimento destes pelo Sistema Retículo Endotelial.

O mecanismo pelo qual o PEG exerce seu efeito ainda não é totalmente compreendido, mas sabe-se que está relacionado à barreira estérica promovida pelas cadeias de PEG, que, em decorrência da sua hidrofiliçidade, criam um revestimento que reduz a adesão de opsoninas, impedindo o reconhecimento pelo sistema fagocitário.

Isso vai de acordo com observações prévias de Bangham: "Se quiser ser invisível, pareça com a água".

O mecanismo pelo qual os lipossomas estericamente estabilizados apresentam maior tempo de circulação não é o mesmo dos lipossomas contendo GM1, sendo que a razão pela qual esse gangliosídeo confere habilidade aos lipossomas de permanecerem mais tempo na circulação ainda não é clara. Há duas possibilidades mais aceitas. A primeira delas sugere que o longo tempo de circulação seja decorrente de porções específicas na bicamada que impedem a opsonização.

Foi sugerido que esse efeito seja decorrente da presença de carga negativa protegida na superfície dos lipossomas, como é conferida pelo GM1 e fosfatidilinositol. No entanto, os ácidos siálico e glucurônico conferem carga negativa desprotegida à superfície de lipossomas e também aprestem habilidade de conferir a esses sistemas longos períodos de circulação. A presença de grupamentos carboxílicos na superfície dos lipossomas também foi sugerida como responsável pela obtenção desse efeito.

A segunda possibilidade sugere que o longo tempo de circulação seja decorrente da presença de porções específicas na superfície dos lipossomas que permitem a ligação de compostos responsáveis por impedir a opsonização. Assim sendo, ainda não é compreendido o mecanismo pelo qual o gangliosídeo GM1 confere habilidade aos sistemas de permanecerem longos períodos na circulação.

O tempo de circulação dos lipossomas Stealth<sup>®</sup> é dependente de alguns fatores, tais como:

- *peso molecular do PEG.* Foi demonstrado que a utilização de PEG de peso molecular 1900, 2000 e 5000 Da foi mais eficiente em prolongar o tempo de circulação de lipossomas que outras cadeias de PEG de diferentes pesos moleculares.

- *concentração de PEG nos lipossomas.* A utilização de PEG a 5-10mol% promove aumento no tempo de circulação de lipossomas. Utilizando-se concentrações superiores a essa, a capacidade de impedir o reconhecimento pelo Sistema Retículo Endotelial parece ser saturada; os níveis de lipossomas encontrados no plasma 24 horas após sua administração são muito semelhantes ao encontrados utilizando lipossomas contendo 10mol% de PEG.

- *concentração de GM1.* Da mesma forma que o PEG, a concentração de GM1 influencia o tempo de circulação de lipossomas. Há necessidade de uma concentração mínima de 7mol%, sendo demonstrado que a utilização de 10mol% reduz em 90% a captação pelo Sistema Retículo Endotelial.

- *tamanho do lipossoma.* Vesículas de diâmetro pequeno apresentam maior tempo de circulação. No entanto, vesículas de diâmetro inferior a 50nm penetram pelos poros de vasos sanguíneos, acumulando-se em tecidos de inflamação, infecção e tumores. Por outro lado, lipossomas com diâmetro superior a 200nm apresentam elevada captação pelo fígado e baço.

### 2. Farmacocinética e distribuição nos tecidos dos lipossomas de longa circulação

A farmacocinética dos lipossomas de longa circulação diferencia-se dos convencionais, mostrando-se independente da dose de lipídio administrada, ou seja, não é observada saturação do Sistema Retículo Endotelial.

A encapsulação de fármaco nesses sistemas não promoveu alterações no tempo de circulação. A sua biodistribuição também não se mostrou influenciada pela fluidez de membrana ou carga do fosfolipídio utilizado.

Por outro lado, o longo tempo de circulação desses sistemas promove alteração na sua biodistribuição, sendo demonstrado seu acúmulo em tecidos de inflamação, infecção e tumores, dada a elevada permeabilidade vascular dessas regiões, resultando no chamado direcionamento passivo. Com isso, a concentração de fármaco nessas regiões é maior, promovendo aumento do índice terapêutico desses fármacos, o que é muito útil se tratando de agentes antitumorais, entre outros, que exibem elevada toxicidade.

No entanto, o longo tempo de circulação ainda acarreta uma captação acentuada pela pele, principalmente nos pontos de pressão, originando efeitos tóxicos.

### Vantagens dos lipossomas de longa circulação

Os lipossomas de longa circulação apresentam diversas vantagens frente os convencionais, sendo estas um resumo das principais características desses sistemas.

#### Lipossomas convencionais

- elevada captação pelo Sistema Retículo Endotelial, com conseqüente baixo tempo de circulação
- farmacocinética influenciada pela dose de lipídio
- tempo de circulação e estabilidade no plasma dependentes da composição dos lipossomas
- acúmulo no fígado e baço
- difícil direcionamento mediado por anticorpos

## Lipossomas de longa circulação

- captação pelo Sistema Retículo Endotelial reduzida com conseqüente tempo longo de circulação
- farmacocinética independente da dose de lipídio administrada
- tempo de circulação e estabilidade no plasma independentes da composição das vesículas
- acúmulo em tecidos de inflamação, infecção e tumores
- direcionamento mediado por anticorpos demonstrado *in vivo*

## Conclusões

Têm sido demonstrados, na literatura, vários métodos de modificação da composição de lipossomas e obtenção de sistemas de longo tempo de circulação, dentre eles, a incorporação de glicoproteínas, glicolipídios e derivados lipídicos contendo a cabeça polar polimerizada. As vantagens desses sistemas frente aos lipossomas convencionais são claras, permitindo a expansão da utilização dos lipossomas na terapêutica.

## Bibliografia recomendada

1. ALLEN, T.M. Long-circulating (sterically stabilized) liposome for target drug delivery. *TiPS*, v.15, p.215-220, 1994.
2. ALLEN, T.M. Liposomes - opportunities in drug delivery. *Drugs*, v.54, supl. 4, p.9-14, 1997.
3. ALLEN, T.M., HANSEN, C., MARTIN, F., REDEMANN, C., YA-YOUNG, A. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethyleneglycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1066, p.29-36, 1991.
4. LASIC, D.D., PAPAHAJIOPOULOS, D., Eds. *Medical applications of liposomes*. Amsterdam: Elsevier, 1999, 779p.
5. OKU, N., NAMBA, Y. Long-circulating liposomes. *Crit. Rev. Drug Car. Sys.* v.11, n.4, p.231-70, 1994.
6. WOODLE, M.C., LASIC, D.D. Sterically stabilized liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, v.113, p.171-99, 1992.
7. WOODLE, M.C., NEWMAN, M.S., WORKING, P.K. Biological properties of sterically stabilized liposomes. In: LASIC, D., MARTIN, F. *Stealth liposomes*. Boca Raton, Flórida: CRC Press, Inc., 1995. Cap.10, p.103-18.