

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA



ATIVIDADE ANTITUMORAL DE LECTINA DE
Cratylia mollis ENCAPSULADA EM
LIPOSSOMAS

CÉSAR AUGUSTO SOUZA DE ANDRADE

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nereide Stela Santos Magalhães

RECIFE

2003

César Augusto Souza de Andrade

**ATIVIDADE ANTITUMORAL DE LECTINA DE
Cratylia mollis ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica pela Universidade Federal
de Pernambuco

Aprovado por:

Prof. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães (Presidente)

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho, UFPE

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, UFPE

Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito, UFRN

Data: 27 / 02 / 2003.

ÍNDICE ANALÍTICO

	Página
AGRADECIMENTOS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABELAS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
INTRODUÇÃO	1
FOSFOLIPÍDIOS	1
LIPOSSOMAS	4
LECTINAS	14
OBJETIVOS	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
ARTIGO	28
CONCLUSÕES	55

Ao meu pai, *In memoriam*, José Augusto, dedico a minha vitória.

AGRADECIMENTOS

Durante o caminho de um curso encontramos diversas dificuldades. É nesses momentos que recorremos a ajuda de amigos, colegas e familiares. A estas pessoas que admiro, prezo e tenho carinho, só tenho a agradecer por ter tido o privilégio de ter contato com elas...

A Deus, por sua presença forte em alguns momentos de fraqueza, cobrindo-me com seu manto de amor...

À Profa. Dra. Nereide Magalhães que me apoiou, estando excepcionalmente em todos os momentos me orientando. Palavras não são suficientes para expressar minha sincera gratidão.

Às Profas. Dras. Tereza Correia e Luana Coelho agradeço as suas construtivas discussões.

À minha mãe, que me encaminhou desde os primeiros passos de minha vida, conduzindo-me com amor e coragem, mostrando que devemos perseguir os sonhos.

A Luciana, minha irmã, psicóloga, por fazer parte dos que me encorajaram e incentivaram nesta minha estrada, juntamente com meus dois sobrinhos Camillinha e Marcellinho que animaram meus estudos.

À minha tia Rita pelo carinho e pelo enorme apoio.

À minha avó Lúcia, que inúmeras vezes rezou pela minha paz e perseverança.

A Danielly, minha namorada, pela sua compreensão e participação, apoiando-me e sempre me incentivando a continuar.

Às Profas. Noêmia Santos e Silene Nascimento, que sem elas não seria possível a realização dos testes tumorais.

A Carmelita Cavalcanti e Mario Melo Júnior pela sua amizade e ajuda nas análises histopatológicas.

Aos estagiários Robson da Silva e Ricardo Cordeiro que muito me ajudaram nesta pesquisa.

Ao Prof. Samuel Daniel pelas fotos concedidas em seu laboratório.

Aos amigos do LIKA Roseane, Simone, Hercília, Jaqueline, Dayse, Agenor, Marcela, Daniele, Givanildo, Luciana, Raquel, Ian e Alexandre.

Aos meus amigos da turma de mestrado Val, Graça, Flávia, Heberly, Sérgio, Nadejda, Janaína, Sílvia, Kid pela amizade e por todo apoio e incentivo.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial Maria Reis, Miron e Neide.

Ao CNPq e CAPES-COFECUB pelo apoio e suporte para realização desta tese.

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 – ESTRUTURAS LIPÍDICAS	2
FIGURA 2 – MEMBRANA PLASMÁTICA	3
FIGURA 3 – MÉTODO DE PREPARAÇÃO	9
FIGURA 4 – FOTOGRAFIA DO FEIJÃO CAMARATU	16
FIGURA 5 – MODELO DE MONÔMERO	16
FIGURA 6 – LIGAÇÃO DE CARBOIDRATOS	19

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 – PRINCIPAIS FOSFOLIPÍDIOS	1
TABELA 2 – VARIEDADES DE LIPOSSOMAS	5
TABELA 3 – MÉTODOS DE PREPARAÇÃO	10

RESUMO

O presente trabalho investiga o perfil de cinética de liberação *in vitro* e atividade antitumoral *in vivo* dos lipossomas contendo lectina de *Cratylia mollis* (Cra). Os lipossomas foram preparados de acordo com o método de formação de filmes finos. Um estudo prévio foi realizado para avaliar o efeito das condições de preparação dos lipossomas na atividade hemaglutinante da Cra. A caracterização físico-química e estabilidade a longo-prazo de lipossomas contendo Cra foram também realizados. Os lipossomas selecionados foram compostos de fosfatidilcolina, colesterol e estearilamina na proporção molar de 7:2:1. Os ensaios da cinética *in vitro* da Cra encapsulada em lipossomas foram realizados pela técnica de ultrafiltração-ultracentrifugação. A atividade antitumoral de Cra-lipossomas foi investigada contra o Sarcoma-180. Os animais foram tratados com lipossomas contendo Cra e as análises histopatológicas do tumor, fígado e rins foram avaliados após o tratamento. Os resultados demonstraram que lipossomas contendo Cra conseguiram uma taxa de encapsulação de 84% e uma inibição do tumor de 71%. A análise histopatológica revelou que a encapsulação da Cra em lipossomas protege o fígado e os rins do infiltrado linfocitário e reduz as áreas de necrose nos tumores tratados. A encapsulação da Cra-lectina em lipossomas é, portanto, oferecida como uma possibilidade para reduzir a toxicidade tecidual e aumentar a atividade antitumoral da proteína.

ABSTRACT

The present work investigates the *in vitro* kinetic profile and the *in vivo* antitumoral activity of liposomes containing *Cratylia mollis* lectin (Cra). Liposomes were prepared according to the thin film formed method. A previous study was undertaken to evaluate the effect of liposomes preparation conditions on Cra hemmaglutinating activity. Physicochemical characterization and long-term stability of Cra-loaded liposomes were also carried out. Liposomes selected were composed of phosphatidylcholine , cholesterol and stearylamine in the molar ratio of 7:2:1. *In vitro* kinetics assays of encapsulated Cra were performed by ultrafiltration-ultracentrifugation technique. Cra antitumoral activity was investigated against Sarcoma-180. Animals were treated with Cra-loaded liposomes and histopatological analysis of tumor, liver and kidneys were carried out after treatment. Results demonstrated that Cra-loaded liposomes achieve 84% encapsulation ratio and 71% tumor inhibition. Histopathological analysis revealed that encapsulation of Cra into liposomes protects liver and kidney from limphocitary infiltration and reduces necrosis areas on treated tumors. Encapsulation of Cra lectin into liposomes is, therefore, offered as an issue to reduce tissue toxicity and improve antitumoral activity of such protein.

INTRODUÇÃO

1. FOSFOLIPÍDIO

Os fosfolipídios são substâncias orgânicas oleosas ou gordurosas, insolúveis em água, extraídas das células e tecidos por solventes não polares como o clorofórmio ou o éter. Os fosfolipídios mais abundantes são as gorduras ou triacilgliceróis, que são os principais combustíveis da maioria dos organismos e as formas mais importantes de armazenamento de energia química (Lehninger *et al.*, 2000).

Existem várias classes de fosfolipídios (Tabela 1) e cada uma possui funções biológicas específicas, entretanto o interesse deste estudo se volta para uma outra classe de fosfolipídios: os fosfolipídios polares, que são os principais componentes das membranas celulares (Fattal *et al.*, 1993).

Tabela 1 – Principais fosfolipídios, agrupados de acordo com a estrutura química (Fattal *et al.*, 1993).

Triacilgliceróis

Ceras

Fosfoglicerídeos

Fosfatidiletanolamina

Fosfatidilcolina

Fosfatidilserina

Fosfatidilinositol

Cardiolipina

Esfingofosfolipídios

Esfingomiéline

Cerebrósídeos

Gangliosídeos

Esteróis e seus Ésteres de Ácidos Graxos

Os fosfolipídios polares são anfipáticos (molécula que possui uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica) onde em sistemas aquosos eles espontaneamente se dispersam formando micelas, na qual a orientação de suas regiões hidrofóbica e hidrofílica direciona seu posicionamento nas bicamadas de membrana.

1.2. Sistemas Fosfolipídio-Água

Em presença da água um grande número de anfífilos se organiza espontaneamente, entre eles estão os glicerosfosfolipídios, esfingofosfolipídios e esteróis (Lehninger *et al.*, 2000). Quando dispersos em água, estes fosfolipídios formam agregados microscópicos, as moléculas dispõem-se juntas, com as porções hidrofóbicas em contato umas com as outras, e seus grupos hidrofílicos interagindo com a água circundante. Esta conformação reduz a quantidade de superfície hidrofóbica exposta à

água. As interações hidrofóbicas entre as moléculas lipídicas fornecem uma força termodinâmica para a formação e manutenção das vesículas (Lehninger *et al.*, 2000). Dependendo de condições precisas e da natureza dos fosfolipídios utilizados três tipos de agregados lipídicos podem se formar quando fosfolipídios anfifílicos são misturados com água, são eles:

> Micelas \Rightarrow fosfolipídio polares quando em sistemas aquosos espontaneamente se dispersam formando micelas, onde as caudas hidrocarbonadas dos fosfolipídios ficam protegidos do ambiente aquoso e as cabeças hidrofílicas, eletricamente carregadas, são expostas na superfície voltadas para o meio aquoso (Fig. 1) (Lehninger *et al.*, 2000). Tais micelas podem conter milhares de moléculas de fosfolipídios. Os fosfolipídios polares também se espalham espontaneamente na superfície das soluções aquosas formando uma monocamada. Neste sistema, as caudas hidrocarbonadas são expostas ao ar, evitando desta forma a água, e as cabeças hidrofílicas se estendem na fase polar aquosa.

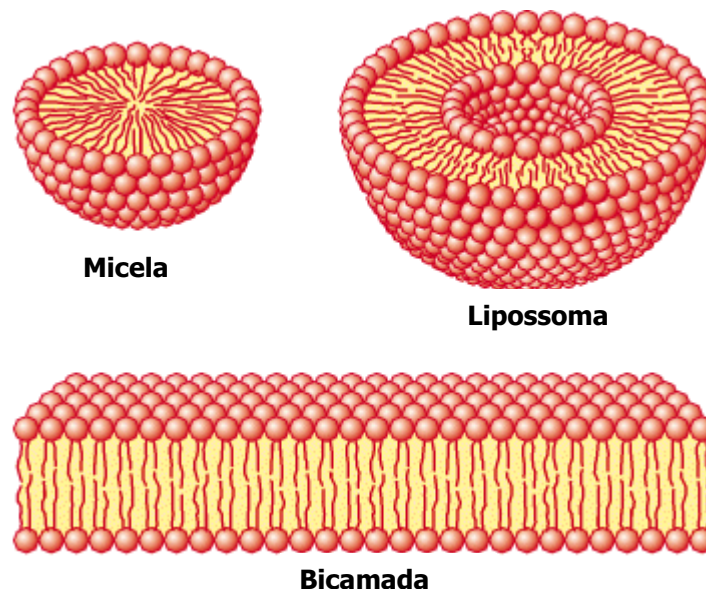


Figura 1 – Estruturas lipídicas: micelas, bicamadas e lipossomas (<http://www.cu.lu/labext/rcms/cppe/membrane/manalipi.html>).

> Bicamadas \Rightarrow os fosfolipídios polares também formam, rápida e espontaneamente, bicamadas muito finas que separam dois compartimentos aquosos (Fig. 1). Nestas estruturas, as caudas hidrocarbonadas das moléculas dos fosfolipídios se estendem para o interior das duas superfícies, formando uma base interna hidrocarbonada, e as cabeças hidrofílicas se voltam para fora, estendendo-se para as fases aquosas. As bicamadas de fosfolipídio têm cerca de 6 a 7 nm de espessura, dependendo da natureza dos ácidos graxos nos fosfolipídios. Elas são fluidas, não-rígidas e muito flexíveis. As bicamadas de fosfolipídio podem também ser formadas em pequenas aberturas separando dois compartimentos aquosos (Lehninger *et al.*, 2000).

> Lipossomas \Rightarrow no laboratório, tais bicamadas são facilmente formadas, agitando-se com alta frequência os fosfolípidios em suspensões aquosas, um processo que resulta na formação dos lipossomas (Fig. 1), vesículas fechadas, formadas por uma bicamada contínua de fosfolípidios (Lehninger *et al.*, 2000).

Tais bicamadas e os lipossomas têm sido estudados intensamente, pois suas propriedades são muito semelhantes àquelas das membranas naturais. Por exemplo, as bicamadas de fosfolípidios e as membranas naturais possuem alta resistência elétrica; elas permitem que a água passe facilmente, mas não permitem a passagem de cátions ou ânions.

As bicamadas são estruturas mais rígidas que as micelas, embora ambos sejam sistemas altamente dinâmicos, havendo constantes intercâmbios entre os monômeros fosfolípidicos em solução e aqueles que fazem parte da estrutura. Esta rigidez pode ser avaliada pelo tempo de troca de monômeros entre os agregados e a solução, que é da ordem de mili-segundos para micelas e várias horas para bicamadas de fosfolípidio (Ridout *et al.*, 1988).

1.3. Fosfolípidio e Membrana Plasmática

A partir dos resultados químicos, das evidências da microscopia eletrônica e da semelhança nas propriedades das membranas naturais com as bicamadas de fosfolípidios sintéticos, Singer e Nicholson (1972) postularam uma teoria unificadora da estrutura de membrana chamada de modelo do mosaico fluido (Fig. 2). De acordo com o modelo de mosaico-fluido de Singer e Nicholson, a matriz da membrana biológica é uma bicamada de glicofosfolípidios na qual proteínas estão incorporadas em sua superfície ou em seu interior (Singer e Nicholson, 1972).

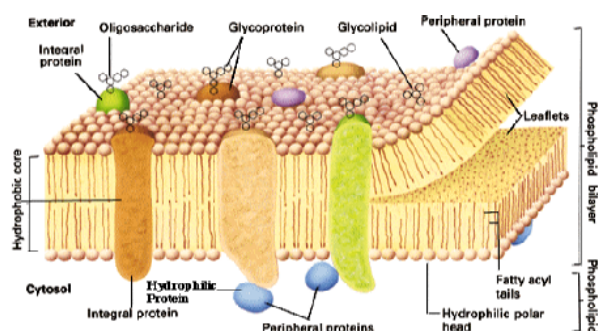


Figura 2 – Membrana Plasmática (Mosaico Fluido) (<http://ntri.tamuk.edu/homepage-ntri/lectures/protein/membranes.html>).

A membrana age como uma barreira semipermeável. Esta permeabilidade passiva depende do grau de organização da bicamada, o qual depende do comprimento da cadeia hidrocarbonada dos fosfolípidios, posição e número de duplas ligações, quantidade de colesterol, proteínas e temperatura (Fendler, 1982). O modelo de mosaico

fluido propõe que as proteínas integrais da membrana possuam grupos de aminoácidos hidrofóbicos na sua superfície, o que forçaria tais proteínas a se “dissolverem” na porção hidrofóbica central da bicamada. Por outro lado, o modelo propõe que as proteínas periféricas ou extrínsecas das membranas tenham essencialmente os seus grupos hidrofílicos na sua superfície, ligados por atração eletrostática às cabeças polares eletricamente carregadas dos fosfolipídios da bicamada. As proteínas integrais da membrana, que incluem as enzimas e os sistemas de transporte, são inativas a menos que sejam colocadas dentro da base hidrofóbica da bicamada, o que produz a conformação tridimensional apropriada para a sua atividade (Fendler, 1982).

2. LIPOSSOMAS

Atribui-se a Weissman (1965) o termo lipossoma (do grego lipos = gordura + soma = corpo), muito embora, e com a antecedência de apenas alguns meses, Bangham já os tivesse produzido experimentalmente (Prista, *et al.*, 1995). O Dr. Alec Bangham, no início dos anos 60, em Cambridge, estudou a hidratação de filmes lipídicos depositados nas paredes de um frasco de vidro, e observou que moléculas lipídicas se organizavam em bicamadas de maneira a formar estruturas vesiculares, com um compartimento aquoso no seu interior. Tais estruturas microscópicas foram denominadas de lipossomas (Lasic, 1989).

A importância de lipossomas como modelo de membranas biológicas deriva do fato de que eles são constituídos por elementos capazes de formar bicamada idêntica à membrana natural. A similaridade entre lipossomas e membranas biológicas pode ser aumentada por modificações químicas na membrana dos lipossomas, possibilitando sua exploração em áreas como direcionamento de fármacos (Gregoriadis, 1973; Chonn e Cullis, 1998) ou modulação imune *in vivo* e *in vitro* (Meyenburg *et al.*, 2000). A habilidade de imitar a conduta das membranas biológicas pelo mesmo caminho torna os lipossomas seguros e eficazes como veículos para aplicação terapêutica (Forssen e Willis, 1998). O maior interesse de lipossomas como carreadores de medicamentos ou substâncias biologicamente ativas, consiste na capacidade de incorporação tanto de agentes lipofílicos, na membrana fosfolipídica (Iwamoto e Sunamoto, 1982), quanto compostos hidrofílicos, na cavidade aquosa (Brandl e Gregoriadis, 1994) ou espaços interlamelares.

Lipossomas são pequenas vesículas esféricas com diâmetros variando de alguns nanômetros a poucos micrometros (sempre > 25nm), constituídos principalmente por fosfolipídio e outros componentes da membrana celular, os quais, quando em presença da água, originam camadas moleculares duplas que, por sua vez, formam estruturas mono ou policompartimentais (Prista *et al.*, 1995).

Uma definição mais detalhada distingue entre vesículas grandes e pequenas no que se pode chamar de classificação dos lipossomas (Puisieux, 1983; Scarpa *et al.*, 1998).

> Lipossomas Multilamelares (MLV – Multilamellar Vesicles) ⇒ são lipossomas formados por várias bicamadas concêntricas, intercaladas por compartimentos aquosos. Seu diâmetro é variável de acordo com o número de lamelas, podendo ir de 400 a 3500 nm.

> Lipossomas Grandes Unilamelares (LUV – Large Unilamellar Vesicles) ⇒ são também constituídos por apenas uma bicamada, mas com uma grande cavidade aquosa. Seu diâmetro varia de 200 a 1000 nm.

> Lipossomas Pequenos Unilamelares (SUV – Small Unilamellar Vesicles) ⇒ são os menores lipossomas possíveis de serem obtidos, constituídos por apenas uma bicamada como membrana e um pequeno compartimento aquoso. Seu diâmetro varia de 20 a 50 nm.

Tabela 2 – Classificação de Lipossomas: diâmetros médios e volume susceptível de microencapsulação (Lasic, 1989)

Tipos de Lipossomas	Diâmetro (nm)	Volume Encapsulado (µl/mg de fosfolípido)
SUV	20 – 50	0,5
LUV	200 – 1000	13,7
MLV	400-3500	4,1

Weiner *et al.* (1989) ainda descrevem outros três tipos de lipossomas:

> Lipossomas obtidos por evaporação em fase reversa (Reverse Phase Evaporation: REV) ⇒ são lipossomas do tipo LUV, com diâmetro médio de 500 nm.

> Lipossomas obtidos por extrusão em uma célula de pressão “French Pressure Cell” (French Pressure Vesicles: FPV) ⇒ são lipossomas do tipo SUV, com diâmetro médio de 50 nm.

> Lipossomas obtidos por injeção de éter (Ether Injection Vesicles: EIV) ⇒ são também do tipo SUV, com diâmetro médio de 20 nm.

2.1. Aplicações

Nas últimas décadas, numerosos estudos demonstraram que a distribuição de um fármaco no organismo pode ser modificada pelo uso de vetores medicamentosos coloidais ou partículas poliméricas. Estes carreadores protegem certos princípios ativos lábeis da degradação e/ou inativação pelo suco gástrico, melhoram a biodisponibilidade por aumento da penetração celular de substâncias hidrófilas e proporcionam a liberação de fármacos no sítio de ação desejado (órgão, tecido ou célula), eliminando ou

minimizando os efeitos colaterais que normalmente acompanham a terapêutica convencional (New, 1990; Lasic, 1992; Vidal, 1993). A compreensão dos processos físicos e químicos e dos parâmetros que determinam a estabilidade e o comportamento das bicamadas fosfolipídicas é de fundamental importância no estudo dos mecanismos biológicos, suas disfunções e ainda no processo de evolução da vida. As propriedades físico-químicas têm demonstrado afetar significativamente a estabilidade e farmacocinética de lipossomas (Senior, 1987).

Além de seu papel na compreensão das bases químicas e físicas da vida, os lipossomas são importantes em várias e diferentes áreas da ciência e tecnologia. Em pesquisa básica, biofísica e em físico-química os lipossomas são usados como sistemas modelo para o estudo de biomembranas e suas propriedades tais como permeabilidade em função da composição química da membrana, presença de várias moléculas/ions, fusão de membranas/células, etc. (Lasic, 1992). Lipossomas têm sido usados como veículos para estabilização de fármacos, vencendo barreiras para a captação celular e tecidual, e para direcionamento de seus conteúdos para sítios específicos *in vivo* (Forssen e Willis, 1998). Em bioquímica, os lipossomas possibilitam aos cientistas reconstituir e investigar proteínas de membrana em um ambiente bem definido que mimetiza fielmente o natural (Lasic, 1992).

Lipossomas são também usados como suporte para catalisadores, especialmente partículas semicondutoras e em aplicações tais como fotoconversão da energia solar (Lasic, 1992). Muitas são as aplicações clínicas dos lipossomas, pretendendo-se em geral atingir especificamente um alvo terapêutico, seja ele órgão, tecido ou célula, o que pode permitir redução posológica e diminuição mais ou menos acentuada da toxicidade. Assim, empregam-se lipossomas para veicular agentes citostáticos, anti-víricos, antiparasitários, hormônios diversos, antifúngicos, enzimas, vacinas e, até, material genético (Gregoriadis, 1990; Antimisiaris, 1993; Prista *et al.*, 1995). Os lipossomas têm sido considerados uma enorme promessa para serem usados como carreadores farmacêuticos *in vivo* e o caminho a ser seguido é a prática clínica (Torchilin *et al.*, 2001).

Lipossomas também têm sua utilidade nas indústrias alimentícia e cosmética, tornando possível transformar moléculas não hidrossolúveis em formulações à base de água com lipossomas. No campo das aplicações farmacêuticas vários produtos estão sob investigação, incluindo imunomoduladores, agentes diagnósticos e terapêuticos para câncer, antibióticos, produtos oftálmicos, antiasmáticos, antifúngicos, vacinas, promotores do crescimento capilar e protetores gástricos (Lasic, 1992). Substâncias eminentemente tóxicas, como a anfotericina B e a nistatina (antifúngicos), derivadas do antimônio pentavalente (antiparasitários usados, por exemplo, no tratamento da Leishmaniose), doxorubicina e daunorubicina (citostáticos cardiotóxicos), vidarabina

(anti-viral com certa especificidade para o vírus da hepatite B), têm sido utilizados em lipossomas, ao lado de antibióticos, como a gentamicina e a ampicilina (terapêutica celular localizada), produtos de radiocontraste, como ¹¹¹Índio, e muramiltripeptídeo (ativador de macrófagos tumoricidas, etc.) (Prista *et al.*, 1995).

Os sistemas coloidais de liberação controlada de drogas oferecem diversas vantagens com relação às formas de dosagens convencionais: devido ao reduzido tamanho das partículas, as preparações coloidais prestam-se à administração parenteral e podem ser úteis para liberação controlada do princípio ativo em órgãos específicos ou sítios alvos do organismo. O direcionamento da substância biologicamente ativa ao sítio de ação desejado poderá não somente melhorar a eficiência terapêutica, como também permitir a redução da quantidade de droga a ser administrada para obtenção da resposta (Magenhein e Benita, 1991; Schuber e Frisch, 1993). As vantagens da encapsulação em lipossomas podem ser classificadas em quatro categorias:

- > Solubilização do fármaco;
- > Liberação controlada;
- > Captura pelo sistema retículo endotelial;
- > Vetorização a sítios específicos.

As principais desvantagens do ponto de vista farmacológico são um possível extravasamento, remoção pelas células do sistema retículo endotelial (no caso de a captura não ser favorável), degradação no trato gastro intestinal, e do ponto de vista tecnológico estabilidade, reprodutibilidade e produção em larga escala (Lasic, 1992).

Os fosfolipídios estão presentes nas membranas e são ativos em interfaces aquosas, diminuindo a tensão superficial de superfícies aquosas, possuindo característica estrutural única com distintas regiões hidrofóbica e hidrofílica (anfipáticas). Estruturalmente as duas regiões são apenas uma pequena das propriedades únicas das duas regiões que são distintamente separadas (Hair, 1971). Devido às características dos seus constituintes as membranas dos lipossomas são membranas semipermeáveis, assim como as membranas celulares, através das quais a difusão de moléculas e íons varia consideravelmente. Prótons e íons hidroxila cruzam a membrana com certa rapidez, possivelmente como resultado da transferência de pontes de hidrogênio entre as moléculas de água, enquanto que, íons sódio e potássio atravessam a membrana muito lentamente, assim como ânions cloreto e nitrito. Para moléculas com alta solubilidade em ambos os meios orgânico e aquoso, uma membrana fosfolipídica representa uma barreira bastante tênue, por outro lado, solutos polares como a glicose, e compostos de alto peso molecular passam através da membrana muito lentamente.

Uma diferença na concentração de soluto entre os dois lados da membrana pode gerar uma pressão osmótica a qual levará ao acúmulo de moléculas de água (por ser a espécie de difusão mais rápida) em um dos lados. Podendo em alguns casos, quando a

concentração do tampão for inferior a concentração intra-lipossomal, a pressão gerada ser suficiente para romper a membrana completamente, levando à perda total de seu conteúdo na fase externa, após o que os fragmentos da bicamada voltam a se unir formando novas vesículas (New, 1990).

2.3. Métodos de Preparação

O ponto chave a ser alcançado na preparação de lipossomas é formar espontaneamente membranas como resultado de interações desfavoráveis entre fosfolípido e água. No entanto, a ênfase na fabricação de lipossomas não é a formação de membranas de modo aleatório, mas obter membranas que formem vesículas de estrutura e tamanho corretos, e encapsular fármacos ou substâncias biologicamente ativas com alta eficiência (New, 1990). Os métodos de preparação dos lipossomas são numerosos e levam a formação de vários tipos de vesículas que diferem entre si pelo tamanho, estrutura e capacidade de encapsulação. De acordo com o método utilizado é possível obter vesículas do tipo multi ou unilamelares (Fattal *et al.*, 1993).

Em seu artigo de revisão sobre o mecanismo de formação das vesículas, Lasic (1988) ressalta a influência da energia sobre a formação dos vários tipos de vesículas. Devido à pequena energia necessária, MLV formam-se espontaneamente quando o filme fosfolipídico é hidratado em excesso de água ou tampão. Entretanto, LUV e SUV possuem maior energia livre, e, portanto deve haver a dissipação de alguma forma de energia no sistema para obtê-los.

Todos os métodos de preparação dos lipossomas envolvem algumas etapas semelhantes (Lasic, 1992) (Fig. 3) que são:

1. Dissolução dos fosfolípidios em um solvente orgânico;
2. Evaporação do solvente orgânico;
3. Dispersão dos fosfolípidios secos em uma solução aquosa;
4. Dissolução da substância a encapsular na solução orgânica ou na solução aquosa, em função de seu equilíbrio hidrófilo/lipófilo;
5. Eliminação das substâncias não encapsuladas através de técnicas de separação: filtração em gel, diálise, centrifugação;
6. Análise do produto final.

As características que mais refletem as variações decorrentes dos diferentes métodos são aquelas relacionadas a encapsulação de substâncias pelas vesículas. A eficácia de encapsulação pode ser expressa de várias maneiras (Fattal *et al.*, 1993):

> A porcentagem ou taxa de encapsulação corresponde à proporção de soluto associada aos lipossomas em relação à quantidade inicialmente encontrada no meio.

> A massa de substância encapsulada por unidade de massa de fosfolípido corresponde à quantidade de soluto encapsulado ($\mu\text{g}/\text{mol}$ ou em $\mu\text{g}/\text{mg}$).

> O volume aquoso encapsulado corresponde ao volume ou à massa de fase aquosa encapsulada por unidade de massa de fosfolipídio ($\mu\text{l}/\mu\text{mol}$).

Os principais métodos de preparações de lipossomas e suas características estão citados na Tabela 3.

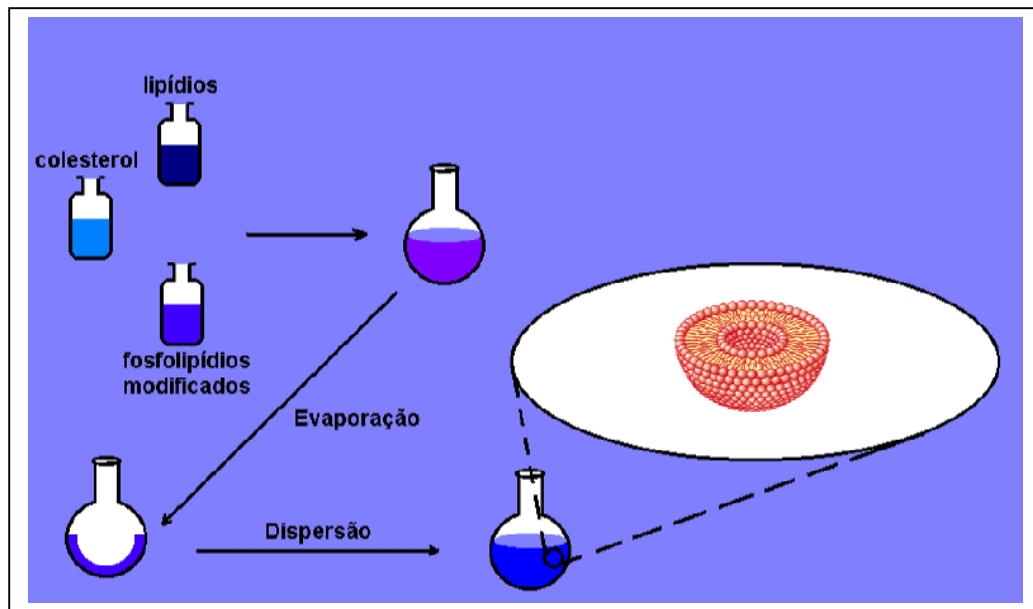


Figura 3 – Etapas comuns a todos os métodos de preparação de lipossomas (New, 1990).

Tabela 3 – Principais características dos diferentes métodos de preparação de lipossomas (Fattal et al., 1993, Hauser, 1982).

Método de Preparação	Estrutura	Eficácia de Encapsulação (%)	Vantagens	Desvantagens
Hidratação de filme lipídico	MLV	9-27	Simple, rápido	Baixas taxas de encapsulação, tamanho heterogêneo, não adaptável à produção industrial.
Extrusão por “French Pressure Cell”	SUV	5-25	Simple, reprodutível, não agressiva, permite utilizar concentrações elevadas de fosfolípidios, altas taxas de encapsulação, adaptável à indústria	Difícil manutenção do aparelho, necessita de preparação prévia de MLV, baixos volumes de encapsulação.
Extrusão por filtros de polycarbonato	0,1µm: SUV	5 – 30	Rápido e reprodutível, tamanho homogêneo, permite utilizar altas concentrações de fosfolípidios, altas taxas de encapsulação, lipossomas de diferentes tamanho de acordo com o filtro utilizado.	Necessita da preparação prévia de MLV, útil apenas para pequenos volumes.
	0,2 a 1µm: MLV	15-60		
Microfluidização	SUV	5-78	Permite obter altas taxas de encapsulação, adaptável à produção industrial.	Difícil manutenção do aparelho requer a preparação prévia de MLV.
Injeção de etanol	SUV	0,5	Tamanho homogêneo, simples, rápido, adaptável à indústria.	Taxa de encapsulação baixa.
Evaporação de fase reversa	LUV	30-68	Volume e taxa de encapsulação elevados.	Materiais expostos a ultrasons e solventes. Técnica complexa, limite de solubilidade dos fosfolípidios na fase orgânica, não adaptável à indústria.
Infusão de éter	LUV	2	Volume de encapsulação elevado, adaptável à produção industrial.	Taxa de encapsulação baixa, materiais expostos a solventes e a temperatura elevadas, tamanho heterogêneo.
Liofilização / Reidratação	MLV	26-72	Taxa de encapsulação elevada, simples e não agressivo, adaptável à produção industrial, permite conservar a preparação.	Tamanho heterogêneo, necessita a preparação prévia de SUV.
Congelamento / Descongelamento (SUV)	LUV	25-30	Processo simples e rápido.	Requer a preparação prévia de SUV, difícil de realizar em presença de fosfolípido neutros, e de altas concentrações de íons ou de cátions divalentes.
Congelamento / Descongelamento (MLV)	MLV	31-89	Taxa de encapsulação elevada, processo rápido.	Necessita de preparação previa de SUV
Remoção do detergente	LUV	12	Tamanho homogêneo, condições de encapsulação brandas.	Taxa de encapsulação geralmente baixa, processo demorado, dificuldades na eliminação do detergente.
	SUV	--		

2.4. Estabilidade dos Lipossomas

A estabilidade de um produto farmacêutico é definida como a capacidade de uma formulação permanecer dentro de certos limites estabelecidos em relação às suas características químicas, físicas e microbiológicas. Um estudo da estabilidade consiste genericamente de duas partes:

1. Caracterizar a preparação;
2. Estabilidade do produto durante o armazenamento.

Em seu trabalho Maierhofer (1988) publicou um protocolo desenvolvido por Weiner, que visa provar a estabilidade dos lipossomas. Segundo este protocolo, preparação deve ser submetida às seguintes situações:

1. Um mês a 45°C.
2. Um mês a 4°C.
3. Seis meses a 37°C.
4. De 12 a 24 meses à temperatura ambiente.
5. De 12 a 24 meses a diversos graus de umidade e intensidade de luz.
6. Dois ou três ciclos de “congelamento/descongelamento” (5°C ⇔ 25°C).
7. Seis a oito ciclos de “aquecimento/resfriamento” (5°C ⇔ 45°C, 48 horas a cada temperatura).
8. De 24 a 48 horas em um agitador a 60 ciclos/minuto.

Em cada um a destas situações, é importante observar os seguintes dados (De Oliveira Pontes *et al.*, 1999):

1. Observações visuais e microscópicas, verificação de floculações, etc.
2. Perfil de tamanho das partículas.
3. Perfil reológico.
4. Estabilidade química.
5. Perda de material encapsulado.

2.5. Utilidade terapêutica dos lipossomas

Os lipossomas têm mostrado um grande potencial como sistemas para a administração de fármacos. Uma grande variedade de moléculas, incluindo peptídeos e proteínas, tem sido incorporada a lipossomas, os quais podem ser administrados por diferentes vias (Weiner *et al.*, 1989). Segundo Maierhofer (1988) a utilização de lipossomas como transportadores para a liberação controlada apresenta as seguintes vantagens:

1. Os lipossomas podem ser programados para a liberação controlada de fármacos durante um período prolongado de tempo.

2. Os lipossomas têm uma tendência natural a ligar-se a determinados tipos de tecidos e células.
3. Os lipossomas são quimicamente similares a outras células que circulam no sangue, de modo que são biologicamente compatíveis com outras células e também fáceis de serem metabolizados pelo organismo.
4. Os lipossomas conjugados com anticorpos se ligam às células alvo com maior avidade que a forma solúvel destes mesmos anticorpos.
5. Os lipossomas se apresentam como um método útil para proteger produtos lábeis biologicamente ativos, como proteínas e peptídeos, frente à sua inativação ou degradação no organismo.

Lipossomas conjugados a proteínas são muito utilizados como vetores de fármacos, principalmente por causa do seu potencial uso como sistema de liberação controlada de drogas e aplicação na área de diagnóstico (Kompella e Lee, 2001; Yamazaki *et al.*, 2000; Bendas *et al.*, 1997). Como exemplo clássico de proteínas conjugadas a lipossomas, temos os anticorpos, muito embora a técnica de conjugação de proteínas a lipossomas possa ser aplicada a diversas outras proteínas tais como, proteína A de *Staphylococcus aureus*, lectinas de plantas e enzimas (New, 1990).

Grandes esforços têm sido feitos para desenvolver formulações que possuam a capacidade de manter a estabilidade das proteínas e prolongar sua atividade biológica após a aplicação (Meyenburg *et al.*, 2000).

O conceito de uma “cápsula mágica”, que seria um lipossoma com alta seletividade pelos tecidos doentes, aumentando excepcionalmente a eficácia do fármaco e eliminando seus efeitos colaterais não parece ser tão simples de alcançar, pelo menos não é esta a expectativa para um futuro próximo. Entretanto, sem dúvida os lipossomas aumentam a eficiência dos tratamentos em vários casos (Lasic, 1989). No entanto, algumas preparações de lipossomas têm um tempo de circulação no sangue diminuído devido à rápida captação pelo Sistema Retículo Endotelial (SRE) (Daleke *et al.*, 1990; Meyenburg *et al.*, 2000), devido ao reconhecimento dos lipossomas pelo Sistema Imunológico e sua remoção da circulação através da ligação com as opsoninas e ação do Sistema Complemento, levando a sua captura e posterior lise. Para torná-los “invisíveis” às células fagocitárias recobre-se os lipossomas com polímeros (Torchilin *et al.*, 2001), denominados lipossomas Stealth[®]. Lipossomas deste tipo mostraram-se capazes de aumentar a meia-vida plasmática em até 60 vezes, além de possuírem a capacidade de funcionar como microreservatórios do fármaco na circulação, possibilitando reduzir a frequência de doses (Woodle *et al.*, 1992).

Para a administração de medicamentos hidrofílicos em lipossomas é conveniente escolher lipossomas unilamelares, nos quais a cavidade aquosa é significativamente maior. Para o transporte de fármacos hidrofóbicos, que se incluem na parede

fosfolipídica do lipossoma, a presença de várias membranas (lipossomas multilamelares) permite administrar a substância ativa em maior quantidade (Lasic, 1989).

2.5.1. Vias de Administração

As aplicações terapêuticas dos lipossomas utilizam quase todas as vias de administração. A via de administração mais freqüente é a injeção intravenosa. Podem também ser administrados pelas vias intraarterial, subcutânea, intramuscular, oral, tópica ou nasal (Lasic, 1992). Infelizmente, os usos clínicos de lipossomas que são normalmente administrados intravenosamente possuem alguns problemas. A interação de lipossomas com lipoproteínas de alta densidade tem aumentado a permeabilidade dos lipossomas que pode levar a uma liberação prematura dos solutos encapsulados (Gregoriadis, 1995; Lasic, 1998).

Tipos de aplicações:

- > Intravenosa (Maierhofer, 1988);
- > Intraperitoneal (Maierhofer, 1988);
- > Subcutânea (Devissaguet *et al.*, 1993);
- > Tópica (Lasic and Mertin, 1989);
- > Oral (Maierhofer, 1988);
- > Nasal (Maierhofer, 1988);
- > Intramuscular (Arrowsmith, 1984);
- > Intralinfática (Devissaguet and Puiseux, 1993);
- > Intra-articular (Devissaguet and Puiseux, 1993).

2.5.2. Interação Lipossoma-Célula

A interação lipossoma-célula depende de variados fatores, como a dimensão, composição e carga elétrica das vesículas, tal como das características específicas das células e, ainda, das propriedades físico-químicas do fármaco vetorizado. Agrupam-se em quatro processos o sistema de abordagem dos lipossomas às células (New, 1990):

- > Adsorção \Rightarrow o lipossoma é fixado na célula (forças físicas de atração, estabelecimento de ligações entre a membrana das vesículas e receptores celulares, etc.) libertando lentamente para o espaço extracelular o seu conteúdo que vai penetrando na célula.
- > Endocitose \Rightarrow processo pelo qual as células interiorizam variados produtos, como os próprios alimentos que necessitam. São os monócitos, macrófagos e outras células brancas sangüíneas que promovem a endocitose dos lipossomas, os quais são fixados em estruturas vacuolares, ditas fagossomas, só depois disso havendo liberação dos fármacos que veiculam. A captação das partículas pelos macrófagos é dependente do tamanho da vesícula.

> Transferência Lipídica ⇒ passagem de fosfolipídios através das membranas celulares, parecendo que no processo intervém uma proteína, já que este é interrompido pela presença de tripsina. Como se compreende, por este processo não há qualquer transferência da parte aquosa lipossômica para a célula, mas em compensação a maioria dos fármacos lipófilos transita livremente.

> Fusão ⇒ neste processo os fosfolipídios dos lipossomas fundem-se à membrana, e passam a fazer parte da mesma. Admite-se que raramente ocorra *in vivo*, a não ser quando os lipossomas contenham substâncias fusogênicas na sua composição, como as associações de fosfolipídio aos polietilenoglicóis (New, 1990).

3. LECTINAS

O termo “lectina” (do latim *legere*, pegar, escolher) foi primeiro empregado por Boyd e Shapleigh, em 1954, para descrever aglutininas grupo sanguíneo-específicas encontradas em sementes e outras partes de determinadas plantas. Atualmente, esse termo se refere a uma classe de proteínas de origem não imunológica, largamente distribuídas na natureza podendo originar-se de plantas e bactérias que aglutinam células, precipitam polissacarídeos ou glicoconjugados (Liener *et al.*, 1986) e possuindo estruturas similares ou distintas (Correia e Coelho, 1995; Tavares *et al.*, 1996), e que reconhecem carboidratos livres ou ligados a superfícies celulares através de sítios de ligação nos quais a hidrofobicidade é a principal força de interação (Kennedy *et al.*, 1995).

As lectinas são multivalentes, possuindo dois ou mais sítios de ligação para açúcar promovendo aglutinação de células animais e de plantas e precipitação de polissacarídeos, glicoproteínas, peptidoglicanos, ácido teicóico, glicofosfolipídios, etc. A especificidade das lectinas é definida pelo monossacarídeo ou oligossacarídeo que inibe as reações de precipitação ou aglutinação induzidas por lectinas (Kompella e Lee, 2001). Várias centenas de lectinas demonstraram, através de análises detalhadas, que elas são um grupo grande e heterogêneo de proteínas que diferem fortemente quanto à especificidade aos carboidratos, estrutura molecular e atividade biológica (Van Damme *et al.*, 1996).

O início da pesquisa de lectinas animais pode provavelmente ter se iniciado por volta de 1860, com a observação da coagulação sanguínea pelo veneno de cobra (Yamazaki *et al.*, 2000). Os estudos de lectinas tiveram maior interesse em 1960, pela verificação de que a proteína de *Phaseolus vulgaris* (PHA – fitohemaglutinina) estimula linfócitos, resultando em divisão mitótica, e da aglutinina de *Triticum vulgaris*, do germe de trigo, aglutinar mais intensamente células transformadas do que normais (Sharon e Lis, 1987).

Com a descoberta de Inbar e Sachs (1969) de que a lectina de *Canavalia ensiformis*, *Concanavalina A* (Con A), também aglutinava preferencialmente células malignas, é que as lectinas tiveram um impulso na sua aplicação.

As proteínas vegetais com atividade hemaglutinante foram, logo de início, denominadas de aglutininas, hemaglutininas, fitoaglutininas, fitohemaglutininas (Allen e Brilliant, 1969), apesar de ter sido proposto por Boyd e Shalpleigh (1954) o termo “lectina” às proteínas com estruturas diversas e com a característica comum de seletividade na interação de carboidratos. Em animais, as lectinas de membranas parecem participar na endocitose e na translocação intracelular de glicoproteínas (Ashweel e Harford, 1982), na ligação de bactérias a células epiteliais (Ashkenazi e Mirelman, 1984) e na regulação da migração e adesão celular (Gabius *et al.*, 1985). Para as lectinas solúveis de vertebrados, foi proposta uma função comum: a de ligar gliconjugados presentes em células (Kennedy *et al.*, 1995; Barondes, 1984). A primeira lectina a ser purificada foi a concanavalina A (Com A), extraída da *Canavalia ensiformis* (feijão de porco), que é uma das mais amplamente avaliadas em suas características e aplicações (Correia e Coelho, 1995).

No Brasil, mais precisamente no estado de Pernambuco, uma lectina tem sido purificada e parcialmente caracterizada a partir de sementes de uma planta nativa do Nordeste brasileiro de *Cratylia mollis* (feijão camaratu) (Fig. 4), que é uma planta leguminosa nativa da região semi-árida de Pernambuco, pertencente à família *Phaseoleae*, subfamília *Dioclineae*, a qual abrange o gênero *Canavalia*, botanicamente relacionada a *Cratylia mollis* (Correia e Coelho, 1995). Esta lectina, denominada Cra lectina, é fortemente inibida por metil α -D-manosídeo e conforme, portanto com a classe de lectinas ligantes de glicose/manose, similar as isoladas da *Canavalia ensiformis* (*Concanavalina A*, Con A) e *Lens culinaris* (lectina de lentilha) (Lima *et al.*, 1997). Cra possui forte ligação para tecidos humanos com câncer, particularmente para aqueles de glândulas mamárias, útero e cérebro (Beltrão *et al.*, 1998).



Figura 4 – Fotografia do feijão Camaratu

Estudos por Cristalografia e Raios-X revelaram duas diferentes formas de cristal da Cra (Tavares *et al.*, 1996). O modelo do monômero de Cra Iso-1 constituído a partir de estudos cristalográficos da Cra estão representados na Figura 5.

Cra e Con A diferem em muitos aspectos. Características estruturais por cromatografia líquida de rápida resolução de proteínas e por cromatografia líquida de alta pressão mostrou que estas duas lectinas têm diferentes padrões de eluições e diferentes ligações específicas para tumores humanos benignos e malignos (Tavares *et al.*, 1996).

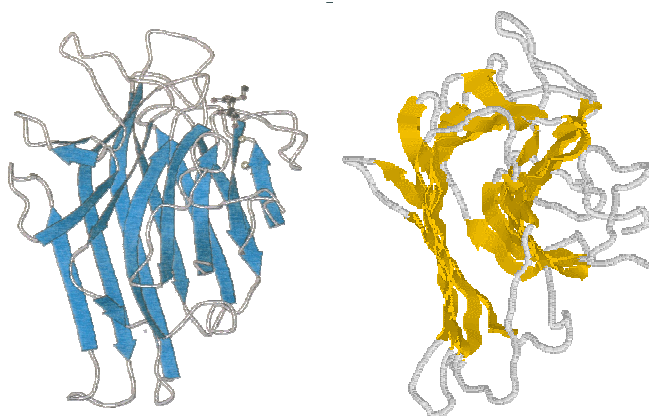


Figura 5 – Modelo de monômero de Cra Com-1 (azul) e Com A (amarelo) (<http://webenligne.cermav.cnrs.fr/lectines/>).

A caracterização físico-química de lectinas é importante para explicar seu comportamento em diferentes propriedades biológicas (Souza *et al.*, 2001). A estabilidade e integridade estrutural de proteínas oligoméricas são determinadas por suas interações inter e intracadeias. Lectinas de legumes podem servir como um excelente sistema modelo para estudos de desdobramento de proteínas diméricas e tetraméricas, e o efeito da oligomerização na sua estabilidade e integridade estrutural. Lectinas de legumes são similares nas suas estruturas primária, secundária e terciária (Srinivas *et al.*, 2001).

3.2. Classificação

Em função da capacidade de interagir com carboidratos, as lectinas foram classificadas em específicas e não específicas. A especificidade da lectina é definida em termos do monossacarídeo que apresenta maior ação inibitória. Por existirem plantas que possuem duas ou mais lectinas que diferem na especificidade, Sharon e Lis (1990) denominaram estas lectinas de isolectinas que são definidas como um grupo de proteínas intimamente relacionadas, resultantes da expressão de diferentes genes, com estruturas semelhantes em uma mesma espécie, e apresentam formas moleculares com

mobilidade eletroforética diferente. O termo isoforma foi proposto para lectinas pertencentes à mesma espécie, cuja heterogeneidade de origem genética não foi bem definida (Paiva e Coelho, 1992). Apesar de muitas plantas possuírem uma lectina com especificidade para um único carboidrato, são conhecidas plantas que contêm duas ou mais lectinas com especificidade para açúcares diferentes, por exemplo: *Ulex europaeus*, *Bandeiraea simplicifolia*, *Dioclea lehmani* e *Sambucus nigra* (Van Damme *et al.*, 1996; Perez, 1998).

3.3. Ocorrência

As lectinas estão presentes em diversos organismos, além das plantas, desde bactérias até vertebrados superiores (Sharon e Lis 1990), na qual sua presença na natureza é ampla e crescente, com distribuição variada, sendo encontrada nos seres unicelulares (Yamaguchi, *et al.*, 1998) e nos seres pluricelulares animais (Ye e Ng, 2000) e vegetais (Coelho e da Silva, 2000). Sendo essas proteínas extraídas principalmente de sementes de leguminosas, muitas famílias de plantas já foram estudadas e caracterizadas (Bhattacharyya *et al.*, 1990; Rinderle *et al.*, 1990; Sharon e Lis 1990; Gegg *et al.*, 1992; Yamaguchi *et al.*, 1993). Entre as lectinas de plantas mais estudadas e caracterizadas estão incluídos: *Phaseolus vulgaris* (PHA), *Canavalia ensiformis* (com A), *Phosphocarpus tetragonolobus* (WBL), *Triticum vulgare* (WGA) e *Lycopersicon esculentum* (lectina do tomate) (Kompella e Lee, 2001).

3.4. Função e Papel Fisiológico

As lectinas de plantas recebem atenção particular devido a sua aplicação potencial em uma extensa gama de pesquisas médicas e biológicas, ou seja, elas são utilizadas para explorar superfícies celulares, ligando-se à porção carboidrato de glicoproteínas ou glicofosfolipídios que se projetam da célula (Ueno e Lim, 1991; Sarkar *et al.*, 1991). Ainda por sua versatilidade, as lectinas têm sido usadas para tipagem de células vermelhas do sangue (Sakakibara *et al.*, 1985; Khang *et al.*, 1990); como agentes mitogênicos (Ryder *et al.*, 1992; Aoki *et al.*, 1993); e para detectar alterações durante transformações celulares (Walker, 1985; Remani *et al.*, 1994), além de receber particular atenção devido à sua potencial aplicação em uma ampla faixa de análises laboratoriais e químicas (Sarkar *et al.*, 1991; Ryder *et al.*, 1992), elas possuem especificidade diferentes a carboidratos e são facilmente imobilizadas em suportes inertes (Delanghe *et al.*, 1989; Sarkar *et al.*, 1991).

Em plantas, a principal hipótese é de que lectinas serviriam como mediadores de simbiose entre as plantas e os microrganismos fixadores de nitrogênio e plantas leguminosas (Dazzo e Truchet, 1983), além de que as lectinas teriam um papel de defesa contra fitopatógenos, evitando a invasão de parasitas microbianos nas plantas

(Mishkind *et al.*, 1982; Broekaert *et al.*, 1989), e proteção contra predadores, como insetos e animais, e armazenagem de proteínas (Ponchel e Irache, 1998). Nos microrganismos, as lectinas fariam a ligação com a célula hospedeira e atuariam como determinantes de reconhecimento em processos imunológicos, fagocitose e adesão celular (Ponchel e Irache, 1998). Em animais, evidências sugerem que lectinas participem do mecanismo de endocitose e transporte vetorial de intracelular de glicoproteínas, apoptose, defesa contra microrganismos, na regulação da migração e adesão celular, na ligação de bactérias às células epiteliais e de que as lectinas funcionem como um tipo de receptor (Ponchel e Irache, 1988).

3.5. Mecanismo de ação

Lectinas são proteínas versáteis largamente distribuídas, que podem ligar estruturas de carboidratos presentes em oligossacarídeos, glicoproteínas ou glicoconjugados (Sharon e Lis, 1990). Nas lectinas, os sítios de ligação a carboidratos, promovem o reconhecimento de carboidratos ligante específico, se combinando a este de acordo com o modelo chave-fechadura (Kennedy *et al.*, 1995). As lectinas fazem uso de uma série de diversas interações químicas fracas para produzir reconhecimento altamente seletivo a seus carboidratos ligados a uma superfície (Sharma e Surolia, 1997). Esta interação fraca entre a lectina e o carboidrato aumenta tanto a afinidade como a especificidade através de subsítios e subunidades. Esta ligação ao carboidrato é diretamente responsável pela atividade biológica (Peumans e Van Damme, 1998).

3.6. Aplicações

A aplicação das lectinas pode ser ampla e variada, como na avaliação de superfícies celulares, tipagem sanguínea (Mo *et al.*, 2000), estimulação mitogênica (Nomura *et al.*, 1998), detecção de alterações durante transformações celulares (Kabir, 1998), marcadores de tecidos tumorais (Beltrão *et al.*, 1998), entre muitos outros.

Matrizes de afinidade de lectinas comerciais são largamente usadas na purificação de glicoproteínas (Torres e Smith, 1988) ou glicofosfolípidios (Delanghe *et al.*, 1989) de membrana, e em estudos para caracterizar enzimas (Gioannini *et al.*, 1982) e receptores (Tsuji *et al.*, 1983). Cuatrecasas e Tell em 1973 relataram que lectinas de plantas, entre elas a *Concanavalina A* (Figura 6), seriam capazes de mimetizar o efeito da insulina em muitos tipos de células através da interação direta com resíduos de glicoproteínas nos receptores da insulina (citado por Purrelo *et al.*, 1983).

A associação lectina-carboidrato é o evento primário em muitos processos biológicos como a infecção, diferenciação celular, simbiose de bactérias, formação de

órgãos e metástase (Sharon, 1993). Algumas lectinas são capazes de ativar linfócitos, sendo conhecidas como mitógenos indutores de proliferação. *In vitro*, a fitohemaglutinina (PHA) e a Com A são mitogênicas para linfócitos T, e o caruru de cacho (pokeweed mitogen – PWM) estimula tanto células T, como células B, levando à produção de citocinas e receptores para citocinas, que juntos direcionam os clones selecionados durante a proliferação até a maturação de células efetoras e de memória, participando assim da resposta imune (Roitt *et al.*, 1997).

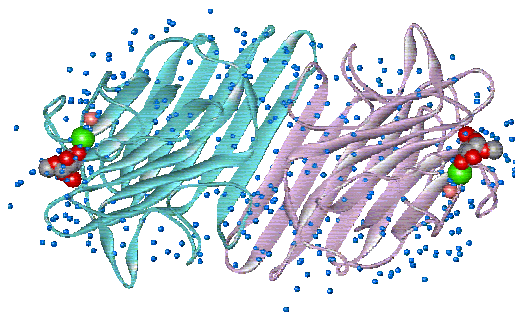


Figura 6 – Ligação de carboidratos à molécula da Com A
(<http://webenligne.cermav.cnrs.fr/lectines/>).

A rápida expansão da biotecnologia na pesquisa farmacêutica tem resultado no desenvolvimento de um enorme número de novas terapêuticas macromoleculares. O sucesso da liberação destas moléculas dependerá do Sistema de Liberação Controlada que oferecer uma boa proteção assim como uma melhor penetração celular (Abu-Dahab *et al.*, 2001). Lipossomas conjugados a proteínas são muito utilizados como vetores de fármacos, principalmente por causa do seu potencial uso como sistema de liberação controlada de drogas e aplicação na área de diagnóstico (Kompella e Lee, 2001; Yamazaki *et al.*, 2000; Bendas *et al.*, 1997). Como exemplo clássico de proteínas conjugadas a lipossomas, temos os anticorpos, muito embora a técnica de conjugação de proteínas a lipossomas possa ser aplicada a diversas outras proteínas tais como, proteína A de *Staphylococcus aureus*, lectinas de plantas e enzimas (New, 1990). Chen *et al.* (1996) observaram que lectinas de *Ulex europaeus I*, incorporadas na bicamada fosfolipídica de lipossomas, favoreceram significativamente a absorção pelo trato gastrointestinal (10,5%) com relação a lipossomas sem lectinas (3,2%).

OBJETIVOS

GERAL

1. Utilizar lectina de *Cratylia mollis* que apresenta uma provável atividade antitumoral, na fabricação de lipossomas para fins terapêuticos;
2. Determinar a toxicidade e atividade antitumoral em camundongos dos lipossomas contendo lectina.

ESPECÍFICO

1. Obter lipossomas contendo lectina de *Cratylia mollis*;
2. Estabelecer a estabilidade físico-química dos Cra-lipossomas frente a testes de envelhecimento acelerado e em longo prazo;
3. Estabelecer a cinética de liberação *in vitro* da lectina encapsulada nos lipossomas;
4. Determinar a atividade antitumoral dos Cra-lipossomas contra o Sarcoma 180 em camundongos;
5. Analisar a histopatologia do tumor, fígado, baço e rins de animais não-tratados e tratados com a Cra livre e Cra-lipossomas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-DAHAB, R., SCHAFFER, U. F. AND LEHR, C.-M. Lectin-functionalized liposomes for pulmonary drug delivery: effect of nebulization on stability and bioadhesion. **Eur. J. Pharm. Sci.**, 14, 37-46, 2001.
- ALLEN, N. K., BRILLIANT, L. A survey of hemagglutinins in various seeds. **J. Immunol.**, 102, 1295-99, 1969.
- ANTIMISIARIS, S. G., JAYASEKERA, P. AND GREGORIADIS, G. Liposomes as vaccine carriers. Incorporation of soluble and particulate antigens in giant vesicles. **J. Immunol. Methods**, 166, 271-280, 1993.
- AOKI, T., KAWANO, J. I., OINUMA, T., HARAGUCHI, Y., ETO, T. AND SUGANUMA, T. Human colorectal carcinoma-specific glycoconjugates detected by pokeweed mitogen lectin. **J. Histochem. Cytochem.**, 41, 1321-30, 1993.
- ARROWSMITH, M., HADGRAFT, J. AND KELLAWAY, I. W. The in vitro release of cortisone esters from liposomes and the intramuscular clearance of liposomes. **Int. J. Pharm.**, 20, 347-362, 1984
- ASHKENAZI, S. AND MIRELMAN, D. The effect of postnatal age on the adherence of *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* 0124, and *E. coli* 0128 to guinea pig intestinal cells. **Pediatrics Res.**, 18, 1366-71, 1984.
- ASHWELL, G., HARFORD, J. Carbohydrate-specific receptors of the liver. **Ann. Rev. Biochem.**, 51, 531-54, 1982.
- BANGHAM, A. D. In progress in biophysics and molecular biology, J. A. V. BUTLER AND D. NOBILE (eds.), Pergamon Press, New York, 1968, 29-95.
- BARONDES, S. H. Soluble lectins: a new class of extracellular proteins. **Science**, 223, 1259-64, 1984.
- BELTRÃO, E. I. C., CORREIA, M. T. S., FIGUEIREDO-SILVA, J. AND COELHO, L. C. B. B. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to mammary human tissues. **Applied Biochem. Biotechnol.**, 74, 125-34, 1998.
- BENDAS, G., VOGEL, J., BAKOWSKI, U., KRAUSE, A., MÜLLER, J. AND ROTHE, U. A liposome-based model system for the simulation of lectin-induced cell adhesion. **Biochem. Biophys. Acta**, 1325, 297-308, 1997.
- BHATTACHARYYA, L., FANT, J., LONN, H. AND BREWER, C. F. Binding and precipitating activities of *Lotus tetragonolobus* isolectins with L-fucosyl oligosaccharides. Formation of unique homogenous cross-linked lattices observed by electron microscopy. **Biochem.**, 29, 7523-30, 1990.
- BOYD, W. C. AND SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, 119 (3091), 419, 1954.
- BRANDL, M. AND GREGORIADIS, G. Entrapment of hemoglobin into liposomes by the dehydration-rehydration method: vesicle characterization and in vivo behavior. **Biochim. Biophys. Acta**, 1196, 65-75, 1994.
- BROEKAERT, W. F., VAN PARIJS, J., LEYNS, F., JOSS, H. AND PEUMANS, W. J. A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. **Science**, 245, 1100-2, 1989.
- CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE. Disponível em:

<<http://webenligne.cermav.cnrs.fr/lectines/>>. Acesso em: 12 jun. 2002.

CENTRE UNIVERSITAIRE DE LUXEMBOURG. Disponível em:

<<http://www.cu.lu/labext/rcms/cppe/membrane/manalipi.html>>. Acesso em: 12 jun. 2002.

CHEN, H., TORCHILIN, V., LANGER, R. Lectin-bearing polymerized liposomes as potential oral vaccine carriers. **Pharm. Res.**, 13, 9, 1378-83, 1996.

CHONN, A. AND CULLIS, P. R. Recent advances in liposome technologies and their applications for systemic gene delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 30, 73-83, 1998.

COELHO, L. C. B. B. AND DA SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochem. Analysis**, 11, 1-6, 2000.

CORREIA, M. T. S. AND COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). **Applied Biochem. Biotechnol.**, 55, 261-73, 1995.

CUATRECASAS, P. AND TELL, G. P. E. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, 70 (2), 485-489, 1973.

DALEKE, D. L., HONG, K. AND PAPAHAJIOPOULOS, D. Endocytosis of liposomes by macrophages: binding, acidification and leakage of liposomes monitored by a new fluorescence assay. **Biochim. Biophys. Acta**, 1024, 352-366, 1990.

DAZZO, F. B. AND TRUCHET, G. L. Interactions of lectins and their saccharide receptors in the *Rhizobium*-legume symbiosis. **J. Memb. Biol.**, 73, 1-16, 1983.

DE OLIVEIRA PONTES, A. C.; PISCIOTTANO CAETANO, M. N AND SANTOS MAGALHÃES, N. S. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of Benzathine Penicillin G liposomes. **S.T.P. Pharma-Sciences**, 9 (5), 419-427, 1999.

DELANGHE, J. R., DEBUYZERE, M. L., DE SCHEERDER, I. K., FAUST, U. AND WIEME. R. J. Activation energy and lectin affinity chromatography of gamma-glutamyltransferase as a marker for enzyme heterogeneity. **Clin. Biochem.**, 22, 115-199, 1989.

DEVISSAGUET, J. P. AND PUISIEUX F. Pharmacocinétique et potentialités thérapeutiques des liposomes. In: DELATTRE, J., COUVREUR, P., PUISEUX, F., PHILIPPOT, J. R., AND SCHUBER, F. eds. *Les liposomes: aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*. Paris: INSERM, 179-213, 1993

FATTAL, E. COUVREUR, P. AND PUISIEUX, F. Méthodes de preparation des liposomes. In: DELATTRE, J., COUVREUR, P. PUISIEUX, F., PHILIPOT, J. R. AND SCHUBER, F. eds *Les liposomes: aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*. Paris: INSERM, 43-62, 1993.

FENDLER, J. H. Membrane mimetic chemistry. New York: Wiley, 1982.

FORSSEN, E. AND WILLIS, M. Ligand-targeted liposomes. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 29, 249-271, 1998.

GABIUS, H. J., ENGELHARDT, R., CRAMER, F., BÄTGE, R. AND NAGEL, G. A. Pattern of endogenous lectins in a human epithelial tumor. **Cancerol. Res.**, 45, 253-7, 1985.

GEGG, C. V., ROBERTS, D. D., SEGEL, I. H. AND ETZLER, M. E. Characterization of the adenine binding sites of two *Dolichos biflorus* lectins. **Biochem.**, 31, 6938-42, 1992.

GIOANNINI, T., FOUCAUD, B., HILLER, J. M., HATTEN, H. E. AND SIMON, E. J. Lectin binding of solubilized opiate receptors: evidence for their glycoprotein nature. **Biochem. Biophys. Res. Commun** 105, 1128-1134, 1982.

- GREGORIADIS, G. Drug entrapment in liposomes. **FEBS LETT.**, Amsterdam, 36, 292-296, 1973.
- GREGORIADIS, G. Immunological adjuvants: a role for liposomes. **Immunol. Today**, 11, 89-97, 1990.
- GREGORIADIS, G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. **Trends in Biotechnol.**, 13, 527-537, 1995.
- HAIR, M. L. The Chemistry of Biosurfaces, 1, 45-81, 1971.
- HAUSER, H. Methods of preparation of lipid vesicles: assessment of their suitability for drug encapsulation. **Trends Pharm. Sci.**, Cambridge, 7, 274-277, 1982.
- INBAR, M. AND SACHS, L. Interaction of the carbohydrate – binding protein Concanavalin A with normal and transformed cells. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, 63, 1418-25, 1969.
- IWAMOTO, K. AND SUNAMOTO, J. Liposomal membranes. Adsorption of polysaccharides on liposomal membranes as monitored by fluorescence depolarization. **J. Biochem.**, 91, 975-979, 1982.
- KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed derived lectin of versatile applications in immunobiological research. **J. Immunol. Methods**, 212, 193-211, 1998.
- KENNEDY, J. F., PAIVA, P. M. G., CORREIA, M. T. S., CAVALCANTI, M. S. M. AND COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Poly.**, 26, 219-30, 1995.
- KHANG, N. Q., JEAN-LUC, G. AND JOHAN, H. A blood group specific lectin from the seeds of *Crotalaria striata*. **Biochim. Biophys. Acta**, 1033, 210-3, 1990.
- KOMPELLA, U. B. AND LEE, V. H. L. Delivery systems for penetration enhancement of peptide and protein drugs: design considerations. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 46, 211-245, 2001.
- LASIC, D. D. Les liposomes. **Recherche**, Paris, 20 (212), 904-913, 1989.
- LASIC, D. D. Liposomes. **Am. Sci.**, New Haven, 80 (1), 20-30, 1992.
- LASIC, D. D. Novel applications of liposomes. **Trends Biotechnol.**, 16, 307-321, 1998.
- LASIC, D. D. The mechanism of vesicle formation. **J. Biochem.**, London, 256, 1-11, 1988.
- LASIC, D. D., MERTIN, F. J. Liposomes. **Farm. Vestn.**, Ljubljana, 40, 197-208, 1989.
- LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L. AND COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. São Paulo: ed. Sarvier, 2000.
- LIENER, I.E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. J. PREFACE IN: I. E. LIENER, N. SHARON AND I. J. GOLDSTEIN (Eds.), *The lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine*. Academic Press, Orlando, FL, pp. xi-vv, 1986.
- LIMA, V. L. M., CORREIA, M. T. S., CECHINEL, Y. M. N., SAMPAIO, C. A. M., OWEN, J. S. AND COELHO, L. C. B. B. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. **Carbohydrate Poly.**, 33, 27-32, 1997.
- MAGENHEIM, B. AND BENITA, S. Nanoparticle characterization a comprehensive physicochemical approach. **S.T.P. Pharma-Sciences**, 1, 221-41, 1991.
- MAIERHOFER, G. Liposomas. Introducción a uma nueva tecnologia y descripción de técnicas preparativas. **Farm Clín.**, Barcelona, 5 (9), 658-680, 1988.
- MEMBRANE STRUCTURE AND FUNCTION. Disponível em: <<http://ntri.tamuk.edu/homepage-ntri/lectures/protein/membranes.html>>. Acesso em: 12 jun. 2002.

- MEYENBURG, S., LILIE, H., PANZNER, S. AND RUDOLPH, R. Fibrin encapsulated liposomes as protein delivery system studies on the *in vitro* release behavior. **J. Control. Rel.**, 69, 159–168, 2000.
- MISHKIND, M., RAIKHEL, N. V., PALEVITZ, B. A. AND KEEGSTRA, K. Immunocytochemical localization of wheat germ agglutinin in wheat. **J. Cell. Biol.**, 92, 753–64, 1982.
- MO, H., WINTER, H. C. AND GOLDESTINE, I. J. Purification and characterization of a Neu5Ac α 2–6 Gal β -1–4 Glc/GlcNAc-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. **J. Biol. Chem.**, 275, 10623–29, 2000.
- NEW, R. R. C. Liposomes: a practical approach. Oxford: IRL Press, 1990.
- NOMURA, K., ASHIDA, H., UEMURA, N., KUSHIBE, S., OZAKI, T. AND YOSHIDA, M. Purification and characterization of a mannose/glucose-specific lectin from *Castanea crenata*. **Phytochem.**, 49, 667–73, 1998.
- PAIVA, P. M. G. AND COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Appl. Biochem. Biotechnol.** 36, 113–17, 1992.
- PEREZ, G. Isolation and characterization of a novel lectin from *Dioclea lehmani* (fabaceae) seeds. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, 30, 843–53, 1998.
- PEUMANS, W. J. AND VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnol. Genetic Engineer. Rev.**, 15, 199–228, 1998.
- PONCHEL, G. AND IRACHE, J. M. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 34, 191–219, 1998.
- PRISTA, L. N., ALVES, A. C. AND MORGADO, R. Tecnologia Farmacêutica, 4^a ed., 3, 2064–2083, 1995.
- PUISIEUX, F. Les liposomes. **Ann. Pharm. Fr.**, Paris, 41 (1), p. 3–13, 1983.
- PURRELLO, F., BURNHAM, D. B. AND GOLDFINE, I. D. Insulin receptor antiserum and plant lectins mimic the direct effects of insulin on nuclear envelope phosphorylation. **Science**, 221 (4609), 62–4, 1983.
- REMANI, P., PILLAI, K. R., HASEENABEEVI, V. M., ANKATHIL, R., BHATTATHIRI, M., NAIR, M. K. AND VIJAYAKUMAR, T. Lectin cytochemistry in the exfoliative cytology of uterine cervix. **Neoplasma**, 41, 39–42, 1994.
- RIDOUT, G., SANTUS, G. AND GUY, R. H. Pharmacokinetic considerations in the use of newer transdermal formulations. **Clin. Pharmacokinet.**, Auckland, 15, 114–131, 1988.
- RINDERLE, S. J., GOLDSTEIN, I. J., REMSEN, E. E. Physicochemical properties of amaranthin, the lectin from *Amaranthus caudatus* seeds. **Biochem.**, 29, 10555–61, 1990.
- ROITT, I., BROSTOFF, J. AND MALE, D. Linfócitos. *Imunologia*, c. 2, 2.1–2.11, 4^a ed., Ed. Manole, 1997.
- RUDIGER, H. Plant lectins—more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. **Acta Anat. (Basel)**, 161, 130–52, 1998.
- RYDER, S. D., SMITH, J. A. AND RHODES, J. M. Peanut lectin: a mitogen for normal human colonic epithelium and human HT29 colorectal cancer cells. **J. Natl. Cancer Inst.**, 84, 1410–6, 1992.
- SAKAKIBARA, F., KAWAUCHI, H. AND TAKAYANAGI, G. Blood group B-specific lectin of *Plecoglossus altivelis* (ayu fish) eggs. **Biochim. Biophys. Acta**, 1070, 103–11, 1985.
- SARKAR, M., MAJENDER, G. AND CHATTERJEE, T. Goat sperm membrane: lectin-binding sites of

sperm surface and lectin affinity chromatography of the mature sperm membrane antigens. **Biochim. Biophys. Acta**, 1070, 198-204, 1991.

SCARPA, M. V., OLIVEIRA, A. G. AND CUCCOVIA, I. M. Estrutura e propriedades fisico-químicas de lipossomas. **Infarma**, 7, (1/2), 4-7, 1998.

SCHUBER, F. AND FRISCH, B. Réactions et techniques de conjugaison de ligands aux liposomes. In: DELATRE., J., COUVREUR, P., PUISIEUX, F., PHILIPPOT, J. R. AND SCHUBER, F. *Les liposomes: aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*. 1.ed. Paris: INSERM, 1993, 113-36.

SENIOR, J. Fate and Behavior of liposomes in vivo: A review of controlling factors. **Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.** 3, 123-193, 1987.

SHARMA, V. AND SUROLIA, A. Analysis of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. **J. Molec. Biol.**, 267, 433-45, 1997.

SHARON, H. **Trends Biochem. Science** 18, 221, 1993.

SHARON, N. AND LIS, H. A century of lectin research (1888 – 1988). **Trends in Biochem. Sciences** 12, 488-91, 1987.

SHARON, N. AND LIS, H. Legume lectins – a large family of homologous proteins. **J. FASEB**, 4, 3198-3208, 1990.

SINGER, S. J. AND NICHOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, Washington, 720-731, 1972.

SOUZA, S. R., CORREIA, M. T. S., PESSOA, M. M. A., KENNEDY, J. F., LIMA-FILHO, J. L. AND COELHO, L. C. B. B. A novel model to characterize the electric double layer of lectins from *Cratylia mollis* (Camaratu Bean) and *Canavalia ensiformis* absorbed on metallic surface. **Carbohydrate Poly.**, 46, 191-193, 2001.

SRINIVAS, V. R., BHANUPRAKASH REDDY, G., CHITTOOR, N. A., SWAMINATHAN, P., MITRA, N. AND SUROLIA, A. Legume lectin family, the “natural mutants of the quaternary state”, provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. **Biochim. Biophys. Acta**, 1527, 102-111, 2001.

TAVARES, G. A., CARACELLI, I., BURGER, R. CORREIA, M. T. S. COELHO, L. C. B. B. AND OLIVA, G. Crystallization and preliminary x-ray studies on the lectin from the seeds of *Cratylia mollis*. **Acta Crystal.**, 52, 1046, 1996.

TORCHILIN, V. P., LEVCHENKO, T. S., LUKYANOV, A. N., KHAW, B. A., KLIBANOV, A. L., RAMMOHAN, R., SAMOKHIN, G. P. AND WHITEMAN, K. R. p-Nitrophenylcarbonyl-PEG-PE-Liposomes: fast and simple attachment of specific ligands, including monoclonal antibodies, to distal ends of PEG chains via p-nitrophenylcarbonyl groups. **Biochim. Biophys. Acta**, 1511, 397-411, 2001.

TORRES, B. V. AND SMITH, D. F. Purification of Forsman and Human Blood group A glycolipid by affinity chromatography on immobilized helix pomatia lectin. **Anal. Biochem.** 170, 209-219, 1988.

TSUJI, T., TSUNEHISA, S., WATANABE, Y., YAMAMOTO, H. AND OSAWA, T. The carbohydrate moiety of human platelet glycolectin. **J. Biol. Chem.** 258, 6335-6339, 1983.

UENO, K. AND LIM, D. J. Heterogeneity of glycoconjugates in the secretory cells of the chinchilla middle ear and eustachian tubal epithelia: a lectin-gold cytochemical study. **J. Histochem. Cytochem.**, 39, 71-80,

1991.

VAN DAMME, E. J. M., BARRE, A., ROUGE, P. VAN LEUVEN, F. AND PEUMANS, W. J. The NeuAc (α -2,6)-Gal/GalNac – binding lectin from elderberry (*Sambucus nigra*) bark, a type-2 ribosome-inactivating protein with an unusual specificity and structure. **Eur. J. Biochem.**, 235, 128–37, 1996.

VIDAL, M. Méthodes de caractérisation des liposomes. In: DELATRE, J., COUVREUR, P., PUISIEUX, F., PHILIPPOT, J. R. AND SCHUBER, F. *Les liposomes: aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*. 1.ed. Paris: INSERM, 69-86, 1993.

WALKER, R. A. The binding of peroxidase-labelled lectins to human breast epithelium. IV. The reactivity of breast carcinomas to peanut, soybean and *Dolichos biflorus* agglutinins. **J. Phatol.**, 145, 269-77, 1985.

WEINER, N., MARTÍN, F. AND RIAZ, M. Liposomes as a drug delivery system. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, New York, 15, 10, 1523–1554, 1989.

WOODLE, M. C., STORM, G., NEWMAN, M. S., JEKOT, J. J., COOLINS, L. R., MARTIN, F. J. AND SZOKA, F. C. Jr. Prolonged systemic delivery of peptide drugs by long circulating liposomes: Illustration with vasopressin in the Brattleboro rat. **Pharm. Res.**, 9, 2, 260-265, 1992.

YAMAGUCHI, M. JIMBO, M., SAKAI, R., MURAMOTO AND K. KAMIYA, H. Purification and characterization of *Microcystis aeruginosa* (freshwater cyanobacterium) lectin. **Comp. Biochem. Physiol. Part B**, 119, 593–97, 1998.

YAMAGUCHI, O., KIMURA, M., ARAKI, M., YAMASAKI, N., KIMURA, Y., NAKAJIMA AND S., TAKAGI, S. Chemical structures of two subunits, A-subunit and B-subunit, of galactose-specific isolectins from *Erythrina variegata* seeds. **J. Biochem.**, 114, 560-6, 1993.

YAMAZAKI, N., KOJIMA, S. BOVIN, N. V., ANDRÉ, S., GABIUS, S. AND GABIUS, H. –J. Endogenous lectins as targets for drug delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 43, 225–244, 2000.

YE, X. Y. AND NG, T. B. Purification and characterization of glycolactin, a novel glycoprotein from bovine milk. **Life Sci.**, 66, 1177–86, 2000.

**TRABALHO SUBMETIDO AO
INTERNATIONAL JOURNAL OF
PHARMACEUTICS**

Antitumor Activity of Cratylia mollis Lectin Encapsulated into Liposomes

Cesar A. S. Andrade^{a,b}; Maria T. S. Correia^b; Luana C. B. B. Coelho^b;
Silene C. Nascimento^c; Nereide S. Santos-Magalhães^{a,b*}

^aLaboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA),
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),
Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brazil

^bDepartamento de Bioquímica, Laboratório de Glicoproteínas, UFPE

^cDepartamento de Antibióticos, UFPE

Keywords: Lectin; Cratylia mollis; Liposomes; Cytotoxicity; Antitumor activity

* Corresponding author.

Dr. Nereide Stela Santos Magalhães (✉)

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Grupo de Sistemas de Liberação Controlada de Medicamentos

Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária

50670-901, Recife, PE, Brazil

Tel: +55-081-32718587; fax: +55-081-23718485

E-mail: nssm@ufpe.br

Abstract

The haemagglutinating (HA) activity of *Cratylia mollis* lectin (Cra) was evaluated and the influence of ultrasound and mechanical agitation on its activity was examined. In vitro release profile and the antitumor activity of Cra loaded-liposomes were also investigated. Liposomes were obtained according to the lipid thin film method. Physicochemical characterization and long-term stability of Cra loaded-liposomes were carried out. In vitro release assays were performed by ultrafiltration-ultracentrifugation technique. Antitumor activity of Cra loaded-liposomes was investigated against Sarcoma 180 in Swiss mice. The treatment was intraperitoneally performed (7 mg/kg of body weight/day) for 7 days. Histopathological analysis of tumor, liver, spleen and kidneys were carried out after animal treatment. Results showed that Cra HA activity is affected under ultrasound agitation. However, Cra was successfully encapsulated into liposomes and the activity of the lectin was preserved despite the use of ultrasounds in the liposome preparation. Lyophilized Cra loaded-liposomes were produced with 84% encapsulation ratio (700 µg/ml) and a tumor inhibition of 71% was achieved. The encapsulation of Cra promoted a decrease on its tissue toxicity and improved its antitumor activity. Particularly, histopathological analysis revealed that the treatment with Cra loaded-liposomes prevented Cra cytotoxicity on liver and kidney of animals.

1. Introduction

Lectins are carbohydrate-binding proteins of non-immune origin from microorganisms, animals or plants. They are multivalent molecules, possessing two or more sugar-binding sites for agglutinating cells, and for precipitating polysaccharides, glycoproteins, peptidoglycans, teichoic acids, and glycolipids (Liener and Sharon, 1986). Ordinarily, two approaches have been applied to introduce proteins in therapy. In the first case, the protein itself presents biological activity and it can be encapsulated into liposomes (Meyer et al., 1994). Generally, lectins present antitumor activity possibly mediated by an immunomodulatory action (Wang et al., 1996; Haas et al., 1999; Karazaki et al., 2001; Timoshenko et al., 2001). On the other hand, proteins, specifically lectins, could also be binding at the surface of nanodispositives for site-specific drug targeting (Bendas et al., 1997; Forsen and Willis, 1998; Wirth et al., 1998; Yamazaki et al., 2000; Kompela and Lee, 2001).

Cratylia mollis lectin (Cra) belongs to the mannose/glucose binding class of lectins and has been purified and characterized from the seeds of a plant (Camaratu bean) native to Northeast of Brazil (Correia and Coelho, 1995). It was found to be rather similar to Concanavalin A (Con A), a well-characterized lectin from *Canavalia ensiformis*. Cra showed strong binding to human malignant cancerous tissues, particularly to those from mammary glands, uterus and brain (Beltrão et al., 1998). Nevertheless, it presented cytotoxicity against Hep-2 cells and hepatotoxicity (unpublished data).

Bearing in mind a potential application of Cra in the field of pharmaceutical nanotechnology, either as an active agent or as a surface binding-molecule for drug targeting, previous studies on the Cra behavior at the air-water interface were carried out using surface tension measurements (Bazskin et al., 2000). The ability of Cra to penetrate into phospholipid monolayers (Lipoid E80™, 80% phosphatidylcholine and Epikuron 200™, 96.5% phosphatidylcholine) was demonstrated. Kinetics of Cra interfacial adsorption and lectin-lipid interactions data revealed that Cra is a rather stable protein, which exhibits typical protein adsorption patterns.

The successful use of new bioactive proteins in medical therapy depends on the development of drug delivery systems to overcome stability drawbacks related with these macromolecules. Proteins and peptides intravenous or subcutaneous administered are rapidly cleared from the circulation, requiring therefore to be frequently injected in

order to maintain therapeutic levels in the blood. Pharmaceutical nanotechnology of colloidal drug carriers, especially liposomes, are particularly useful for formulating new drug derived from biotechnology (peptides, proteins, genes and oligonucleotides) because they can provide drug safekeeping from degradation in biological fluids and promote their penetration into cells (Barrat, 2000).

Disseminated neoplastic disease and development of drug resistance remain the major complications of cancer, ultimately leading to treatment failures. The use of liposomes in cancer therapy has been recommendatory due to their advantage of extravasations at sites of active tumor growth (Gabius et al., 1994). More recently, intraperitoneal administration has been shown to prolong the blood circulation of liposomes caused by their slow absorption from the abdominal cavity. Furthermore, the slow clearance of liposome from this cavity prolonged the contact between tumor cells and the encapsulated drug, and promoted an increase in the antitumor activity (Sadzula et al., 2000).

Based on previous available figures about Cra surface properties and biological activity, the current study has been undertaken to further investigate the efficacy of Cra encapsulation into liposomes on its antitumor activity. The influence of liposome preparation methods on the stability of Cra was considered through the haemagglutinating (HA) activity assay. Furthermore, the *in vitro* release profile and the *in vivo* antitumor activity of Cra loaded-liposomes against Sarcoma 180 were evaluated.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Soya phosphatidylcholine (Epikuron 200) was obtained from Lucas Meyer (Hamburg, Germany). Cholesterol, stearylamine, threalose and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma (Saint Louis, USA). Chloroform, methanol, potassium phosphate, sodium hydroxide and all analytical grade reagents were purchased from Merck (Düsseldorf, Germany). Cratylia mollis lectin (Cra) was purified from seeds of Cratylia mollis Mart. (Camaratu bean) seeds and characterized at the Glycoprotein Laboratory from the Federal University of Pernambuco, Brazil (Correia and Coelho, 1995).

2.2. Methods

2.2.1. Evaluation of Cra stability after exposure to ultrasound and mechanical agitation

A preliminary assay was performed to ascertain the effect of ultrasounds and mechanical agitation on Cra HA activity using glutaraldehyde-treated rabbit erythrocytes. Cra samples (50 μ l) were two fold serially diluted in 0.15 M NaCl, in microtiter plates. Rabbit erythrocyte suspension (2.5% v/v in 0.15 M NaCl, 50 μ l) previously treated with glutaraldehyde (1%) was added and the titer was read after 45 minutes (Correia and Coelho, 1995). A positive control assay was performed using carbohydrate binding specific to Cra (glucose or mannose) in microtitre plates. Initially, 100 μ l of a solution containing either carbohydrate (200 mM) in 150 mM sodium chloride was mixed with 100 μ l of lectin preparation (7 μ g/ml). Then, the inhibition of the Cra Ha activity was verified at the identical conditions for the determination of Cra HA activity.

2.2.2. Formulation of Cra-loaded liposomes

Liposomes were obtained according to a reprogrammed version of the Amselen and co-workers method (1990) based on a lipid film formed by evaporation of solvents from a phospholipid organic solution. Positive surface charged liposomes were prepared as following. Initially the lipid constituents, soybean-phosphatidylcholine, cholesterol and stearylamine (7:2:1, 36 μ mol Lipids/10 μ l buffered solution) were dissolved in chloroform/methanol 3/1 (v/v) under moderate magnetic agitation (15 min). Then, the organic solution was submitted to evaporation under reduced pressure (25 min at $40 \pm 1^\circ\text{C}$) and agitation at 120 rpm to remove solvents. The dried lipid film was hydrated through the addition of an aqueous phase (10 ml) consisted of phosphate buffered solution (pH 7.4) containing 10% (w/v) threalose and Cra at 700 μ g/ml, leading to multilamellar vesicle (MLV) formation. The suspension was then kept under magnetic agitation (40 min). Large unilamellar vesicles (LUV) were obtained by MLV ultrasonication at 200 W with 40 cycles/sec during 250 sec. Finally the suspension of liposomes was lyophilized (FTSS System, USA) using threalose as cryoprotector.

2.2.3. Physicochemical characterization and stability assessment of Cra-loaded liposomes

The physicochemical analysis of liposomes was carried out immediately after preparation and then at regular time intervals. Several features such as macroscopic and microscopic aspects, morphological examination, pH changes and encapsulation ratio were analyzed. The mean diameter size of vesicles was determined by light scattering spectroscopy using a nanosizer (NMD4, Coulter, USA). Morphological properties of Cra loaded-liposomes were analyzed by scanning electronic microscopy (SEM).

Formulated liposomes were submitted to both accelerated and long-term stability tests aiming to state the formulation durability. Accelerated stability testing has the aim of submitting preparations to stressed conditions in order to simulate processes such as sterilization, transport and storage. Liposomes were subjected to centrifugation (3500 rpm/min for 1 hour), mechanical stress (150 strokes/min at 37°C during 48 h) and freeze-thawing cycles (16 h at $-18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ and 8 h at $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). Long-term stability of liposome suspensions was examined for samples stored at $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Physicochemical properties of preparations were evaluated at 7, 15, 30, 45 and 60 days or until instability signs.

Lectin was quantified by the Peterson-Lowry colorimetric method (Peterson, 1997) using UV spectroscopy at 280 nm. This method was chosen to avoid lipid interference in the protein assay. The BSA was used as a standard protein to derive calibration curves at concentrations ranging from 10 to 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

The encapsulation ratio of lectin into liposomes was determined after ultrafiltration/ultracentrifugation at 133,570 g using ultrafree[®] units (Millipore, USA). The Cra concentration in the supernatant was determined as previously described and the Cra encapsulation ratio was then calculated on the basis of the total Cra content into the liposome formulation.

2.2.4. In vitro release profile of Cra loaded-liposomes

In vitro release assays were performed as following: 5 ml of Cra loaded-liposomes (700 $\mu\text{l}/\text{ml}$) were directly placed into 50 ml of a pH 7.4 phosphate buffered solution holding sink conditions. Aliquots (1 ml) of experimental medium were collected at

predetermined time intervals (5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 and 360 minutes), centrifuged (133,570 g) using Ultrafree[®] filtration units (Millipore, USA) and the Cra concentration in supernatant was determined as already described. The volume of the receptor medium was replaced with buffered solution after each sample withdraws. Kinetic experiments were performed in triplicate.

2.2.5. Antitumor activity of Cra-loaded liposomes

Studies were carried out in Swiss albino male mice aiming to look into the in vivo antitumor activity of Cra loaded-liposomes against Sarcoma-180. Tumor ascytic cells were diluted to 5.5×10^6 cells/ml with phosphate-buffered saline and subcutaneously injected in the inguinal area of mice. Four groups of 10 animals (body weight 20-25 g, 35-40 days old) were randomized treated with i.p. injections of free Cra solution and Cra loaded-liposomes (7 mg/kg/day for seven days) after 24 hours of inoculation of tumor cells. The control groups were treated with phosphate-buffered saline (pH 7.4) and empty liposomes daily for seven days. After the treatment, animals were sacrificed and solid tumors were excised and weighed. Tumor inhibition was expressed as the mean of body weights of tumor for the treated animal group (T) in comparison to untreated control group (C). The tumor inhibition activity was then calculated according to: % Tumor inhibition = $[(C - T)/C] \times 100$ (Wang et al., 2000). Animal experiments were performed according to the National Cancer Institute (NCI) protocol (Geran *et al.*, 1972) with the approval of the Ethic Committee for Animal Experimental Assays of the Federal University of Pernambuco, Brazil.

2.2.6. Histopathological analysis

Sarcoma 180 and animal organs (liver, spleen and kidneys) were submitted to histological analysis after treatment. Tissues were preserved in a 10% (v/v) buffered-formalin solution until paraffin inclusions. Slices of sample tissues (4 μ m) were prepared and a fixation with haematoxylin and eosin staining was developed before optical microscopy examination (Olympus BH-2, Japan).

3. Results and Discussion

3.1. Stability of Cra after exposure to ultrasound and mechanical agitation

The influence of the exposure time of ultrasonic agitation and mechanical stress on Cra HA activity, expressed as logarithmic values, was evaluated as shown in Table 1. As depicted, a time-effect response of HA activity after submission of Cra to stressful conditions such as long ultrasound exposition (≥ 250 sec) and mechanical agitation (≥ 48 h) was observed. A reduction on Cra HA activity after sonication during 250 sec was verified. However, no further alteration was detected for longer time of ultrasound exposure. Despite the small numerical difference between HA activity values, it is worthwhile to bear in mind that each 0.3 log-units corresponds to the double concentration required to promote the same lectin HA activity.

In the inhibition of HA activity trial, the agglutination of rabbit erythrocytes by Cra was entirely inhibited by glucose or mannose at the minimum concentration of 200 mM, respectively, showing that the lectin HA activity was blocked due to the binding of Cra to its specific sugars. Therefore, results showed that HA activity of Cra in buffered solution is affected under ultrasound exposure.

3.2. Preparation of Cra-loaded liposomes

Optimization studies were performed varying the formulation parameters aiming to obtain stable liposome preparations containing encapsulated Cra. In order to avoid auto-oxidation and hydrolysis of phospholipids and to maintain the optimal pH range (from 5.4 to 7.4) for Cra stability, a pH 7.4 phosphate buffered solution was chosen as aqueous phase. Several batches of surface positively charged liposomes containing Cra at different concentrations were developed and evaluated according to their accelerated and long-term stability.

In the present work, threhalose was successfully used as cryoprotector. In fact, stable lyophilized preparation of Cra loaded-liposomes were obtained, which remained stabilized for over two years. The morphology of lyophilized Cra loaded-liposomes was analyzed after hydration by SEM. No changes in the shape and particle size were observed after hydration of lyophilized liposomes. These results corroborated those ones previously reported by Bendas and colleagues (1997). They investigated the

cryoprotective activity of carbohydrates on freeze-thawed and lyophilized liposomes and showed that the cryoprotection is due to their ability to directly interact with the hydration site of phospholipids mimic the presence of water. Additionally, they speculate the protective ability of sugars is also manifested in preventing the increase of gel-to-fluid phase transition temperature associated with dehydration of phospholipids.

Cra solution HA activity in solution was affected by ultrasound exposition, however the entrapment of Cra into liposomes preserved its HA activity despite the liposome preparation involved a sonication step. A highly efficient Cra encapsulation (84%) into liposomes was achieved for an initial concentration of 700 $\mu\text{g/ml}$. The Cra encapsulation ratio was remarkable considering that Cra loaded-liposomes are surface positively charged, which generally promoted a low protein encapsulation ratio as reported previously (Van Slooten et al., 2001). Actually, authors found a very low association efficiency of 9% for interferon- γ with liposomes consisted of egg phosphatidylcholine and stearylamine. Moreover, our results are in conformity with those reported by Meyer and colleagues (1994) even though interferon- γ loaded-liposomes are surface negatively charged. In fact, they found 90% encapsulation ratio of granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF, 4 mg/ml) into liposomes prepared with a mixture of 30 mM of lipids (dimyristoylphosphatidylglycerol, distearoyl phosphatidylcholine and cholesterol) by using the method of lipid film hydration followed by freeze-thaw cycles.

3.3. Physicochemical characterization and stability assessment of Cra-loaded liposomes

Without exception Cra-loaded liposome formulations presented an initial similar macroscopic aspect of fluid colloidal yellowish suspension, ranging from opaque to clear, with a bluish hue reflect. This last property was taken for granted as a preliminary evidence for the formation of stable nanometric liposomes. This phenomenon was verified by determining the vesicle size distribution where large unilamellar vesicles were observed with a mean diameter of 285 ± 60 nm. The SEM morphological analysis showed spherical shaped and well-dispersed vesicles.

Liposome suspensions were submitted to mechanical resistance testing. It was observed that preparations supplied stability to the transport simulation test by

mechanical agitation. Liposomes remained stabilized without noticed physicochemical changes after centrifugation or under freeze-thaw cycles. The formulations presented the same macroscopic aspect and hold stability even after the sixth freeze-thaw cycle. These results are in agreement with those previously reported (Pontes et al., 1999).

The stability of liposome suspensions stored at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ was maintained for over 24 months. After this term the suspension of liposomes presented instability signs such as creaming, lipidic aggregates and loss of protein content. A slight gradual decrease in pH values was observed from 7.58 to 7.40 over a period of 60 days for liposome suspension stored at $4^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. This might indicate a slow lipid degradation that induced fatty acid formation. Pontes and co-workers (1999) have already shown that the main degradation pathway for a lipidic medium leads to the formation of fatty acids, interfering in the electrical conductivity and gradually reducing the pH of preparations.

The adjustment of the initial pH minimizes the phospholipid hydrolysis rate. Although such an issue had usually been used to control pH variation of liposome suspensions, this was not verified in the case of Cra loaded-liposomes. The phosphate buffered solution chosen as aqueous phase was not enough to prevent the pH decrease of liposome suspension under storage conditions. On the contrary, lyophilized Cra loaded-liposomes presented no pH alterations after redispersion. They also remained stabilized for over two years and encapsulated Cra preserved its HA activity.

3.4. In vitro release profile of Cra loaded-liposomes

The release of Cra loaded-liposomes is depicted in Fig. 1. Cra release profile was typecast for the majority of drug kinetics from nanocolloidal systems, which present two different steps. An initial burst of Cra released (60%) was attaining at the first 15 minutes of the kinetic process. This burst effect was probably due not only to the presence of non-entrapped Cra (~26 %) in the release medium, but also because of adsorbed Cra at the surface of liposomes. A fast Cra release from liposomes was then observed in view of the escaping tendency of the lectin to the incubation medium, which has low Cra concentration. Therefore, a second stage was succeeding by a gradual release attaining to 92% within two hours of the release experiment.

3.5. Antitumor activity of Cra loaded-liposomes

In the current work the effect of intraperitoneal administration of Cra loaded-liposomes on the tumor inhibition of Sarcoma 180-bearing mice was examined (Fig. 2). Tumor attained a remarkable shrinkage under Cra treatment, which reflect an antitumor action of the lectin. Measurements of tumor weight for experimental animal groups were depicted in Fig. 2a. A broad data dispersion was observed, especially in the control group. This discrepancy can be explained by the individual animal response to the implanted tumor. However, the treatment with Cra loaded-liposomes promoted a much uniform response with tumor weights ranging from 0.383 to 0.498 g (S.D. 0.029). A dramatic shrinkage of Sarcoma 180 (71%) occurred in response to the administration of Cra loaded-liposomes (Fig. 2b). A 30% improvement on tumor inhibition was achieved with the encapsulation of Cra into liposomes related to a free Cra solution treatment. Unexpected, a small tumor inhibition of 2% was verified for the treatment with empty liposomes. This effect could be credited to some scattering of individual response or even to the stimulation of the immune animal response by liposomes acting as foreign bodies. The mice body weight diminishing was more pronounced with the treatment of Cra-loaded liposomes (Fig. 2c), which corroborate the Cra antitumor activity.

A potent antitumor activity (88.5%) of the lectin extracted from oyster mushroom *Pleurotus osteratus* was observed against Sarcoma 180 after a long treatment with 1.5 mg/kg body weight/day for 20 days (Wang et al., 2000). In contrast, an inhibition of only 43% of Sarcoma 180 was achieved for the treatment with free Cra solution at a dose of 7mg/kg body weight/day for 7 days. This lower Cra activity was probably due to a deficient stimulation of the immunosystem during such a short period of time.

Based on the literature (Gabius et al., 1994; Timoshenko et al., 2001) the mechanism of the Cra antitumor activity can be speculated as an stimulating effect of the lectin on the animal immune system. Actually, it was reported that plant lectins such as *Viscum album* agglutinin (VAA, Mistletoe lectin) and *N,N'*-diacetylchitobiose-binding lectin from *Urtica dioica* are able to affect the functional activity of cells supposedly involved in antitumor immunity (Hajto et al., 1998). The VAA demonstrated to suppress growth and extent of tumor colonization when administered in small doses, which can also affect levels of cytokines and acute phase reactants in cancer patients. More recently, it was proved that VAA promoted a significant increase in the number of macrophages and a reduction on melanoma cells in mice lungs of and

also, CD4⁺ and CD8⁺ thymocytes were increased (Menges et al., 1997). In late years, immune stimulating effects of certain lectins have been the focus of considerable interest for application in cancer biotherapy (alternative medicine). In vitro, a galactose-specific lectin from *Viscum album* has been reported to upregulate the gene expression and secretion of pro-inflammatory cytokines including interleukin (IL)-1- α , IL-1- β , IL-6, IL-12, tumor necrosis factor (TNF)- α , interferon (IFN)- γ , and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) by human leucocytes (Timoshenko et al., 2001).

In spite of the reduction of Cra haemagglutinating activity after submission to ultrasound exposition, Cra encapsulated into liposomes might preserve its conformation and promoted a significant antitumor activity against Sarcoma 180, although, the precise Cra action mechanism remained somewhat misunderstood at the present time.

3.6. Histopathological Analysis

The histopathological analysis of Sarcoma 180 (Fig. 3) revealed that the treatment of animals with Cra loaded-liposomes promoted a reduction on the density of tumoral cells (Fig. 3c). As a consequence, the Cra toxicity was reduced in comparison to the control group (Fig. 3a) and the treatment with free Cra solution (Fig. 3b). The occurrence of fibrosis, extensive necrosis areas and an apparent proliferation of tumoral cells were observed.

A hepatotoxicity of Cra was also revealed as a result of lymphocyte infiltration in liver of animals treated with free Cra solution (Fig. 4). In contrast, no abnormalities were observed in liver for the treatment with Cra-loaded liposomes, corroborating the ability of liposomes to diminish Cra cytotoxicity. In effect, no morphological alterations were noticed on spleen and kidneys after treatment with Cra loaded-liposomes.

4. Conclusions

Results demonstrated that Cra haemagglutinating activity was modified under long time of exposure to ultrasound and mechanical stress. However, the entrapment of Cra into liposomes was able to preserve HA activity despite the liposome preparation involved a sonication step. Lyophilized Cra loaded-liposomes were obtained with spherical shaped vesicles, which maintained their stability over two years when stored

at 4°C. A highly efficient Cra encapsulation into surface positively charged liposomes was achieved. In sink conditions, the in vitro release profile of Cra loaded-liposomes was substantially faster, considering that over than 90% of the Cra content was delivered during the two hours of the release process. However, the encapsulation of Cra into liposomes promoted an improvement on its in vivo antitumor activity against Sarcoma 180 in relation to free Cra solution. Furthermore, histopathological analysis revealed that Cra encapsulation into liposomes promoted a reduction of its toxic effect on liver, spleen and kidneys. Achievements herein allow hypothesizing that Cra loaded-liposomes might have antitumor effect by stimulating the immune system of animals and offer a potential new therapeutic issue to be exploited as an adjuvant agent for cancer therapy.

Acknowledgements

This work received partial support from the Brazilian-French CAPES-COFECUB agreement (UFPE-Université PARIS-Sud XI, Grant # 269/99). The authors are also grateful for the partial support from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), under Grant # 304946/85-1, and fellowships. Authors also wish to thank Mrs. Carmelita L. B. Cavalcanti and Mr. Mario R. Melo Junior for their valuable technical assistance on the histopathological analysis.

References

- Amselen, S., Gabizon, A., Barenholz, Y., 1990. Optimization and upscaling of doxorubicin-containing liposomes for clinical use, *Am. Pharm. Assoc.* 79, 1045-1052.
- Barrat, G. M., 2000. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. *Pharm. Sci. & Technol. Today* 5, 163-171.
- Baszkin, A., Boissonade, M.M., Santos-Magalhães, N.S., Carvalho Jr., L.B., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., 2000. Cratylia mollis lectin at the air-aqueous solution interface: adsorption and lectin-lipid interactions. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 17, 191-201.
- Beltrão, E.I.C., Correia, M.T.S., Silva, J.F., Coelho, L.C.C.B., 1998. Binding evaluation of isoform 1 from Cratylia mollis lectin to human mammary tissues. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 74, 125-134.
- Bendas, G., Vogel, J., Bakowski, U., Krause, A., Müller, J., Rothe, U., 1997. A liposome-based model system for the simulation of lectin-induced cell adhesion. *Biochim. Biophys. Acta.* 1325, 297-308.
- Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., 1995. Purification of glucose-mannose specific lectin, isoform 1 from seeds of Cratylia mollis Mart. (camaratu bean). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 55, 261-273.
- Forssen, E., Willis, M., 1998. Ligand-targeted liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 29, 249-271.
- Gabius, H.J., Gabius, S., Joshi, S.S., Koch, B., Schroeder, M., Manzke, W.M., Westerhausen, M., 1994. From ill-defined extracts to the immunomodulatory lectin: will there be a reason for oncological application of Mistletoe? *Planta Med.* 60, 2-7.
- Geran, R. I., Greenberg, N. H., Macdonald, M. M., Schumacher, A. M., Abbott, B. J., 1972. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal and other biological systems. 3 edition, *Cancer Chemotherapy Reports*, 3, Part III, 2.
- Haas, H., Falcone, F.H., Schramm, G., Haisch, K., Gibbs, B.F., Klauke, J., Pöppelmann, M., Becker, W.-M., Gabius, H.-J., Schaak, M., 1999. Dietary lectins can induce in vitro release of IL-4 and IL-13 from human basophils. *Eur. J. Immunol.* 29, 918-927.

- Hajto, T., Hostanska, K., Weber, K., Zinke, H., Fischer, J., Mengs, U., Lentzen, H., Saller, R., 1998. Effect of a recombinant lectin, *Viscum album* agglutinin on the secretion of interleukin-12 in cultured human peripheral blood mononuclear cells and on NK-cell-mediated cytotoxicity of rat splenocytes in vitro and in vivo. *Nat. Immun.* 16, 34-46.
- Karasaki, Y., Tsukamoto, S., Mizusaki, K., Sugiura, T., Gotoh, S., 2001. A Garlic lectin exerted an antitumor activity and induced apoptosis in human tumor cells. *Food Res. Int.* 34, 7-13.
- Kompella, U.B., Lee, V.H.L., 2001. Delivery systems for penetration enhancement of peptide and protein drugs: design considerations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46, 211–245.
- Liener, I.E, Sharon, N., Goldstein, I.J. (Eds.), 1986. *The lectins: Properties, functions and applications on biology medicine.* Academic press, Orlando, FL.
- Mengs, U., Weber, K., Schwarz, T., Hostanska, K., Hajto, T., 1997. Antimetastatic effect of a standardized Mistletoe preparation on B16 melanoma cells in mice. *Eur. J. Cancer* 33, S48.
- Meyer, J., Whitcomb, L., Collins, D., 1994. Efficient encapsulation of proteins within liposomes for slow release in vivo. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 199, 433-438.
- Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 36-356.
- Pontes, A.C.O., Caetano, M.N.P., Santos-Magalhães, N.S., 1999. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of Benzathine Penicillin G liposomes. *S.T.P. Pharma Sci.* 9, 419-427.
- Sadzuka, Y., Hirota, S., Sonobe, T., 2000. Intraperitoneal administration of doxorubicin encapsulated liposomes against peritoneal dissemination. *Toxicol. Lett.* 116, 51-59.
- Timoshenko, A.V., Lan, Y., Gabius H.J., Lala P.K., 2001. Immunotherapy of C3H/HeJ mammary adenocarcinoma with interleukin-2, mistletoe lectin or their combination: effects on tumor growth, capillary leakage and nitric oxide (NO) production. *Eur. J. Cancer* 37, 1910-1920.
- Van Slooten, M.L., Boerman, O., Romoren, K., Kedar, E., Crommelin, D.J.A., Storn, G., 2001. Liposomes as sustained release system for human interferon- γ : Biopharmaceutical aspects. *Biochim. Biophys. Acta* 1530, 134-145.

- Wang, H.X., Gao, J., Ng, T.B., 2000. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus osteratus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 810-816.
- Wang, H.X., Ng, T.B., Liu, W.K., Ooi, V.E.C., Chang, S.T., 1996. Isolation and characterization of two distinct lectins with antiproliferative activity from the cultured mycelia of the mushroom *Tricholoma mongolicum*. *J. Peptide Protein Res.* 46, 508-513.
- Wirth, M., Hamilton, G., Gabor, F., 1998. Lectin-mediated drug targeting: quantification of binding and internalization of Wheat germ agglutinin and *Solanum tuberosum* lectin using Caco-2 and HT-29 cells. *J. Drug Target* 6, 95-104.
- Yamazaki, N., Kojima, S., Bovin, N.V., André, S., Gabius, S., Gabius, H.-J., 2000. Endogenous lectins as targets for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 43, 225–244.

Table 1.

Effects of ultrasonic agitation and mechanical stress on the Cra haemagglutinating (HA) activity

	Ultrasonic agitation (Continuous, 200 W power)			Mechanical stress (150 strokes/min)	
Time of exposure	100 (sec)	250 (sec)	500 (sec)	24 (h)	48 (h)
HA activity (Log)	3.01	2.71	2.71	3.01	2.71
[Cra] ng/ml	3.41	6.80	6.80	3.41	6.80

[Cra] = concentration of Cra corresponding to the haemagglutinating (HA) activity

List of Captions

Figure 1. *In vitro* release profile of Cra loaded-liposomes (5 ml, 700 µg/ml) in pH 7.4 phosphate buffered solution (50 ml) at 37°C using ultrafiltration/ultracentrifugation technique.

Figure 2. Evaluation of the effect of free Cratylia mollis lectin (Cra) in solution and Cra loaded-liposomes on the inhibition of mice-bearing Sarcoma 180 (5×10^6 inoculated cells/animal). Animal treatment regimens are performed as following (7 mg/kg/day for 7 days, 10 animals/group): Control received saline solution (group 1), empty liposomes (group 2), free Cra solution (group 3), and Cra loaded-liposomes (group 4). Cra activity was assessed on: Tumor weight scattering diagram (**a**); tumor inhibition in comparison with the control group (**b**), and body weight of treated animals (**c**).

Figure 3. Morphological aspect of Sarcoma 180 after treatments with free Cra solution and Cra-loaded liposomes, showing a normal proliferation of cells for the control animal group (**a**), a decrease on cellular density for the treatment with Cra loaded-liposomes (**b**) and the presence of necrosis areas for free Cra solution (**c**) (Magnification 400 ×). Arrows show necrosis areas.

Figure 4. Histopathological aspect of liver of animals treated with free Cra solution. Arrows indicate focal lymphocitary infiltration (Magnification 400 ×).

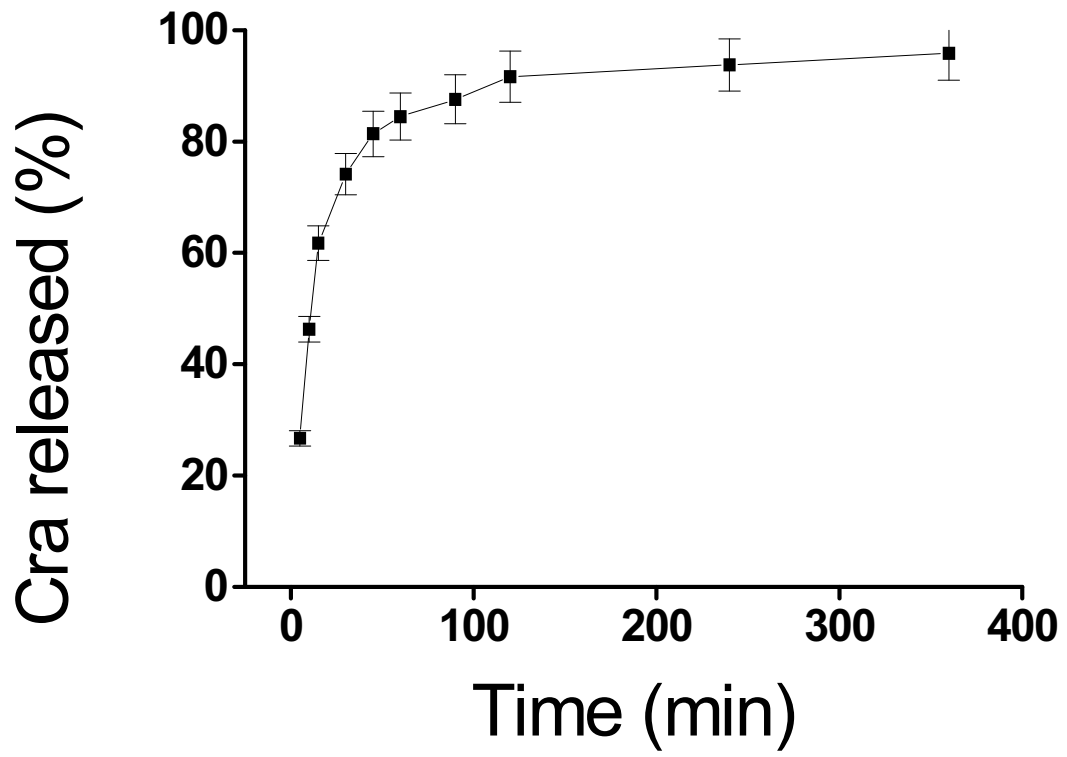


Fig. 1

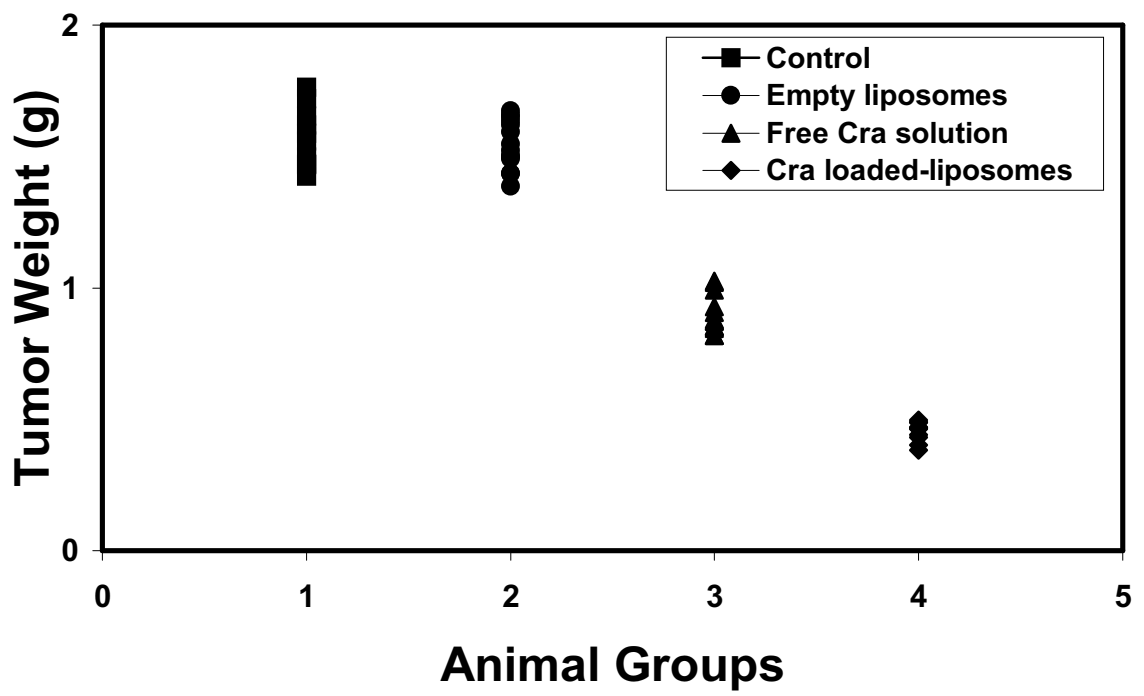


Fig. 2a

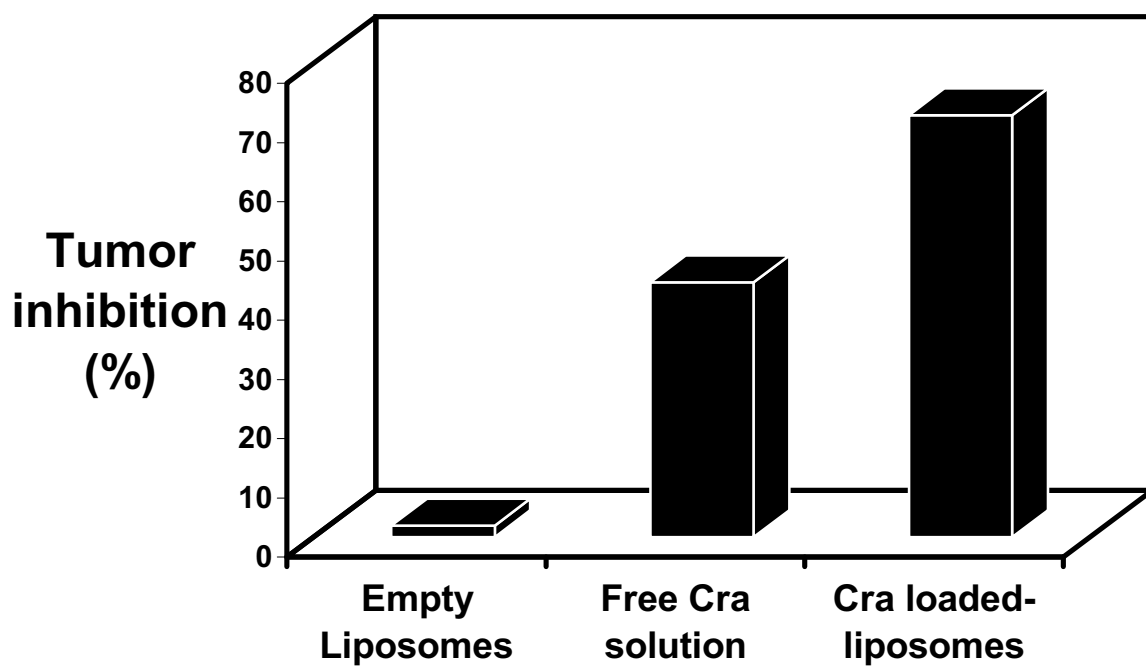


Fig. 2b

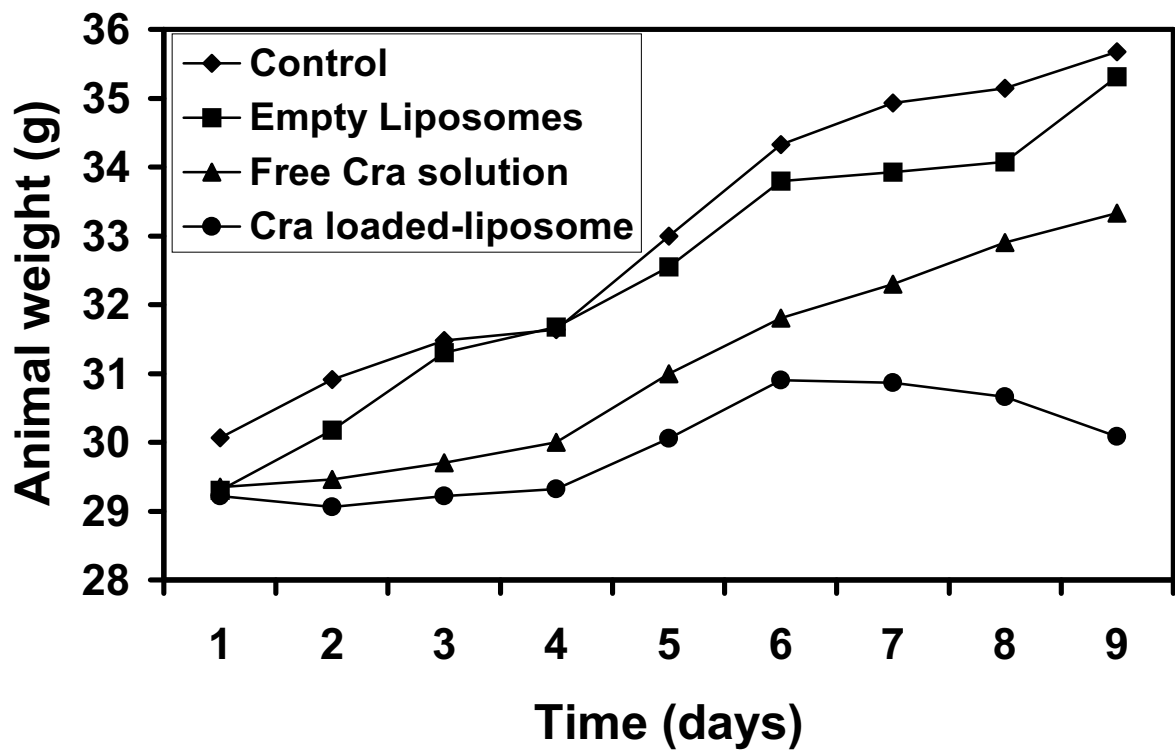


Fig. 2c

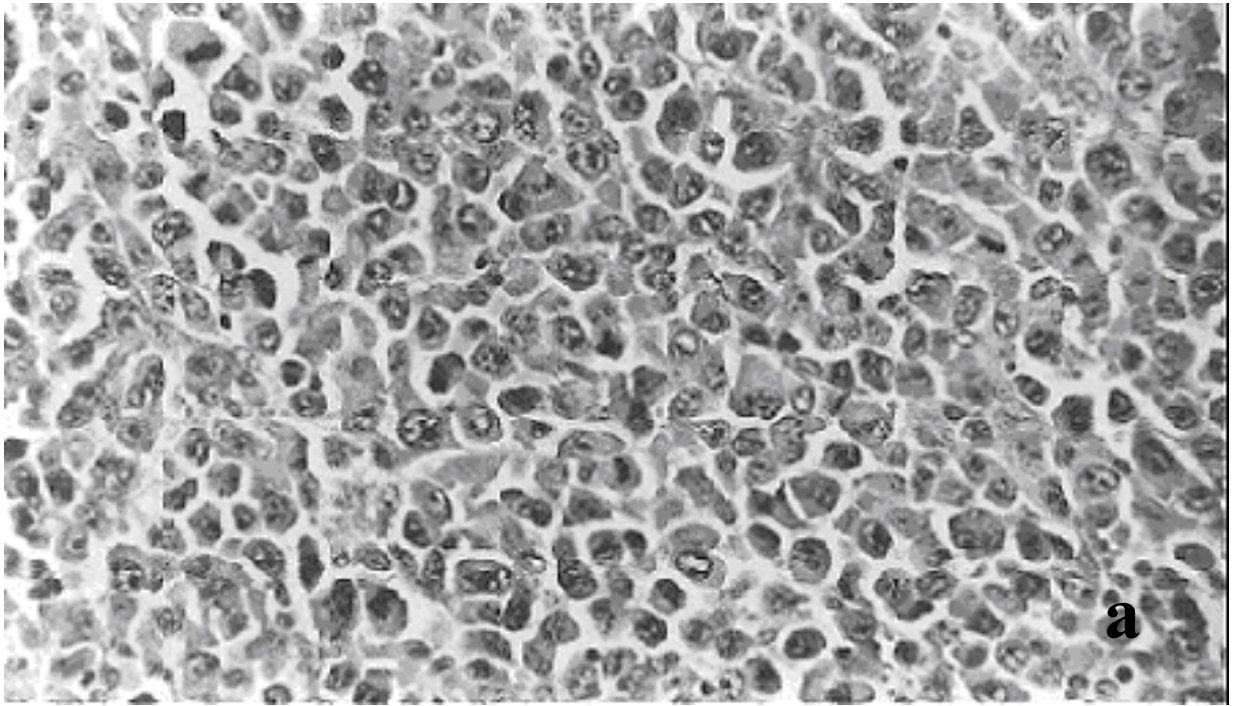


Fig. 3

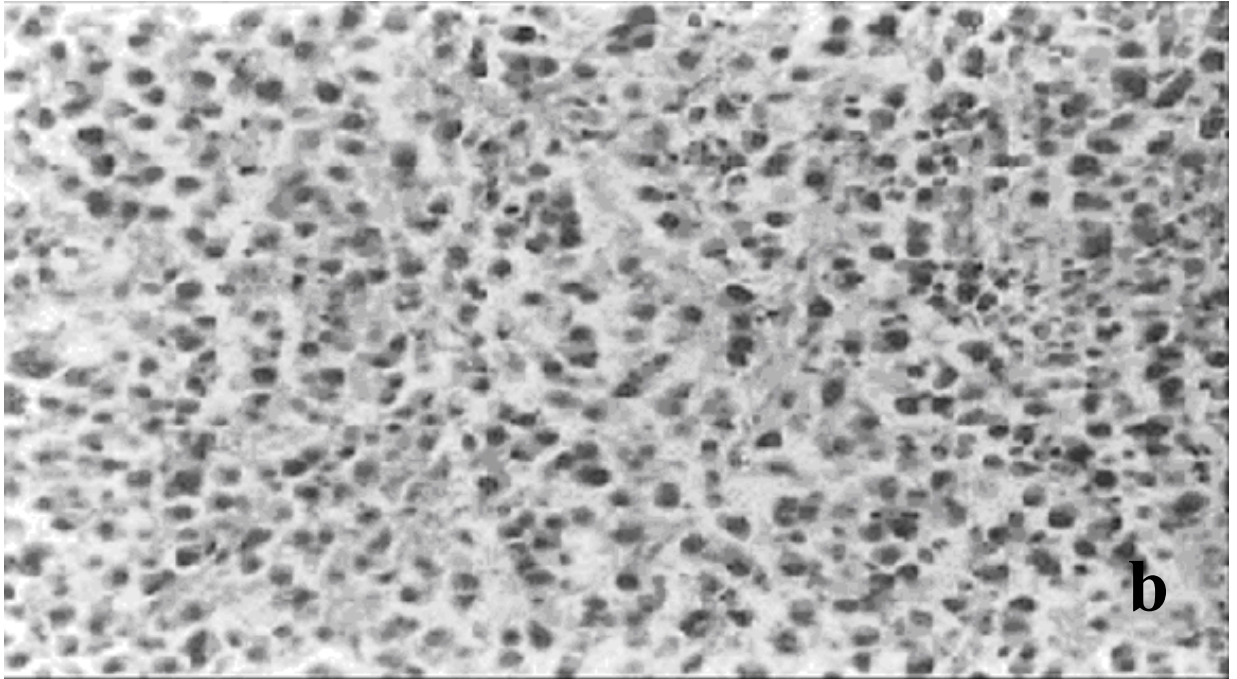


Fig. 3



Fig. 3

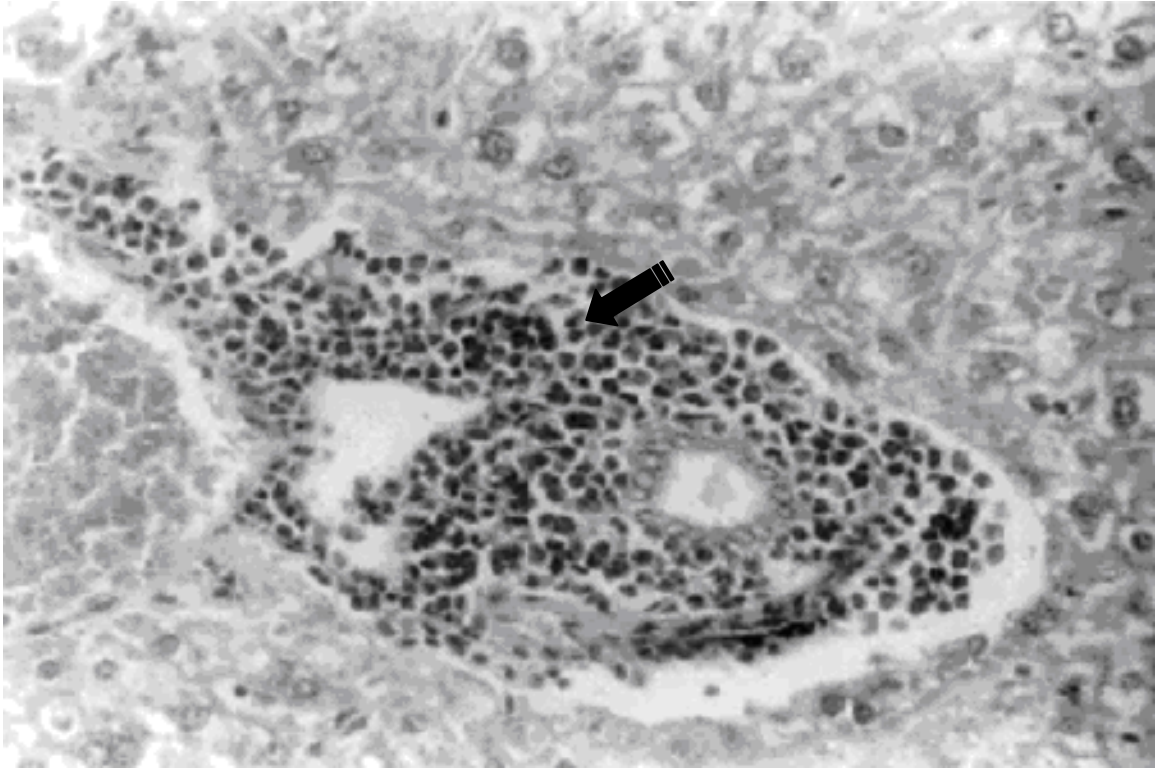


Fig. 4

CONCLUSÕES

As análises dos resultados obtidos na realização desta dissertação permitem elaborar as seguintes conclusões:

1. Os ensaios preliminares demonstraram que a Cra não manteve sua estabilidade avaliada pela atividade hemaglutinante quando submetida a condições agressivas da preparação e caracterização de lipossomas (ultra-sons e estresse mecânico).
2. Lipossomas SUV estáveis compostos de 36 μ mol de fosfolípido [PC, CH e SA (7:2:1)] contendo Cra encapsulada na concentração de 700 μ g/ml foram obtidos pelo método de redispersão de filme lipídico seguido de ultra-som.
3. Uma taxa de encapsulação de 84% de Cra nos lipossomas foi determinada.
4. Lipossomas contendo Cra apresentaram uma forma esférica e manteve sua estabilidade por mais de 1 ano quando armazenados a 4°C.
5. O estudo da cinética *in vitro* permitiu estimar a taxa de liberação da Cra das formulações de lipossomas. A liberação de lipossomas foi substancialmente rápida, considerando que mais de 50% de Cra foi liberada durante os primeiros 25 minutos do processo da cinética de liberação. Estes sistemas mostram uma liberação de Cra em duas horas.
6. A atividade antitumoral da Cra encapsulada (71%) demonstrou um potencial inibição do Sarcoma-180 de 28% em relação a Cra livre (43%).
7. As análises histopatológicas observaram uma redução dos efeitos tóxicos provocados pela Cra livre quando a mesma foi administrada por um sistema de liberação controlada.
8. A encapsulação da Cra em lipossomas potencializa a atividade antitumoral e diminui a toxicidade.
9. Os achados deste estudo sugerem Cra-lipossomas como uma nova possibilidade terapêutica, devido a sua estabilidade e atividade antitumoral.