

Captura de lipossomas pelas placas de Peyer de camundongos após administração oral

Gilson Andrade Ramaldes^{1*}, Maira Alves Pereira¹, Poliana Teixeira de Castro¹, Lauro Mello Vieira², Valbert Nascimento Cardoso²

¹Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais,

²Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais

O objetivo deste estudo foi marcar uma proteína utilizada como modelo, a soro albumina bovina (SAB), com ^{99m}Tecnécio (^{99m}Tc), encapsular a proteína marcada (^{99m}Tc-SAB) em lipossomas e empregar este marcador para quantificar a ^{99m}Tc-SAB capturada pelas placas de Peyer de camundongos Balb/c após administração oral. A ^{99m}Tc-SAB (taxa de marcação=94,9±2,4%; n=25) foi encapsulada em lipossomas multilamelar (MLV), unilamelar de pequeno tamanho (SUV) ou unilamelar de grande tamanho (LUV) compostos de fosfatidilcolina de soja (PC); PC e colesterol (CH) (razão molar 8/2); PC, CH e fosfatidilglicerol (PG) (razão molar 7/2/1) ou distearoilfosfatidilcolina (DSPC), CH e PG (razão molar 7/2/1). Utilizando eletroforese em gel de agarose e imuno-eletroforese contra uma imunoglobulina anti-SAB específica, foi verificado que a SAB não sofreu degradação após ter sido marcada com ^{99m}Tc e encapsulada em lipossomas. ^{99m}Tc-SAB encapsulada em SUV compostos por PC/CH/PG ou DSPC/CH/PG foi preferencialmente capturada pelas placas de Peyer. A captura de ^{99m}Tc-SAB encapsulada em LUV foi reduzida quando comparada com aquela observada para SUV com a mesma composição em lipídios. ^{99m}Tc-SAB encapsulada em MLV compostos por PC/CH/PG ou DSPC/CH/PG e em SUV compostos de PC ou PC/CH não foi capturada pelas placas de Peyer. Os resultados indicam que SUV pode ser um carreador para antígenos instáveis no trato gastrointestinal, tornando-os potencialmente capazes de induzir a resposta imunológica das mucosas.

Unitermos:

- Lipossomas
- Soroalbumina bovina
- ^{99m}Tecnécio
- Placas de Peyer
- Administração oral

*Correspondência:

G. A. Ramaldes
Faculdade de Farmácia da UFMG
Avenida Olegário Maciel, 2360
30180-112 Belo Horizonte – Brasil
E-mail: ramaldes@farmacia.ufmg.br

INTRODUÇÃO

Infecções bacterianas intestinal e pulmonar constituem a maior causa de mortalidade infantil no mundo. Tradicionalmente, as pesquisas visando ao desenvolvimento de vacinas têm como objetivo a indução de imuni-

dade sistêmica, através da imunização parenteral envolvendo as vias intramuscular e subcutânea. No entanto, é de amplo conhecimento que, na maioria das doenças, o hospedeiro é usualmente infectado através das mucosas digestivas, nasal, retal ou genital. Por isso, para algumas infecções, a rota mucosa seria o meio de imunização mais

apropriado, oferecendo vantagens sobre as vacinas parenterais (Chen, 2000). Por ser uma escolha atrativa, a via mucosa constitui prioridade para a Organização Mundial da Saúde, no que diz respeito ao desenvolvimento de vacinas (World Health Organization, 1997).

A presença do sistema imunitário nas mucosas tem permitido o estudo de novas estratégias para a administração oral de antígenos (Fattal *et al.*, 1995), visando aumentar a resposta imunitária tanto local como também nas outras mucosas (Mestecky, 1987). No trato digestivo, os antígenos podem ser capturados por aglomerados de folículos linfóides situados na parede do intestino delgado, denominados de placas de Peyer, onde se inicia a resposta imunitária das mucosas, com a produção da imunoglobulina IgA secretora (SIgA). A SIgA age como a primeira linha de defesa, servindo como interface entre os meios externo e interno (Iscakis, Bouvet, 1993; Mazanec *et al.*, 1993). O conceito de que a SIgA pode oferecer proteção foi confirmado em estudos da vacina oral contra a poliomielite, que induziu a produção de IgA no intestino (Ogra, Karzon, 1971), e também em estudos de resistência a variedade de viroses, bactérias e parasitas que infectam o trato respiratório ou digestivo (Kilian *et al.*, 1988).

Entretanto, após administração oral, os antígenos de natureza protéica ou peptídica podem ser degradados em todos os níveis do trato gastrointestinal pelas enzimas proteolíticas e pela acidez gástrica (Russel-Jones, 2000). Além disso, somente os antígenos particulados são capturados pelas placas de Peyer (LeFevre, Joel, 1984). Por estes motivos, estudos têm sido feitos visando desenvolver sistemas de liberação que permitam proteger os antígenos contra as enzimas proteolíticas e favorecer sua captura pelas placas de Peyer. Esses sistemas são constituídos de vetores coloidais poliméricos (micro e nanopartículas) ou lipídicos (lipossomas).

Numerosos estudos demonstraram que os vetores coloidais poliméricos concentram-se nas placas de Peyer após administração oral e que existem parâmetros físico-químicos importantes, tais como o tamanho, a carga, a hidrofobicidade e a composição das partículas para que elas sejam capturadas (Brayden, 2001). Para os lipossomas, talvez devido à baixa estabilidade desses sistemas frente aos fluidos digestivos, poucos estudos foram realizados (Brayden, Baird, 2001).

Com base nessas observações torna-se de fundamental importância, antes de testar um sistema de imunização capaz de produzir SIgA nessas verdadeiras “portas de entrada” de bactérias e vírus do organismo, ter melhor compreensão dos parâmetros para a administração oral de lipossomas contendo um antígeno. Nesse sentido, o obje-

tivo deste estudo foi marcar uma proteína utilizada como modelo, a soro albumina bovina (SAB), com ^{99m}Tc (Tecnécio (^{99m}Tc)), encapsular a proteína marcada (^{99m}Tc -SAB) em lipossomas e empregar este marcador para quantificar a ^{99m}Tc -SAB capturada pelas placas de Peyer de camundongos Balb/c após administração oral.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Fosfatidilcolina (fosfatidilcolina de soja insaturada, 99% de fosfatidilcolina) (PC), diestearoilfosfatidilcolina (fosfatidilcolina de soja hidrogenada 18:0/18:0, 98,4% de diestearoilfosfatidilcolina) (DSPC) e fosfatidilglicerol (PG) foram gentilmente cedidos por LIPOID KG (Alemanha). Soro albumina bovina (SAB), imunoglobulina anti-SAB e colesterol (CH) foram obtidos da SIGMA (Estados Unidos da América). Sephadex G-25 foi obtido da PHARMACIA (Suécia), Sílica-gel 60 da MERCK (Alemanha) e membranas de policarbonato da MILLIPORE (Brasil). Os demais reagentes utilizados possuem grau analítico e foram utilizados sem purificação adicional.

Marcação da SAB com ^{99m}Tc (^{99m}Tc -SAB)

A marcação da SAB com ^{99m}Tc foi feita utilizando o método descrito por Eckelman (1990) e por Pauwels *et al.* (1993). A eficiência de marcação foi avaliada variando-se as concentrações de SAB (5 a 40 mg/mL), cloreto estano (SnCl₂, 1 a 4 mg/mL em HCl 0,25 N), boroidreto de sódio (NaBH₄, 2,5 a 20,0 mg/mL em NaOH 0,1 M) e a atividade do pertecnetato de sódio meta estável (Na $^{99m}\text{TcO}_4$, 7,4 a 37,0 MBq). Alíquotas de 100 µL das soluções de SAB foram incubadas à temperatura ambiente, durante 20 minutos, com 2 µL das soluções de SnCl₂ e 2 µL das soluções de NaBH₄. Ajustou-se o pH para 7,0 e adicionaram-se 200 µL das soluções de pertecnetato de sódio. O rendimento da marcação foi verificado da seguinte maneira:

fase A - a determinação do percentual de ^{99m}Tc livre (TcO_4^-), que não foi reduzido pelo SnCl₂, foi realizada por cromatografia em camada delgada utilizando sílica-gel 60. Alíquotas de 3 µL do produto marcado foram aplicadas em tiras de sílica-gel 60 (1 x 10 cm) e eluídas com acetona;

fase B - o percentual de ^{99m}Tc reduzido (TcO_2^-), que não se incorporou na estrutura da proteína, foi determinado por cromatografia descendente. Alíquotas de 3 µL da ^{99m}Tc -SAB foram aplicadas em tiras de papel Whatman n°1 (5

x 36 cm), previamente tratadas com solução de albumina a 1% p/v, e eluidas com solução de NaCl a 0,9% p/v.

Com os resultados obtidos nas fases A e B, determinou-se o percentual de ^{99m}Tc que realmente se incorporou na SAB utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de Marcação} = \text{cpm } (^{99m}\text{Tc-SAB}) \times 100 / \text{cpm total } (^{99m}\text{Tc-SAB} + \text{TeO}_4^- + \text{TeO}_2^-)$$

onde, cpm = contagem por minuto.

Preparação de lipossomas contendo $^{99m}\text{Tc-SAB}$

Foram preparados lipossomas “fluidos” e “rígidos” contendo $^{99m}\text{Tc-SAB}$. Os “fluidos” foram compostos de fosfatidilcolina (PC), colesterol (CH) e fosfatidilglicerol (PG) (razão molar 7/2/1) e os “rígidos” de diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), CH e PG (razão molar 7/2/1). Para cada fórmula foram preparados lipossomas unilamelares de pequeno tamanho (SUV), unilamelares de grande tamanho (LUV) e multilamelares (MLV) em temperatura ligeiramente acima da temperatura de transição de fase dos fosfolípidios estruturais, 20 °C para PC e 60 °C para DSPC. A separação da $^{99m}\text{Tc-SAB}$ encapsulada da não encapsulada em lipossomas foi feita utilizando ultracentrifugação a 14.000 x g, durante 30 minutos. A quantificação da proteína encapsulada foi realizada por contagem da radioatividade da $^{99m}\text{Tc-SAB}$.

MLV foram preparados de acordo com o método clássico de formação de filme (Bangham *et al.*, 1965). Os lípidios foram dissolvidos em clorofórmio e utilizando um rotaevaporador foi formado um filme seco. O filme foi, então, disperso, com auxílio de vortex e ultra-som em tampão HEPES pH 7,4 contendo $^{99m}\text{Tc-SAB}$, por 15 a 30 minutos. Finalmente, a dispersão sofreu 10 ciclos de extrusões através de membrana de policarbonato de 0,4 μm para gerar MLV uniformes.

SUV e LUV foram obtidos conforme descrito por Ramaldes *et al.* (1996b). Após a formação do filme lipídico e sua dispersão em solução de $^{99m}\text{Tc-SAB}$, foram efetuados dez ciclos de extrusões através de membranas de policarbonato de 0,4 μm ; 0,2 μm ; 0,1 μm e 0,05 μm , a fim de gerar SUV. LUV foram obtidos submetendo os SUV a cinco ciclos de congelamento e descongelamento.

A presença ou não de SAB adsorvida à superfície externa das vesículas foi verificada da seguinte forma: lipossomas contendo $^{99m}\text{Tc-SAB}$ foram incubados a 37 °C em tampão fosfato contendo ou não 1% p/v de tripsina. Decorridos 30 minutos de incubação, as amostras foram novamente ultracentrifugadas e a radioatividade de $^{99m}\text{Tc-SAB}$ presente nas vesículas foi determinada.

Verificação da integridade estrutural e antigênica da SAB após marcação com ^{99m}Tc e após encapsulamento em lipossomas

Cinco soluções foram utilizadas: SAB a 4 g/dL, $^{99m}\text{Tc-SAB}$ a 2 g/dL, lipossomas contendo SAB (2 g/dL), lipossomas sem SAB e uma amostra de soro humano total a 7,2 g/dL. Antes de ser feita a eletroforese e a imunoeletroforese, os lipossomas, contendo ou não SAB, foram rompidos com Triton a 4% p/v, sob aquecimento a 56 °C, durante quatro horas. Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose e à imunoeletroforese contra uma imunoglobulina anti-SAB específica em tampão veronal 0,01 M pH 8,6, a 100 V, amperagem de 12,5 mA, por 50 minutos seguida de difusão em câmara úmida, por 24 horas à temperatura ambiente.

Estudos de captura de lipossomas de $^{99m}\text{Tc-SAB}$ pelas placas de Peyer de camundongos Balb/c

No dia do experimento procedeu-se à marcação da SAB com ^{99m}Tc , conforme descrito anteriormente. Visando obter um valor de radioatividade dentro da sensibilidade do aparelho responsável pela contagem radioativa, as soluções contendo $^{99m}\text{Tc-SAB}$, livre ou encapsulada em lipossomas, foram diluídas em solução salina de modo a obter contagem inferior a $1,0 \times 10^6$ cpm. Após diluição, alíquotas de 0,4 mL foram administradas oralmente, por meio de sonda, a camundongos Balb/c com 6 a 8 semanas de idade submetidos a jejum durante 18 horas. Duas horas após a administração, os animais foram anestesiados e sacrificados; o intestino delgado foi retirado, lavado interna e externamente com solução de NaCl 0,9%, pesado e a radioatividade devido a $^{99m}\text{Tc-SAB}$ foi determinada. Em seguida, as placas de Peyer e os segmentos adjacentes de tamanho similar foram removidos, pesados separadamente e estocados em recipientes contendo 20 mL de solução salina e mantidos sob agitação durante 10 minutos. Em seguida, a contagem da radioatividade foi feita para o líquido de lavagem, intestinos, placas de Peyer e segmentos isentos de placas de Peyer. O percentual de captura foi calculado considerando-se como 100% a atividade total encontrada.

Também foram feitos estudos de captura pelas placas de Peyer utilizando lipossomas sem $^{99m}\text{Tc-SAB}$. Neste caso, as membranas de SUV compostos de PC/CH/PG (razão molar 7/2/1) ou DSPC/CH/PG (razão molar 7/2/1) contendo 10 μmol de lípidios totais/mL foram marcadas com ^{99m}Tc utilizando o mesmo procedimento. A captura pelas placas de Peyer foi verificada 2 horas após administração oral a camundongos Balb/c.

Os resultados foram comparados através do teste t de Student pareado e não pareado. Foram considerados estatisticamente significativos (S) os resultados que apresentaram um intervalo de confiança (p) igual ou maior que 95% e não significativos (NS) para valores menores que 95%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Rendimento de marcação da SAB com ^{99m}Tc ($^{99m}\text{Tc-SAB}$)

A otimização da marcação da SAB com ^{99m}Tc foi realizada variando a atividade do $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ (7,4 a 37,0 MBq) e as concentrações das soluções de SAB (5 a 40 mg/mL), SnCl_2 (1 a 4 mg/mL) e NaBH_4 (2,5 a 20,0 mg/mL) (Tabela I).

Após a definição das condições de marcação (20 mg de SAB/mL, 2 mg de SnCl_2 /mL, 10 mg de NaBH_4 /mL e 7,4 MBq de atividade para o pertecnetato de sódio), 25 marcações da SAB foram obtidas com teor de pureza radioquímica de $94,9 \pm 2,4\%$. Esse teor de pureza permite a realização de experimentos “*in vivo*”, uma vez que o percentual de tecnécio livre (TcO_4^-), da ordem de 5%, está

dentro dos parâmetros fixados pela literatura para estudos de distribuição biológica com radiotraçadores (Diniz *et al.*, 1999).

Otimização da preparação de lipossomas contendo $^{99m}\text{Tc-SAB}$

Estudos foram feitos com objetivo de otimizar os métodos de preparação de lipossomas. Inicialmente, o número de ciclos de ultracentrifugações necessários para eliminar a $^{99m}\text{Tc-SAB}$ não encapsulada nos lipossomas foi estudado. A Tabela II demonstra que um ciclo de ultracentrifugação é suficiente para isolar a $^{99m}\text{Tc-SAB}$ encapsulada da não-encapsulada nos lipossomas.

A presença de SAB adsorvida à superfície externa dos lipossomas foi verificada incubando-se lipossomas de $^{99m}\text{Tc-BSA}$ em tampão fosfato contendo ou não tripsina. A radioatividade de $^{99m}\text{Tc-SAB}$ encontrada na presença de tripsina foi de $102,9 \pm 1,8\%$ (n=3) em relação àquela obtida na ausência desta enzima. Assim, pode-se concluir que não havia SAB adsorvida à superfície externa dos lipossomas após um ciclo de ultracentrifugação (Ramaldes *et al.*, 1996b).

TABELA I - Otimização da marcação da soro albumina bovina com tecnécio. Os valores expressos correspondem à média \pm desvio padrão (n=3)

SAB (mg/mL)	SnCl_2 (mg/mL)	NaBH_4 (mg/mL)	$\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ (MBq)	% de marcação
5,0	2,0	10,0	7,4	70,6 \pm 4,0
10,0				86,3 \pm 0,9
20,0				96,0 \pm 1,4
30,0				95,7 \pm 0,6
40,0				98,2 \pm 0,1
20,0	1,0	10,0	7,4	89,7 \pm 1,0
	1,5			96,0 \pm 0,6
	2,0			96,0 \pm 1,4
	3,0			96,8 \pm 0,3
	4,0			95,7 \pm 1,6
20,0	2,0	2,5	7,4	94,7 \pm 1,1
		5,0		95,1 \pm 0,4
		10,0		96,0 \pm 1,4
		15,0		92,5 \pm 1,0
		20,0		89,5 \pm 0,3
20,0	2,0	10,0	7,4	96,0 \pm 1,4
			14,8	93,9 \pm 1,4
			22,2	94,0 \pm 1,5
			29,6	95,0 \pm 1,2
			37,0	92,0 \pm 2,2

SAB = soro albumina bovina; SnCl_2 = cloreto estano; NaBH_4 = boroidreto de sódio; $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ = pertecnetato de sódio.

TABELA II - Medida da radioatividade de ^{99m}Tc -SAB encapsulada em lipossomas após 1, 2 e 3 ciclos de ultracentrifugações a 14.000 x g durante 30 minutos/ciclo. Os valores expressos correspondem à média±desvio padrão (n=6)

Ciclos de ultracentrifugações	% de ^{99m}Tc -SAB
1	100,0
2	96,4±0,8
3	98,1±1,4

^{99m}Tc -SAB = soroalbumina bovina marcada com ^{99m}Tc .

Verificou-se, também, a influência da concentração dos lipídios totais, utilizando LUV compostos de PC/CH/PG (razão molar 7/2/1), sobre a taxa de encapsulamento da SAB. Para 10 μmol de lipídios totais/mL a taxa de encapsulamento foi de 24,4±2,9% (n=6) e para 20 μmol de lipídios totais/mL foi de 32,1±3,3% (n=6). Resultados semelhantes foram observados por Ramaldes *et al.* (1996b) ao encapsular SAB em lipossomas, com diferentes concentrações de lipídios, utilizando um método imunoenzimático para verificar o percentual de encapsulamento.

Finalmente, verificou-se a influência do tipo de lipossomas (SUV, LUV ou MLV) e do lipídio estrutural utilizado (“fluido” ou “rígido”) na taxa de encapsulamento da ^{99m}Tc -SAB. Neste estudo, os lipossomas continham 10 μmol de lipídios totais/mL (Tabela III).

Lipossomas compostos de PC encapsularam SAB mais eficientemente que os compostos de DSPC, na mesma razão molar, particularmente para MLV e LUV. Clarke e Stokes (1992) ao estudarem o encapsulamento de ovalbumina em MLV “fluidos” compostos de PC/CH/

TABELA III - Influência do tipo de lipossomas e do lipídio estrutural utilizado na taxa de encapsulamento da ^{99m}Tc -SAB. Os valores expressos correspondem à média±desvio padrão (n=3)

Lipídio estrutural	% de encapsulamento		
	MLV	LUV	SUV
DSPC	19,6±2,0	24,4±2,9	16,3±0,7
PC	24,6±2,2	29,8±2,2	17,0±1,3

Lipossomas multilamelar (MLV), unilamelar de grande tamanho (LUV) e unilamelar de pequeno tamanho (SUV). DSPC = Diestearoilfosfatidilcolina; PC = fosfatidilcolina de soja.

dicetilfosfato e “rígidos” compostos de dipalmitoilfosfatidilcolina/CH/dicetilfosfato, na mesma razão molar, também observaram maior eficiência de encapsulamento para os lipossomas “fluidos”. Por outro lado, o maior percentual de encapsulamento em LUV em relação à SUV ou MLV foi estatisticamente significativo e independente dos lipídios utilizados. Esses dados estão de acordo com aqueles descritos por Mayer *et al.* (1986), que mostraram que os lipossomas LUV, por possuir maior cavidade aquosa, apresentaram maior eficiência para encapsular substâncias hidrofílicas.

Com a utilização do isótopo radioativo (^{99m}Tc) a metodologia para quantificar a SAB encapsulada em lipossomas torna-se mais simples e de fácil execução, uma vez que não necessita de preparo prévio das amostras, como é comum nos métodos convencionais (Ramaldes, 1996).

Integridade estrutural e antigênica da SAB após marcação com ^{99m}Tc e após encapsulamento em lipossomas

Pesquisas utilizando anticorpos marcados com isótopos radioativos para fins de diagnóstico e terapêuticos têm despertado grande interesse pelos métodos de marcação de proteínas com o ^{99m}Tc . Diversos métodos encontram-se descritos na literatura, a maioria deles utiliza agente quelante capaz de complexar os átomos de ^{99m}Tc , para depois, então, se ligar a molécula de proteína. Embora alguns estudos biológicos tenham demonstrado resultados satisfatórios, a introdução de molécula estranha à estrutura da proteína pode modificar as suas propriedades biológicas (Eckelman, 1990). Estudos foram desenvolvidos com o objetivo de investigar a possibilidade de marcar diretamente a molécula de proteína com o ^{99m}Tc , preservando sua integridade molecular e biológica (Pauwels *et al.*, 1993).

Os nossos estudos demonstraram que tanto a ^{99m}Tc -SAB livre quanto a ^{99m}Tc -SAB encapsulada, obtidas após abertura dos lipossomas, apresentaram comportamento eletroforético e imunoletroforético semelhante à SAB não marcada com ^{99m}Tc (Figuras 1 e 2). Pela Figura 3 observa-se que a imunoglobulina anti-SAB é capaz de reagir imunologicamente tanto com ^{99m}Tc -SAB livre quanto a ^{99m}Tc -SAB encapsulada obtida após abertura dos lipossomas. Esses resultados sugerem que a marcação da SAB com ^{99m}Tc e o seu encapsulamento em lipossomas não alteraram as características estruturais e antigênicas da SAB. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores relacionados com a marcação de estruturas protéicas com átomos de tecnécio (Pauwels *et al.*, 1993).

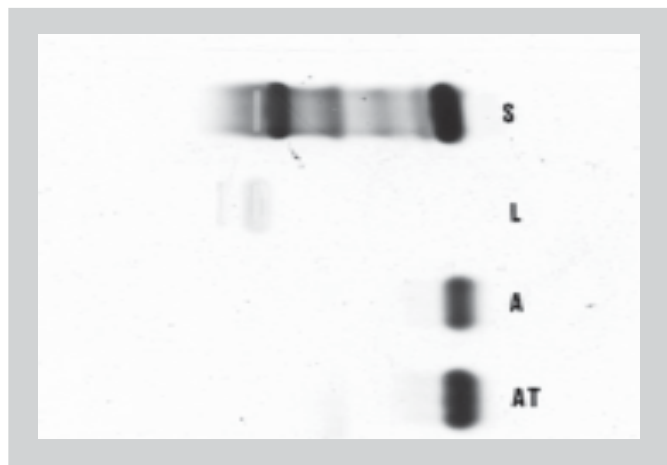


FIGURA 1 - Eletroforese em gel de agarose em tampão veronal 0,01 M pH 8,6 de soro humano total (S), lipossoma vazio (L), soro albumina bovina (A) e soro albumina bovina marcada com ^{99m}Tc (AT)



FIGURA 2 - Eletroforese em gel de agarose em tampão veronal 0,01 M pH 8,6 de soro humano total (S), lipossoma vazio (L) e lipossoma contendo soro albumina bovina marcada com ^{99m}Tc (LA)

Recentemente, experimentos realizados pelo nosso grupo (dados não publicados) mostraram que anticorpos marcados com ^{99m}Tc não perdem a sua imunorreatividade.

Captura de lipossomas de ^{99m}Tc -SAB pelas placas de Peyer de camundongos Balb/c

Até o presente, poucos estudos foram realizados no que diz respeito à captura de lipossomas pelas placas de Peyer. Nestes estudos, foram utilizados um marcador interfacial da membrana dos lipossomas (Aramaki *et al.*, 1993), um marcador fluorescente solubilizado no compartimento interno da vesícula (Tomizawa *et al.*, 1993) ou a visualização por microscopia eletrônica de partículas de ouro encapsuladas em lipossomas presentes nas placas de

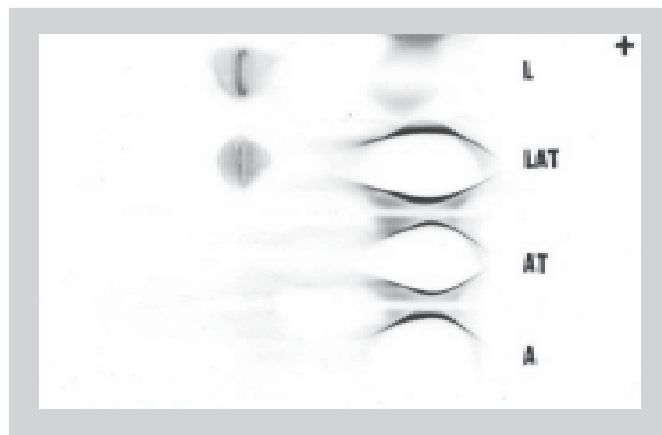


FIGURA 3 - Imunoeletroforese em gel de agarose em tampão veronal 0,01 M pH 8,6 contra soro de coelho anti-soro total bovino: lipossoma vazio (L), lipossoma contendo soro albumina bovina marcada com ^{99m}Tc (LAT), soro albumina bovina livre marcada com ^{99m}Tc (AT) e soro albumina bovina livre não marcada (A).

Peyer (Eldridge *et al.*, 1990). Entretanto, nenhum destes métodos foi capaz de demonstrar a presença e a proporção de um antígeno nas placas de Peyer.

Inicialmente, foi feita cinética da captura de ^{99m}Tc -SAB encapsulada em lipossomas pelas placas de Peyer de camundongos Balb/c utilizando SUV compostos de PC/CH/PG (razão molar 7/2/1) e com concentração de lipídios total de 10 $\mu\text{mol/mL}$. A radioatividade de ^{99m}Tc -SAB foi determinada aos 15 minutos, 30 minutos, 1, 2 e 3 horas após a administração oral (Tabela IV).

Observa-se pela Tabela IV diferença significativa do percentual de captação da ^{99m}Tc -SAB encapsulada em

TABELA IV - Percentual de captação de ^{99m}Tc -SAB encapsulada em lipossoma SUV. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n=8)

Tempo após administração oral	% de captação		p
	Placas de Peyer	Segmento controle	
15 min	6,22 \pm 1,86	6,94 \pm 2,05	NS
30 min	5,83 \pm 0,83	5,99 \pm 0,83	NS
1 hora	5,36 \pm 0,58	3,84 \pm 0,29	S
2 horas	7,34 \pm 0,43	4,10 \pm 0,35	S
3 horas	8,10 \pm 6,57	1,30 \pm 2,04	NS

S – estatisticamente significativo ($p < 0,05$); NS – não significativo ($p \geq 0,05$).

lipossoma SUV, entre as placas de Peyer e o segmento intestinal controle nos tempos de 1 e 2 horas após administração oral. Dados semelhantes foram encontrados por Aramaki *et al.* (1993) e Tomizawa *et al.* (1993), quando administraram em ratos, via oral ou intraluminal, substâncias fluorescentes encapsuladas em lipossomas. Com base nesses resultados, escolheu-se o tempo de 2 horas após a administração oral da ^{99m}Tc -SAB encapsulada em lipossomas, para os estudos subseqüentes de captação pelas placas de Peyer.

Os dados da Tabela V mostram que os lipossomas carregados negativamente, compostos de PC/CH/PG

TABELA V - Influência da composição do lipossomas unilamelares de pequeno tamanho sobre a captação de ^{99m}Tc -SAB pelas placas de Peyer 2 horas após administração oral. Os resultados foram expressos como média±desvio padrão (n=8)

Composição dos lipossomas	% de captura		p
	Placas de Peyer	Segmento controle	
PC	4,26±1,80	4,08±1,86	NS
PC/CH	6,75±0,97	6,14±1,15	NS
PC/CH/PG	7,34±0,43	4,10±0,35	S

^{99m}Tc -SAB = soroalbumina bovina marcada com ^{99m}Tc tecnécio; PC = fosfatidilcolina de soja; CH = colesterol; PG = fosfatidilglicerol; PC/CH = razão molar 8/2; PC/CH/PG = razão molar 7/2/1; S – estatisticamente significativo ($p<0,05$); NS – não significativo ($p>0,05$).

TABELA VI - Percentual de captação de ^{99m}Tc -SAB livre ou encapsulada em diversos tipos de lipossomas 2 horas após administração oral. Os resultados foram expressos como média±desvio padrão (n=8)

^{99m}Tc -SAB	Lipossomas	% de captura		p
		Placas de Peyer	Segmento controle	
Livre	-	4,30±0,64	4,26±0,48	NS
Encapsulada em PC/CH/PG, razão molar 7/2/1	SUV	7,34±0,43	4,10±0,35	S
	LUV	6,49±0,18	6,00±0,27	S
	MLV	3,85±0,37	3,54±0,37	NS
Encapsulada em DSPC/CH/PG, razão molar 7/2/1	SUV	5,50±0,34	2,89±0,33	S
	LUV	5,94±0,21	5,71±0,20	S
	MLV	4,21±0,27	3,94±0,47	NS

^{99m}Tc -SAB = soroalbumina bovina marcada com ^{99m}Tc tecnécio; PC = fosfatidilcolina de soja; CH = colesterol; PG = fosfatidilglicerol; DSPC = diestearoilfosfatidilcolina; SUV = lipossoma unilamelar de pequeno tamanho; LUV = lipossoma unilamelar de grande tamanho; MLV = lipossoma multilamelar; S – estatisticamente significativo ($p<0,05$); NS – não significativo ($p>0,05$).

numa razão molar de 7/2/1, apresentaram um significativo aumento da captação pelas placas de Peyer 2 horas após administração oral, quando comparado com o respectivo controle. Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriores de Tomizawa *et al.* (1993) e Aramaki *et al.* (1993), que também verificaram a influência da carga negativa dos lipossomas no aumento de captação de substâncias fluorescentes, neles encapsuladas, pelas placas de Peyer.

Finalmente, foi verificado se a “rigidez”, “fluidez” e o tipo de lipossoma poderiam influenciar a captura da ^{99m}Tc -SAB pelas placas de Peyer de camundongos Balb/c, 2 horas após administração oral. Neste estudo utilizou-se ^{99m}Tc -SAB livre ou encapsulada em SUV, LUV e MLV “fluidos”, compostos de PC/CH/PG (razão molar 7/2/1) ou “rígidos”, compostos de DSPC/CH/PG (razão molar 7/2/1). Para todos os lipossomas foi utilizada concentração de lipídios correspondente a 10 $\mu\text{mol/mL}$ (Tabela VI).

Pode-se verificar na Tabela VI que as ^{99m}Tc -SAB, livre e encapsulada em lipossoma MLV, não foram capturadas pelas placas de Peyer e que as ^{99m}Tc -SAB, encapsuladas em lipossomas SUV e LUV, foram capturadas independentemente da “fluidez” ou “rigidez” dos lipossomas.

A não captura pelas placas de Peyer da ^{99m}Tc -SAB livre pode estar ligada à fraca estabilidade da proteína no trato gastrointestinal ou ao estado de apresentação do antígeno às placas de Peyer, ou seja, sob a forma solúvel. De Aizpurua e Russel-Jones (1988), Neutra *et al.* (1987) e Owen (1977) observaram que antígenos particulados são melhor capturados pelas placas de Peyer que antígenos solúveis.

Apesar das ^{99m}Tc -SAB encapsuladas em lipossomas SUV e LUV “fluidos” ou “rígidos” terem sido capturadas pelas placas de Peyer, a encapsulada em lipossoma SUV “fluido” foi melhor capturada (Tabela VI). Outros autores encontraram resultados divergentes. Aramaki *et al.* (1993) observaram que lipossomas “rígidos”, contendo uma substância fluorescente encapsulada, são melhores capturados pelas placas de Peyer que lipossomas “fluidos”. A diferença dos resultados pode ser devido ao tipo de substância encapsulada nos lipossomas. Apesar da maioria dos estudos terem demonstrado que lipossomas “rígidos” são mais estáveis que os “fluidos”, deve-se considerar que estes verificaram somente o aumento da permeabilidade da membrana dos lipossomas frente aos fluidos digestivos, já que utilizaram-se lipossomas vazios (Ramaldes *et al.*, 1996a) ou a fuga de substâncias fluorescentes encapsuladas em lipossomas (Aramaki *et al.*, 1993; Rowland & Woodley, 1980). Por outro lado, Ramaldes *et al.* (1996b, 1996c) encapsularam a SAB em lipossomas “fluidos” ou “rígidos” e verificaram que a estabilidade da SAB encapsulada nos “fluidos” frente ao conteúdo gastrintestinal artificial *in vitro* foi maior. Esses autores sugeriram que existe uma relação entre a desestabilização dos lipossomas “fluidos” e uma nova organização molecular capaz de proteger o antígeno do ataque dos líquidos digestivos.

Verifica-se, ainda, na Tabela VI que o tipo de lipossomas exerceu grande importância na captura da ^{99m}Tc -SAB pelas placas de Peyer. ^{99m}Tc -SAB encapsulada em MLV não foi capturada e em SUV ou LUV foi capturada. Porém, em LUV a proporção de ^{99m}Tc -SAB capturada foi sensivelmente menor, quando comparada a encapsulada em SUV. Nenhum outro estudo até a presente data foi capaz de relacionar o tipo de lipossomas com a sua captura pelas placas de Peyer.

CONCLUSÕES

A marcação da proteína utilizada como modelo, a SAB, com ^{99m}Tc mostrou ser um método altamente sensível e que não degrada estruturalmente nem antígenicamente a proteína. Através da radioatividade do ^{99m}Tc foi possível dosar indiretamente a SAB encapsulada em lipossomas, sem a necessidade usual de preparação das amostras. Permitiu-se, também, otimizar a encapsulação da SAB em diferentes tipos de lipossomas e, também, demonstrar indiretamente a presença e a proporção da SAB nas placas de Peyer de camundongos Balb/c.

Este estudo demonstrou que a “fluidez” ou “rigidez” dos lipossomas não influencia na captura do antígeno pelas placas de Peyer após administração oral a camundon-

gos Balb/c. Os fatores principais que favorecem a captura estão ligados ao estado particular do antígeno, à presença de uma carga negativa no vetor e ao tipo de lipossomas. Concluindo, SAB encapsulada em SUV contendo carga negativa é melhor capturada que a SAB livre ou encapsulada em outros tipos de lipossomas.

Os resultados encontrados são úteis para a compreensão de parâmetros importantes para a administração oral de lipossomas contendo um antígeno e permitirão que, no futuro, possamos explorar uma nova geração de vacinas que compreendam subunidades peptídicas do agente patogênico, viabilizando a utilização segura, fácil e com estabilidade.

ABSTRACT

Uptake of liposomes by Peyer's patches following per os administration in mice

The aim of this study was to employ a model protein, the bovine serum albumin (SAB), radiolabelled with $^{99m}\text{Technetium}$ (^{99m}Tc) (^{99m}Tc -SAB) and encapsulated into liposomes, in order to determine the amount of ^{99m}Tc -SAB taken up by Peyer's patches following per os administration in mice Balb/c. The ^{99m}Tc -SAB, labelling yield of 94.9 ± 2.4 % ($n=25$), was encapsulated within multilamellar large vesicles (MLV), small unilamellar vesicles (SUV) or large unilamellar vesicles (LUV) composed of soybean phosphatidylcholine (PC); PC and cholesterol (CH) (molar ratio 8/2); PC, CH and phosphatidylglycerol (PG) (molar ratio 7/2/1) or distearoylphosphatidylcholine (DSPC), CH and PG (molar ratio 7/2/1). A gel electrophoresis and a gel immunoelectrophoresis, using a specific anti-SAB serum immunoglobulin, were employed to evaluate the integrity of SAB after labelling with ^{99m}Tc and after encapsulation into liposomes. Labelling with ^{99m}Tc and liposome encapsulation did not result in degradation of SAB. SUV-encapsulated- ^{99m}Tc -SAB was preferentially taken up by Peyer's patches. Uptake of LUV-encapsulated- ^{99m}Tc -SAB by Peyer's patches was reduced when compared with that observed for the SUV-encapsulated- ^{99m}Tc -SAB. ^{99m}Tc -SAB encapsulated into SUV composed of PC or PC/CH was not uptaken by Peyer's patches. The lipid composition (PC or DSPC/CH/PG) of SUV did not modify ^{99m}Tc -SAB uptake by Peyer's patches. In conclusion, SUV might be an effective carrier for unstable antigens administered per os to induce mucosal immune response.

UNITERMS: Liposome. Bovine serum albumin. $^{99m}\text{Technetium}$. Peyer's patches. Oral administration.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG e ao CNPq pelos recursos financeiros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAMAKI, Y., TOMIZAWA, H., HARA, T., YACHI, K., KIKUCHI, H., TSUCHIYA S. Stability of liposomes in vitro and their uptake by rat Peyer's patches following oral administration. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v.10, n.8, p.1228-1231, 1993.
- BANGHAM, A. D., STANDISH, M. M., WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellar of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.*, London, v.13, p.238-252, 1965.
- BRAYDEN, D. J. Oral vaccination in man using antigens in particles: current status. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Amsterdam, v.14, p.183-189, 2001.
- BRAYDEN, D. J., BAIRD, A. W. Microparticle vaccine approaches to stimulate mucosal immunisation. *Microbes and Infection*, Amsterdam, v.3, p.867-876, 2001.
- CHEN, H. Recent advances in mucosal vaccine development. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v.67, p.117-128, 2000.
- CLARKE, C. J., STOKES, C. R. The intestinal and serum humoral immune response of mice to systemically and orally administered antigens in liposomes: (1) The response to liposome-entrapped soluble proteins. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, Amsterdam, v.32, p.125-138, 1992.
- DE AIZPURUA, H. J., RUSSEL-JONES, G. J. Oral vaccination: identification of classes of proteins that provoke an immune response upon oral feeding. *J. Exp. Med.*, New York, v.167, p.440-451, 1988.
- DINIZ, S. O. F., RESENDE, B. M., NUNAN, E. A., SIMAL, C. J. R., CARDOSO, V. N. ^{99m}Tc-labelled *Escherichia coli*. *Appl. Radiat. Isot.*, London, v.51, p.33-36, 1999.
- ECKELMAN, W. C. Development of radiochemically pure antibodies. *Cancer Res.*, San Jose, v.50, p.780-782, 1990.
- ELDRIDGE, J. H., HAMMOND, C. J., MEULBROEK, J. A., STAAS, J. K., GILLEY, R. M., TICE, T. R. Controlled vaccine release in the gut-associated lymphoid tissues, (1) Orally administered biodegradable microspheres target the Peyer's patches. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v.11, p.205-214, 1990.
- FATTAL, E., RAMALDES, G. A., OLLIVON, M. Oral delivery of vaccines by means of liposomes. In: PUISIEUX, F., COUVREUR P., DELATTRE J., DEVISSAGUET J.-P., eds. *Liposomes*, new systems and trends in their applications. Paris: Editions de Santé, 1995. p.693-710.
- GREGORIADIS, G., DAVIS, D., DAVIES, A. Liposomes as immunological adjuvants: antigen incorporation studies. *Vaccine*, London, v.5, p.145-151, 1987.
- ISCAKIS, S., BOUVET, J. P. Human secretory immunoglobulin A and its role in mucosal defense. *Bull. Inst. Pasteur*, Paris, v.91, p.203-224, 1993.
- KILLIAN, M., MESTECKY, J., RUSSEL, M. W. Defense mechanisms involving FC-depending functions of immunoglobulin A and their subversion by immunoglobulin A proteases. *Microbiol. Rev.*, Washington, v.52, p.296-303, 1988.
- LEFEVRE, M. E., JOEL, D. D. Peyer's patch epithelium, an imperfect barrier. In: Schiller C.M., ed. *Intestinal Toxicology*. New York: Raven Press, 1984. p.45-56.
- MAZANEC, M. NEDRUD, J. G., KAETZEL, C. S., LAMM, M. E. A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense. *Immunol. Today*, London, v.14, p.430-435, 1993.
- MAYER, L. D., BALLY, M. B., HOPE, M. J. CULLIS, P. Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes. *Chem. Phys. Lipids*, Shannon, v.40, p.333-345, 1986.
- MESTECKY, J. The common mucosal immune system and current strategies for the induction of immune responses in external secretions. *J. Clin. Immunol.*, Amsterdam, v.7, p.265-276, 1987.
- NEUTRA, M. R., PHILLIPS, T. L., MAYER, E. L., FISHKING, D. J. Transport of membrane bound macromolecules by M cells in follicle-associated epithelium of rabbit Peyer's patch. *Cell Tissue Res.*, Dusseldorf, v.247, p.537-546, 1987.

- OGRA, P. L., KARZON, D. T. Formation and function of poliovirus antibody in different tissues. *Prog. Med. Virol.*, Zurich, v.13, p.156-193, 1971.
- OWEN, R. L. Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of Peyer's patch in the normal unobstructed mouse intestine. *Gastroenterology*, Bethesda, v.72, p.440-451, 1977.
- PAUWELS, E. K. J., WELLING, M. M., FEITSMA, R. I. J., ATSMAN, D. E., NIEUWENHUIZEN, W. The labeling of proteins and LDL with ^{99m}Tc : a new direct method employing KBH_4 and stannous chloride. *Nuclear Med. Biol.*, New York, n.20, n.7, p.825-833, 1993.
- RAMALDES, G. A., FATTAL, E., PUISIEUX, F., OLLIVON, M. Solubilization kinetics of phospholipid vesicles by sodium taurocholate. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, Amsterdam, v.6, p.363-371, 1996a.
- RAMALDES, G. A., DEVERRE, J. R., GROGNET, J. M., PUISIEUX, F., FATTAL, E. Use of an enzyme immunoassay for the evaluation of the entrapment efficiency and in vitro stability in intestinal fluids of liposomal bovine serum albumin. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.143, p.1-11, 1996b.
- RAMALDES, G. A., DEVERRE, J. R., GROGNET, J. M., PUISIEUX, F., OLLIVON, M., FATTAL, E. Stimulation of the mucosal immune response after oral administration of liposome-encapsulated antigen, In: COUVREUR, P., DUCHÊNE, D., KALLES, I., eds. *Minutes European Symposium on Formulation of Poorly-Available Drugs for Oral Administration*. Paris: Editions de Santé, 1996c, p. 321-325,
- RAMALDES, G. A. *Étude des potentialités des liposomes à stimuler la réponse immunitaire mucosale à point de départ intestinal*. Paris, 1996, 173 p. [Tese de doutorado em Farmacotécnica e Biofarmácia, Université de Paris XI].
- ROWLAND, R. N., WOODLEY, J. F. The stability of liposomes in vitro to pH, bile salts and pancreatic lipase. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.620, p.400-409, 1980.
- RUSSEL-JONES, G. J. Oral vaccine delivery. *J. Controlled Release*, Amsterdam, v.65, p.49-54, 2000.
- TOMIZAWA, H., ARAMAKI, Y., FUJII, Y., HARA, T., SUZUKI, N., YACHI, K., KIKUCHI, H., TSUCHIYA S. Uptake of phosphatidylserine liposomes by rats Peyer's patches following intraluminal administration. *Pharm. Res.*, Stuttgart, v.10, n.4, p.549-552, 1993.
- TROLLE, S., ANDREMONT, A., FATTAL, E. Towards a multipurpose mucosal vaccination using phosphorylcholine as a unique antigen? *S.T.P. Pharma Sciences*, Paris, v. 8, n. 1, p. 19-30, 1998.

Recebido para publicação em 05 de outubro de 2001.