

# LIPOSOMAS EM MEDICINA

M. CARLOTA PROENÇA E J. MARTINS E SILVA

Cadeira de Bioquímica. Faculdade de Medicina de Lisboa. Lisboa

## INTRODUÇÃO

Os liposomas são vesículas artificiais de fosfolípidos, originalmente utilizados, como modelos de membranas biológicas, em Bioquímica e Biologia Molecular.<sup>1</sup> Entre outros aspectos, os estudos com liposomas têm possibilitado o esclarecimento da identidade celular, interacções célula-célula, sistemas de transporte e síntese do ATP.<sup>2</sup>

O sucesso obtido por Sessa e Weissmann em 1970,<sup>3</sup> com a incorporação de uma enzima (a lisozima) em liposomas, abriu perspectivas à aplicação destas estruturas na investigação médica e farmacológica. De facto, a capacidade de incorporação de diversos tipos de moléculas (enzimas, drogas, etc.) e respectiva cedência às células, confere aos liposomas interesse científico e potencialidades práticas relevantes.<sup>4</sup>

Desde então, sucessivos trabalhos vêm salientando a eventual utilidade dos liposomas na terapêutica de diversas situações patológicas humanas, sobretudo como sistema de transporte de drogas.<sup>2</sup> Entre as principais características, que fazem dos liposomas um candidato relevante a sistema transportador de medicamentos, destacam-se: composição idêntica a constituintes corporais, reduzida capacidade imunogénica, virtual ausência de toxicidade, fácil captação e conservação de substâncias estranhas.<sup>5</sup>

Ao entusiasmo inicial sobreveio a realidade ao verificarem-se limitações técnicas que, ainda hoje, impedem a aplicação sistemática dos liposomas em esquemas terapêuticos. No entanto, estudos em curso, orientados para o comportamento *in vivo* e *in vitro* dos liposomas, são de molde a admitir o seu aproveitamento generalizado em Medicina, em futuro próximo.<sup>6</sup>

## OS LIPOSOMAS COMO MODELOS DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Os fosfolípidos apresentam fases diferentes consoante a temperatura e o grau de hidratação. A uma temperatura superior à de transição e acima de um teor em água de 40%, os fosfolípidos formam vesículas multilamelares hidratadas.<sup>7</sup> Estas vesículas, constituídas *in vitro* a partir de fosfolípidos naturais ou sintéticos, são designadas por liposomas.

A estrutura mais comum consiste em muitas camadas bimoleculares concêntricas, separadas entre si por um compartimento aquoso estanque. A camada exterior separa o interior de toda a estrutura do meio aquoso externo, podendo assim ser comparada a uma membrana biológica (Fig.1).

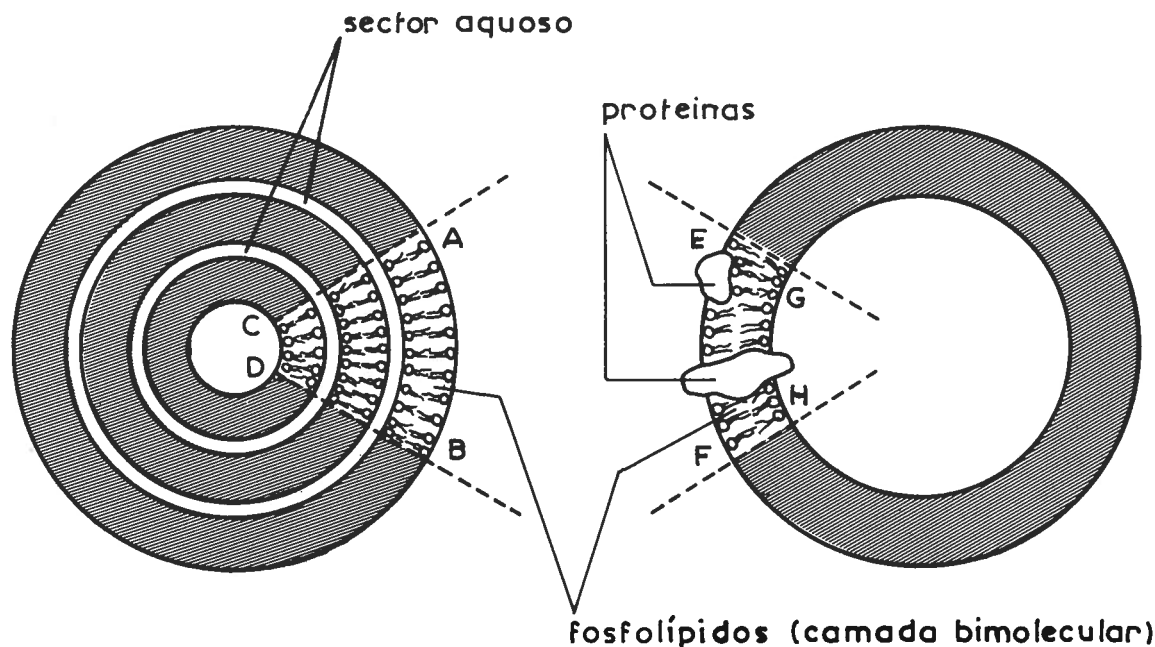


Fig. 1 — Representação esquemática bidimensional da estrutura de um liposoma (a) e da membrana celular (b). As áreas assinaladas (A B C D; E F G H) atravessam cada uma das estruturas a) e b) referenciadas.

A geometria do liposoma depende da concentração e composição relativas dos dois componentes principais (lípidos, água), além da temperatura de formação.

Tal como nas membranas naturais, também nos liposomas existe interdependência da composição com o comportamento físico.<sup>2,8</sup>

Estes sistemas de modelo de membrana, permeáveis à água, são cerca de  $10^2$  vezes mais permeáveis aos aniões que aos catiões; a permeabilidade aos catiões depende da carga total do liposoma (sinal e valor absoluto), e da presença e tipo de esteróis constituintes.<sup>9</sup>

A permeabilidade das membranas artificiais aos não-electrólitos varia com o comprimento e insaturação das cadeias dos ácidos gordos, presença e/ou ausência de colesterol.<sup>10,11</sup> Na presença de colesterol, a permeabilidade aos não-electrólitos em liposomas constituídos por ácidos gordos insaturados era menor que na sua ausência, aumentando neste caso com o grau de insaturação dos ácidos gordos.

O comportamento osmótico dos liposomas, embora semelhante ao de um osmómetro, é alterado pela presença de poliaminoácidos. O ácido poliglútamico e a polilisina diminuem a velocidade de expansão e concentração das vesículas de dipalmitoil, sendo o grau de variação dependente do tipo de poliaminoácidos e do mecanismo de interacção que estabelece com as cadeias lipídicas.<sup>12</sup>

A microviscosidade aumenta com a razão colesterol/fosfolípido, por aumento da ordem no sistema e desaparecimento gradual da transição de fase. Na sua essência, o comportamento físico dos liposomas assemelha-se ao das membranas biológicas.<sup>9</sup>

A preparação dos liposomas é, nos seus princípios, muito simples.

Os liposomas multilamelares são preparados a partir de uma solução de fosfolípidos em clorofórmio da qual se separa, por evaporação em vácuo, o resíduo lipídico, sob a forma de uma película seca e fina, rapidamente dispersa em fase aquosa com agitação.<sup>1</sup> Por ultra-sonicação das vesículas multilamelares obtêm-se microvesículas unilamelares.

Embora sejam conhecidos vários métodos de preparação de liposomas, é possível obter por diálise controlada liposomas unilamelares e homogéneos em tamanho,<sup>13</sup> extremamente úteis para a encapsulação de drogas e outras macromoléculas.

## INTERACÇÕES LIPOSOMAS-CÉLULAS

A despeito dos esforços envidados, a utilização dos liposomas como veículo de distribuição preferencial de drogas e outras substâncias a que as membranas celulares são impermeáveis, é ainda um objectivo dificilmente concretizável.<sup>2</sup> Entre as substâncias cuja administração em liposomas tem sido testada mencionam-se: drogas antitumorais,<sup>14,15</sup> agentes quelantes,<sup>16,17</sup> enzimas,<sup>3,18</sup> hormonas,<sup>19</sup> nucleótidos cíclicos e polinucleótidos.<sup>4</sup> Alguns dos estudos foram realizados em suspensões celulares ou culturas de tecidos, outros em órgãos isolados ou animais intactos, incluindo o homem.

Parte das dificuldades encontradas estão centradas no mecanismo de interacção dos liposomas com as células, particularmente no que se refere ao destino intracelular do material incorporado. A inclusão de marcadores fluorescentes parece resolver parcialmente este problema, ao distinguir a substância que permanece nas vesículas transportadoras (não-fluorescentes) da fracção transferida para o compartimento intracelular (fluorescente).<sup>9,21</sup>

*In vitro* e, talvez também, *in vivo*,<sup>14,22</sup> os liposomas interaccionam com as células de três maneiras: endocitose, adsorção e fusão (Fig. 2). Por endocitose, os liposomas são incor-

porados integralmente nas células e subsequentemente captados pelos liposomas. Este mecanismo, quase exclusivo das células com acção fagocitária, como os granulócitos e fagócitos mononucleares, verifica-se ainda em alguns tipos de células tumorais, fibroblastos e células endoteliais.

Em alternativa, os liposomas podem permanecer fixados à superfície (por adsorção) de determinada célula, ou, após fusão com a membrana celular, transferirem directamente o seu conteúdo para o citoplasma; os fibroblastos e linfócitos são tipos celulares particularmente envolvidos nos mecanismos de adsorção e fusão.

O comportamento dos liposomas *in vivo* é influenciado pelas dimensões das vesículas (e, consequentemente, pelo número de camadas constituintes) e pela carga eléctrica de superfície.<sup>14</sup> De facto, a superfície dos liposomas pode ter carga negativa ou positiva; os liposomas com carga negativa são removidos mais rapidamente da circulação que os neutros ou com carga positiva.<sup>23</sup> A  $\alpha$ -macroglobulina do sangue humano, ao reverter a carga dos liposomas positivos ou acentuar a carga negativa nos outros, parece beneficiar a capacidade transportadora daquelas vesículas.<sup>24</sup> Do mesmo modo, a permanência dos liposomas em circulação (minutos a horas) pode ser condicionada pelas suas dimensões.<sup>14</sup> Após administração endovenosa, os liposomas vão sendo sequestrados pelos tecidos; os de maiores dimensões, com múltiplas camadas, são essencialmente captados pelos macrófagos do sistema retículo-endotelial, que predominam no fígado e baço; os liposomas mais pequenos, constituídos por uma camada, distribuem-se difusamente pela generalidade das células parenquimatosas, além de serem, também, captados pelos macrófagos teciduais.<sup>14</sup>

Em contrapartida, existem sectores corporais dificilmente acessíveis aos liposomas, tais como o miocárdio e o músculo esquelético,<sup>23</sup> do mesmo modo, nem a barreira hemato-encefálica nem os glomérulos renais são atravessados pelos liposomas.<sup>2</sup>

## APLICAÇÃO DOS LIPOSOMAS EM MEDICINA

O desenvolvimento desta área, bastante promissora, vai depender dos resultados obtidos em experimentação animal, particularmente da distribuição do material transportado nos liposomas para o compartimento celular de determinados tecidos e modulação da captação daquelas vesículas pelas células do sistema retículo-endotelial e parenquimatosas. Acessoriamente, mas não menos importante, há que esclarecer o comportamento farmacológico e propriedades cinéticas das drogas incluídas nos liposomas, relativamente aos seus efeitos quando livres em circulação. Neste ponto, salienta-se que o comportamento farmacocinético das drogas encapsuladas em liposomas depende das características físicas do transportador (dimensão e carga) e das propriedades das drogas.<sup>14</sup> A grande vantagem que os liposomas trazem à Medicina é a de possibilitarem o acesso às células corporais através de um mecanismo diferente das vias habituais.

Na generalidade, as drogas encapsuladas em liposomas exercem efeitos mais duradouros que no estado livre,<sup>6</sup> conferindo vantagens acentuadas a determinados tipos de terapêutica, como a antitumoral.<sup>25</sup> O eventual bloqueio do sistema retículo-endotelial reforçará aquela acção, por ex. verificada com a administração da citosina-arabinósido na leucemia do murganho.<sup>14</sup> No entanto, muitas células tumorais têm propriedades fagocitárias semelhantes às do fígado e baço, o que, de certo modo, aumenta a eficácia da terapêutica citotóxica. Foi experimentalmente demonstrado que

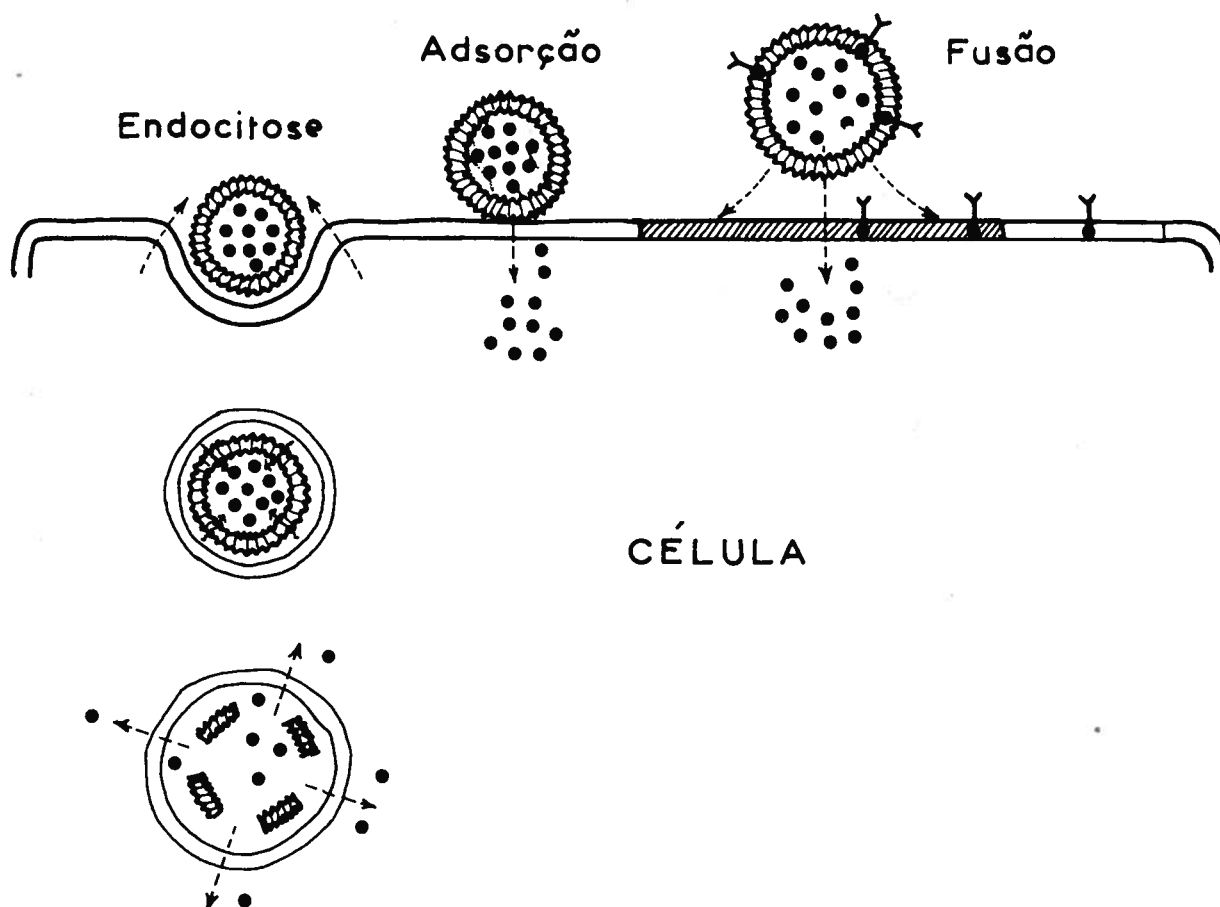


Fig. 2 — Representação esquemática de três mecanismos de interação células-liposomas.

a permeabilidade das células tumorais às drogas citotóxicas, tais como a vimblastina, actinomicina D, daunomicina e citosina-arabinósido, é acentuada pela sua inclusão em liposomas.<sup>14</sup> Por outro lado, existe a possibilidade de confinar a ação de drogas a sectores corporais restritos, o que foi evidenciado experimentalmente com agentes citotóxicos e anti-inflamatórios (na patologia articular).

Relativamente às drogas anti-tumorais<sup>5,14,26</sup> verificou-se que os liposomas com aquele material tendem a libertá-lo nos tumores, quando a constituição das vesículas transportadoras inclui ácidos gordos sensíveis a níveis de pH inferiores aos fisiológicos. Como o líquido intersticial de numerosos tumores, em humanos e outros animais, apresenta pH consideravelmente inferior ao dos tecidos normais,<sup>27</sup> os liposomas com aquelas características tendem a libertar as drogas transportadas nas regiões em acidemia.

A hipertermia localizada em áreas inflamadas ou infectadas também favorece a libertação de produtos encapsulados em liposomas, especialmente preparados para o efeito.<sup>28</sup>

Liposomas de palmitato com cortisol têm sido aplicados em injeção intra-articular no tratamento de artrite, revelando efeitos anti-inflamatórios muito superiores a doses equivalentes administradas por via geral.<sup>20</sup>

Outro avanço potencial explora a inclusão nos liposo-

mas de substâncias que actuam como receptores ou quelantes de substâncias indesejáveis ao organismo, tais como excesso de ferro em depósito ou intoxicações por metais pesados. Liposomas com ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) foram já utilizados no tratamento de intoxicações com metais pesados,<sup>17</sup> assim como liposomas com desferrioxamina evidenciam sucesso no tratamento de intoxicações pelo ferro ou controlo dos depósitos férricos na talassemia.<sup>29</sup>

Finalmente, a captação electiva dos liposomas pelo sistema reticulo-endotelial poderá ser utilizada com êxito no tratamento de doenças parasitárias intracelulares, como a leishmaníase.<sup>16</sup> Desta forma, os compostos de antimónio, muito tóxicos, seriam orientados especialmente para as áreas parasitadas.

Os liposomas multilameares e com maiores dimensões estariam particularmente indicados na terapêutica das doenças pulmonares, devido à facilidade com que são retidos nos capilares dos pulmões, a par da acumulação no fígado e baço.<sup>4-6</sup>

A recente descrição do tratamento de um caso de hemofilia pela administração, por via oral, de liposomas contendo o factor VIII do sangue,<sup>30</sup> evidencia claramente que técnicas bioquímicas sem interesse prático aparente podem, no futuro, assumir valor incalculável na prática clínica.

## Bibliografia

1. BANGHAM, A.: The liposome as a membrane model. In «Permeability and Function of Biological Membranes», L. Bolis, A. Katchalsky R.D. Keynes, W.R. Loewenstein e B.A. Pethica(eds.), North-Holland Publ. CO, 1970; pg. 195-206.
2. JULIANO, R.C.: Liposomes as a drug delivery systems. Trends Pharmacol Sc. 1981; Fev. 39-41.
3. SESSA, G. e WEISSMANN, G.: Incorporation of lysozyme into liposomes, J. Biol. Chem. 1970; 245: 3295-3301.
4. GREGORIADIS, G.: The carrier pontencial of liposomes in biology and medicine. N. Engl. J. Med. 1976; 295: 704-710, 765-770.
5. JULIANO, R.C.: Drug delivery systems; a brief review. Can. J. Physiol. Pharmacol. 1978; 56: 683-690.
6. HOPKINS, S.J.: Liposomes in medicine. A review of their development as a drug — delivery system. Drugs of Today 1981; 17: 42-46.
7. BANGHAM, A.D. e HAYDON, D.A.: Ultrastructure of membranes: bimolecular organization. Brit. Med. Bull. 1968; 24: 124-126.
8. BANGHAM, A.D.: Lipid bilayers and biomembranes. Ann. Rev. Biochem. 1972; 41: 753-780.
9. WEINSTEIN, J.N., YOSHIKAMI, S. HENKART, P. et al: Liposome-cell interaction: transfer and intracellular release of trapped fluorescent marker. Science 1977; 195: 489-492.
10. DE DIER, J., BLOCK, M.C. van DIJCK, P.W.M. et al: Relations between liposomes and biomembranes. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1978; 308: 85-92.
11. JANIACK, M.J., SMALL, D.M. e SHILPLEY, G.G.: Temperature and compositional dependence of the struture of hydrated dimyristoyl lecithin. J. Biol. Chem. 1979; 264: 6068-6078.
12. CHWANG, W.K., PAWAGI, A. e CAMPBELL, I.M.: Changes in the osmotic behaviour of phosphatidycholine vesicles induced by interaction with polyamino acids. Can. J. Biochem. 1979; 57: 302-307.
13. ZAMBUEHLH, O e WEDER, H.G.: Liposomes of controllable size in the range of 40 to 180nm by defined dialysis of lipid/detergent mixed micelles. Biochem. Biophys Acta 1981; 640: 252-261.
14. JULIANO, R.L. e STAMP, D.: Pharmacokinetics of liposomes encapsulated anti-tumour drugs. Biochem. Pharmacol. 1978; 27: 21-27.
15. PIERSON, H.F. e MEADOWS, G.G.: Properties of stearylamine liposomes containing tyrosine phenol-lyase. Biochem. Biophys. Acta. 1981; 676: 177-186.
16. NEW, R.R.C. et al: Antileishmiamial activity of antimonial entrapped liposomes. Nature 1978; 272: 55-56.
17. YOUNG, S.P., BAKER, E. e HUEHUS, E.R.: Liposome entrapped desferrioxamine and iron-transporting ionophores; a new approach to iron chelation therapy. Brit. J. Haematol. 1979; 41: 357-363.
18. HALL, E.R. e BRODBECK, U.: Humam erythrocyte membrane acetylcholinesterase. Incorporation into the lipid bilayer struture of liposomes. Europ. J. Biochem. 1978; 89: 159-167.
19. DAPERGOLA, G. e GREGORIADIS, G.: Hypoglycaemic effect of liposomes-entrapped insulin administered intragastrically into rats. Lancet 1976; 2: 824-827.
20. DE SILVA, M., HAZLEMAN, B.L., THOMAS, D.P.P. e WRAIGHT, P.: Liposomes in arthritis: a new approach. Lancet. 1979; 1: 1320-1322.
21. HAIGH, E.A., THULBORN, K.R. e SAWYER, W.H.: Comparison of fluorescence energy transport and quenching methods to establish the position and orientation of components within the transverse plane of the lipid bilayer. Application to the gramicidin A — bilayer interaction. Biochemistry, 1979; 18: 3525-3532.
22. GREGORIADIS, G. e RYMAN, B.E.: Fate of protein-containing liposomes into rats. An approach to the treatment of storage diseases. Europ. J. Biochem. 1972; 24: 485-491.
23. MUELLER, T.M., MARCUS, M.L. MAYER, H.E. et al: Liposomes concentration in canine ischemic myocardium and depolarized myocardial cells. Circ. Res. 1981; 49: 405-415.
24. BLACK, C.D.U. e GREGORIADIS, G.: Interaction of liposomes with blood plasma proteins. Biochem. Soc. Trans. 1976; 4: 253-256.
25. KIMELBERG, H.K.: Differential distribution of liposome — entrapped<sup>3</sup>H — methotrexate and labeled lipids after intravenous injection in a primate. Biochem. Biophys. Acta 1976; 448: 531-550.
26. GREGORIADIS, G.: Drug entrappment in liposomes. Possibility for chemotherapy. Biochem. Soc. Trans. 1974; 2: 117-119.
27. YATVIN, M.B., KREUTZ, W., HORWITZ, B.A. et al: pH-sensitive liposomes; possible clinical implications. Science 1980; 210: 1253-1255.
28. YATVIN, M.B.: Liposomes and local hyperthermia: selective delivery of methotrexate to heated tumors. Science 1979; 204: 188.
29. GREEN, R. et al: Clinical trial of desferrioxamine entrapped in red cell ghosts. Lancet 1980; 2: 327-330.
30. HEMKER, H.C. et al: Oral treatment of heamophilia by gastrointestinal absortion of factor VIII entrapped in liposomes. Lancet 1980; 1: 70-71.

Pedido de separatas: M. Carlota Proença  
Cadeira de Bioquímica  
Faculdade de Medicina de Lisboa  
Hospital de Santa Maria  
1600 Lisboa . Portugal