

Em busca de lipossomas inteligentes para a administração de drogas para a tuberculose
Searching smart liposomes for drug administration in tuberculosis

Tulio Nakazato da Cunha¹, Ida Caramico Soares², Elizabeth N. De Gaspari¹

¹Seção de Imunologia, da Divisão de Biologia Médica, do Instituto Adolfo Lutz, da Coordenadoria de Controle de Doenças, da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo – IAL/CCD/SES-SP, ²Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – FCF/USP

Resumo

A tuberculose pulmonar é uma doença infectocontagiosa, cuja transmissão se dá através das vias aéreas. Possui evolução crônica e é causada no homem pelo *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*. A tuberculose tem ressurgido nos dias atuais de uma forma mais intensa em decorrência do advento especial do vírus HIV, representando um sério problema em saúde pública. O longo tempo em que o paciente deve receber medicação, associado a um grande número de efeitos adversos, é uma das causas de insucesso do tratamento da doença. Esta situação pede medicamentos de liberação modificada para tratamento de tuberculose, afim de se melhorar a adesão ao tratamento aliada a um maior bem-estar para este paciente. Os lipossomas são modernos veículos da medicina. Quando em vacinas, eles funcionam como uma alternativa às formas de subunidades e aos adjuvantes clássicos, gerando produtos eficazes, de efeito duradouro, sem causar reações de hipersensibilidade e de possível liofilização. Estas formas farmacêuticas são muito específicas, conseguindo atingir até mesmo regiões bem determinadas, como receptores celulares, além de gerarem menos efeitos secundários. Os lipossomas têm menos toxicidade uma vez que necessitam de doses pequenas para cumprirem seu efeito terapêutico. O objetivo deste artigo científico é desenvolver lipossomas contendo em seu interior um importante fármaco anti-tuberculoso, a rifampicina.

Palavras-chave: tecnologia farmacêutica; biotecnologia; lipossoma; anticorpos monoclonais; tuberculose; medicina.

Abstract

Tuberculosis is an infectious disease, transmitted by air. This disease has chronic evolution and is caused, among men, by *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* and *M. microti*. Tuberculosis has reemerged, presently, in a more intense rate, due to the special advent of HIV virus, posing a serious public health problem. The long time during which the patient must receive medication, associated to a high rate of adverse events, is one of the major reasons for the failure in tuberculosis treatment. This situation requests medicines with modified liberation, in order to improve treatment adherence, associated to a better welfare to these patients. Liposomes are modern vehicles in medicine. In vaccines, they act as an alternative to subunit forms and classic boosters, leading to effective products, of long lasting effects, with no hypersensitive reactions and which may be lyophilized. These pharmaceutical forms are quite specific, and are able to reach specific regions, such as cellular receptors, as well as generating less secondary effects. Liposomes have lesser toxicity, since they need only small doses in order to reach therapeutic effects. The objective of this study is to develop liposomes packed with an important anti-tuberculosis medicine, rifampicin.

Key words: pharmaceutical technology; biotechnology; liposome; monoclonal antibody; tuberculosis; medicine.

Introdução

A tuberculose pulmonar é uma doença infectocontagiosa, cuja transmissão se dá através das vias aéreas. Possui evolução crônica e é causada no homem pelo *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*¹.

A doença continua sendo um sério problema de saúde pública. Os avanços no seu conhecimento e a tecnologia disponível para seu controle e tratamento não têm sido suficientes para controlar significativamente a sua morbidade e a sua mortalidade, principalmente nos países em desenvolvimento².

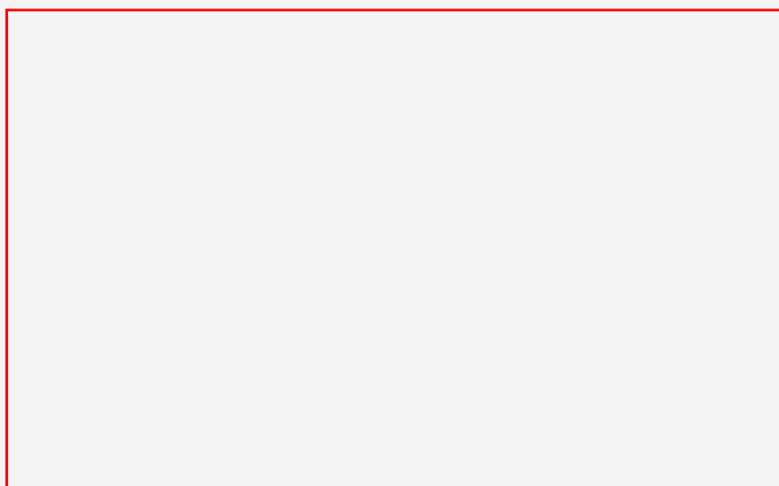
Devido à gravidade da situação e à facilidade de proliferação, já que o bacilo se dissemina pelo ar, a Organização Mundial da Saúde (OMS) decretou, em abril de 1993, emergência global contra a tuberculose e, desde então, vem desenvolvendo políticas para conter o crescimento de casos. De acordo com o relatório publicado, que também criticou a falta de estratégias para o controle das doenças, mais da metade dos novos casos registrados em 1997 ocorreu em países do Sul da Ásia, África e América Latina.

A revisão e a atualização de normas técnicas, incorporando os avanços na profilaxia e tratamento, fizeram-se necessárias. O Brasil elaborou um plano emergencial para o controle da tuberculose, objetivando que 100% dos municípios tenham ações de diagnóstico e tratamento da tuberculose, 80% dos centros de saúde desenvolvam essas ações, 90% dos casos existentes sejam diagnosticados e 85% dos casos tratados sejam curados².

Apesar desse esforço, a tuberculose persiste como importante problema de saúde pública no País, representado por cerca de 90.000 casos novos e mais de 5.000 mortes anuais. A redução da taxa de incidência de casos, embora sustentada, é pouco expressiva (2% ao ano para a forma pulmonar positiva). Há um relatório da OMS falando da situação preocupante da doença no Brasil².

Esse panorama tende a se agravar por várias causas, destacando a crise econômica, a deterioração dos serviços de saúde e a epidemia do vírus HIV². Piorando a situação, a tuberculose ainda é pertencente a um grupo intitulado de "doenças negligenciadas", pelo fato de que atingem principalmente os países em desenvolvimento ou chamados subdesenvolvidos. Segundo Yves Champey, presidente do conselho da organização não-governamental Drogas para Doenças Negligenciadas, isso faz com que dos 70 bilhões de dólares investidos anualmente pela indústria farmacêutica mundial apenas 10% sejam direcionados para o estudo de doenças que acometem 90% da população global, tendo a tuberculose dentre elas, e que de todos os novos fármacos desenvolvidos no período de 1975 a 1999 apenas 1% se destina às doenças tropicais.

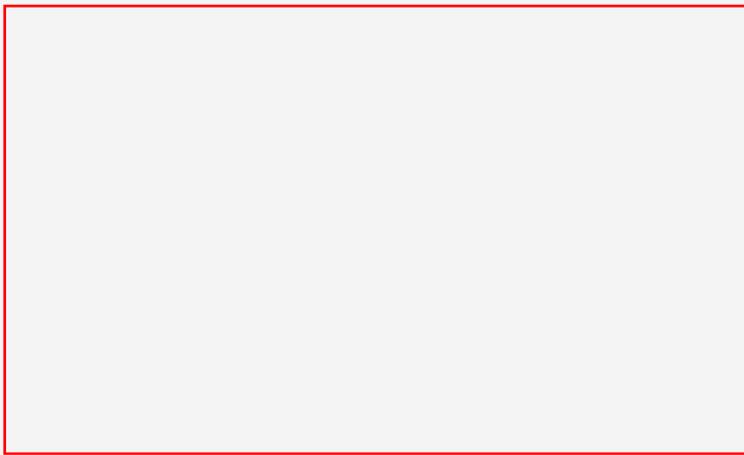
Segundo a OMS, o número de casos novos registrados no Brasil em 2000 foi de aproximadamente 116 mil.



Fonte: Sinan – GTSinan/Cenepi Funasa – MS e SES (2002)

** 2001 e 2002 dados parciais.

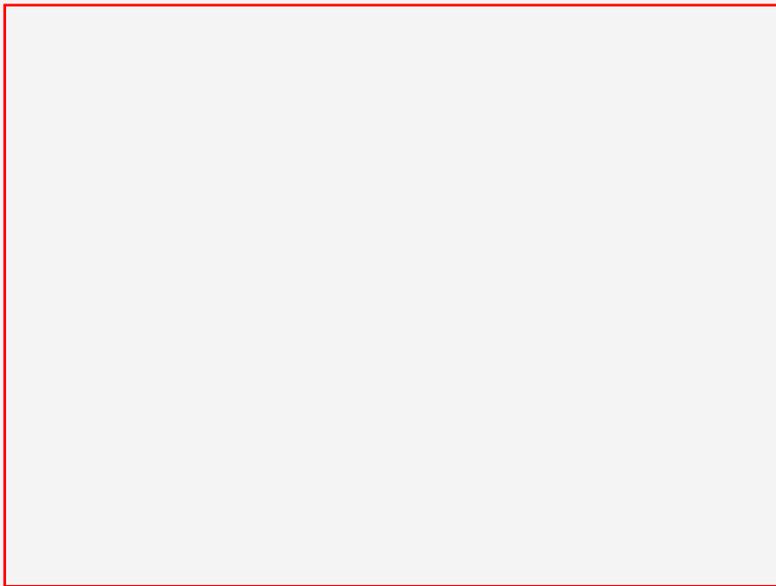
Tendência 1990 - 2002. Número de casos novos – Brasil



Tuberculose casos novos – 2000

O Estado de São Paulo é responsável pelo maior número absoluto de casos novos (19.000 a 20.000) notificados anualmente no País, com um coeficiente de incidência de 50/1000.000 habitantes. A incidência tem-se mantido estável nos últimos anos, porém estão sendo registrados 1.500 óbitos por ano em território paulista, com aumento de gravidade dos casos por ocasião do diagnóstico³.

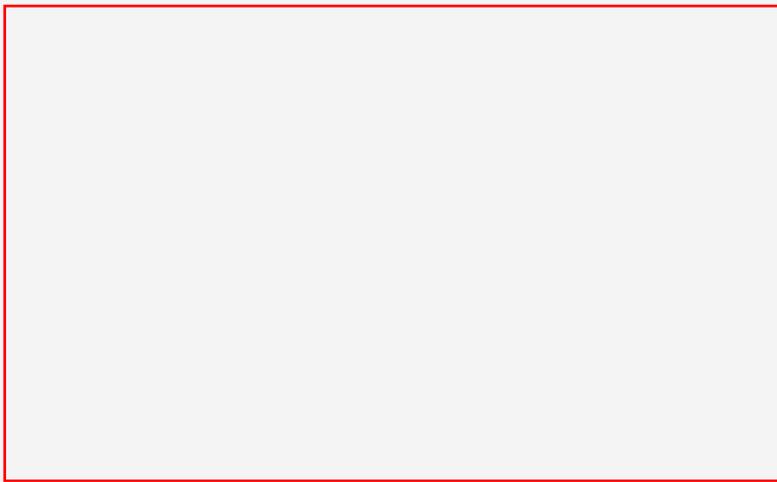
A taxa de mortalidade sofre flutuações, segundo as diversas faixas etárias: alcança valores elevados entre 0 e 4 anos, decresce a partir dessa idade, tornando a se elevar dos 10 aos 14 anos, para chegar ao pico máximo entre idosos a partir dos 60 anos^{2,3, 4}.



Fonte: SIM/Datasus/Óbitos por 100 mil habitantes

Coeficiente de mortalidade por tuberculose Brasil – 2000

Os alcances atuais do programa são: 1) vacinação de 90% dos menores de 1 ano, 2) descoberta de 75% da estimativa de casos e 3) resultados favoráveis de 75% dos pacientes que iniciam tratamento. Estas ações governamentais têm colaborado para a redução do problema da tuberculose no Brasil².



Fonte: Sinan/CRPHF/Ceneipi/Funasa – ATPS/SPS/MS

Coefficientes de incidência de tuberculose pulmonar +, Brasil – 2000

Sem mudança no quadro atual, a situação se compara a de uma bomba relógio e, segundo estimativas alarmantes da própria OMS, surgirão no mundo mais de um bilhão de novos casos de tuberculose até 2020.

Patogenia

A tuberculose pode ser causada por várias espécies de micobactérias, sendo o principal agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis*, bacilo aeróbio obrigatório de caráter álcool-ácido resistente. As micobactérias são caracterizadas pelo alto teor de lipídios em seu envelope, o que confere grande resistência às condições ambientais adversas, podendo sobreviver por semanas em meio completamente seco e resistir a alguns antimicrobianos utilizados como antissépticos e desinfetantes⁴. O *M. tuberculosis* faz parte de um pequeno grupo de espécies capazes de sobreviver no interior de células fagocíticas do hospedeiro animal. É provável, portanto, que seu envelope apresente propriedades de defesa contra processos microbicidas⁴.

O modo mais comum de aquisição da tuberculose se dá pela inalação de bacilos que são expelidos pela tosse, fala ou espirro de portadores da doença em sua forma ativa³. Um espirro pode produzir mais de um milhão de núcleos infecciosos, que são muito estáveis e se mantêm suspensos no ar por um longo período de tempo; e partículas com diâmetro de até 5 µm, contendo de 1 a 3 bacilos, atingem os espaços alveolares. O número de bacilos inalados necessários para se estabelecer a infecção não é exatamente definido, por depender da virulência do bacilo e da resistência do hospedeiro. Porém, estudos indicam que este número esteja entre 10 e 50 unidades, cerca de 6% dos bacilos inalados⁴.

Os métodos disponíveis para diagnóstico da tuberculose compreendem exames radiológico, imunológico e bacteriológico, aplicáveis de acordo com a forma e estágio da doença. O exame radiológico é indicado para indivíduos sintomáticos com baciloscopia negativa. A prova tuberculínica é utilizada como método auxiliar de diagnóstico de TB em pessoas não vacinadas com BCG. Realiza-se a cultura do bacilo para indivíduos suspeitos de tuberculose pulmonar, negativos ao exame direto, e para diagnóstico de formas extra-pulmonares. A baciloscopia direta no escarro é o método de escolha por ser simples, de baixo custo, seguro e, principalmente, por permitir identificar casos bacilíferos, fontes de propagação da doença⁴.

De modo geral, a patogênese da tuberculose pode ser dividida em estágios que ocorrem seqüencialmente durante a evolução da doença, sem intervenção terapêutica. O primeiro estágio se inicia com a inalação do bacilo da tuberculose e sua subsequente instalação em um alvéolo pulmonar, onde é capturado por macrófagos alveolares⁴.

A evolução para o próximo estágio é dependente de três fatores: virulência do microrganismo, carga bacilífera e resistência do hospedeiro. Se os macrófagos alveolares falharem em destruir o bacilo, este se multiplica até que o macrófago se rompa, liberando uma nova geração de bacilos que serão então fagocitados por outros macrófagos alveolares e por macrófagos imaturos provenientes da corrente sanguínea⁴.

Inicia-se, então, o segundo estágio da patogênese, caracterizado por relacionamento simbiótico no qual o macrófago não ativado é incapaz de destruir ou inativar o bacilo, que, por sua vez, não agride o macrófago, pois

o hospedeiro ainda não desenvolveu hipersensibilidade tuberculínica⁴. Na primo-infecção, como o hospedeiro apresenta-se destituído de resistência específica, os bacilos proliferam-se com desenvolvimento de lesão com reação inflamatória aguda ou subaguda.

Quando a multiplicação logarítmica dos bacilos no interior dos macrófagos cessa, se inicia o terceiro estágio da doença, o que se dá de 2 a 3 semanas após a inalação do bacilo. O hospedeiro se torna tuberculina-positivo e as lesões apresentam necrose caseosa. O bacilo é capaz de sobreviver em material caseoso sólido, mas aparentemente não pode multiplicar-se devido a condições desfavoráveis, como falta de oxigênio, pH reduzido e presença de ácidos graxos inibitórios⁴. Se o número de bacilos for pequeno, a probabilidade de regressão da lesão é maior. Porém, se a carga bacilífera for maior, ocorre aumento das lesões que se convertem em tubérculos, caracterizados por formações nodulares constituídas por uma região central onde se encontram células gigantes tipo Langhans, uma região média de células epitelióides e uma camada periférica de fibroblastos, linfócitos e monócitos⁴.

Em indivíduos imunologicamente debilitados o quarto estágio da doença é caracterizado pela fagocitose de bacilos oriundos dos cáseos por macrófagos não ativados ou fracamente ativados, que permitem sua multiplicação intracelular, resultando em crescimento da área de necrose caseosa e migração, através dos canais linfáticos e sistema circulatório, para vários órgãos, em especial aqueles de maior oxigenação⁴. Este tipo de disseminação hematogênica pode causar tuberculose miliar, caracterizada pela ocorrência de vários pequenos tubérculos de tamanho uniforme, ocorrendo simultaneamente nos pulmões ou fígado, baço e rins. Em indivíduos resistentes, os macrófagos capazes de inibir a multiplicação dos bacilos se acumulam em grande quantidade em torno do centro caseoso, resultando em redução ou interrupção dos danos teciduais⁴.

O quinto estágio é caracterizado pela liquefação do cáseo e formação de cavidade. O material liquefeito constitui-se em excelente meio para proliferação dos bacilos que se multiplicam extracelularmente. As paredes de brônquios adjacentes se tornam necróticas, formando uma cavidade que ao se romper descarrega bacilos e material caseoso liquefeito, atingindo outras regiões do pulmão. Ao tossir, falar ou espirrar, o doente dissemina este material infeccioso para o meio externo. A ruptura de vasos localizados na parede ou lúmen da cavidade é a causa mais comum da hemoptise, presente em estágios avançados da doença⁴.

Anticorpos monoclonais

“É possível hibridizar células produtoras de anticorpos de origens diversas. Esses híbridos podem ser cultivados *in vitro*, em grandes quantidades e produzir anticorpos específicos, o que poderia ter importância na medicina e na indústria.” O trabalho no qual foram baseadas essas palavras deu a C. Milstein e G. Köhler o Prêmio Nobel de Medicina, em 1984, e significou um salto no desenvolvimento das mais diversas áreas das ciências biológicas.

Qualquer estrutura molecular capaz de ativar linfócitos B pode ser usada para a geração de hibridomas, por uma metodologia original básica muito simples na sua concepção, ainda que laboriosa. Animais, principalmente camundongos, são imunizados com a molécula ou a célula ou o microorganismo de interesse. Quando o teste específico do soro do animal imunizado torna-se positivo, as células do baço são retiradas e fusionadas com células de mieloma, o que lhes confere imortalidade. Cultivados em meio de cultura seletivo em clonagens subseqüentes os hibridomas são analisados em relação ao anticorpo que produzem, garantindo especificidade. A metodologia dos anticorpos monoclonais, inicialmente praticada por imunologistas, tornou-se rapidamente um instrumento essencial para pesquisadores de diferentes áreas.

Além do impacto óbvio que o uso de anticorpos monoclonais exerce na geração de conhecimento, a obtenção de hibridomas secretando anticorpos monoclonais com alta especificidade e afinidade revolucionou a área de diagnóstico ao permitir a diferenciação entre patógenos, tarefa impossível para os soros policlonais em função da reatividade cruzada causada por antígenos comuns dominantes. O uso de padrões conhecidos possibilita a quantificação, importante no caso da dosagem de hormônios e marcadores celulares, cuja frequência delimita o estado patológico, por exemplo, câncer^{5,6,7,8,9}.

Fonte: Abbas AK & Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology. Quinta edição. 2003.

Figura 1. Representação da estrutura da molécula da imunoglobulina IgG.

Tratamento e profilaxia

BCG e quimioprofilaxia

As medidas de caráter profilático incluem a vacinação e a quimioprofilaxia, sendo a segregação do paciente recomendada apenas em casos severos por curtos períodos.

A vacina BCG, sigla para Bacilo de Calmette-Guérin, é produzida a partir de subcepas vivas e atenuadas, derivadas de *Mycobacterium bovis*. Parte integrante de programas nacionais de controle, a vacina confere imunidade a indivíduos não infectados, diminuindo o risco de desenvolvimento da doença ao estimular resposta imunológica mais rápida e intensa à infecção pelo bacilo. A imunidade conferida pela vacina, porém, é de caráter temporário e variável de 70% a 80%¹⁰.

No Brasil, a vacinação é obrigatória para crianças menores de 1 ano e, prioritariamente, indicada para crianças de 1 a 4 anos. As recomendações de vacinação abrangem recém-nascidos que tenham peso igual ou superior a dois quilos, mesmo os HIV positivos, desde que não apresentem sintomas da síndrome, bem como para trabalhadores da área de saúde em contato com possíveis infectantes. A revacinação deve ser realizada para todas as crianças por volta de 6 anos de idade¹⁰.

A quimioprofilaxia visa à prevenção do desenvolvimento de tuberculose pela administração de quimioterápicos a indivíduos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* que não desenvolveram a doença e a indivíduos sob alto risco de contágio. Além dos benefícios diretos pela proteção individual, a grande importância da quimioprofilaxia está na interrupção da propagação do bacilo a partir de doente bacilífero¹⁰. A isoniazida tem sido recomendada para este procedimento devido à sua comprovada capacidade de reduzir o desenvolvimento da doença¹⁰.

O esquema quimioprofilático recomendado pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose do Ministério da Saúde (PNCT/MS) consiste na administração diária de isoniazida na dosagem de 10 mg/Kg de peso, com dosagem máxima de 400 mg, por período de seis meses. O tratamento é indicado para comunicantes intradomiciliares de bacilíferos, adultos e menores de 5 anos ainda não vacinados, recém-nascidos coabitantes de foco bacilífero, comunicantes soropositivos para HIV ou imunodeprimidos¹⁰.

Quimioterápicos

A quimioterapia para doenças micobacterianas foi iniciada em 1944, quando, pela primeira vez, administrou-se estreptomicina, com resultados notáveis, em um paciente com tuberculose pulmonar progressiva que não respondia aos meios curativos disponíveis na época. Até então, os procedimentos adotados visando à cura da doença eram baseados em isolamento, repouso do paciente, dieta reforçada, ar puro e, em casos muito avançados, procedimentos cirúrgicos, como a toracoplastia¹⁰.

O advento da quimioterapia inaugurou uma nova era no tratamento da tuberculose, reduzindo dramaticamente as taxas de morbi-mortalidade e dando fim ao prolongado período de tratamento que, por vezes, se estendia por toda vida do doente.

O objetivo da quimioterapia é erradicar os bacilos nos vários ambientes em que se encontram no organismo do hospedeiro. A maior carga bacilífera é representada pelos bacilos extracelulares que se multiplicam nas paredes das cavidades e meio líquido necrótico. Mas ainda se faz necessário combater os bacilos extracelulares encontrados em material caseoso e os bacilos no interior dos macrófagos, ambos de crescimento lento. Os bacilos em estado latente não podem ser atacados pela quimioterapia convencional até que iniciem processo de multiplicação¹⁰.

Esta necessidade de combater o bacilo da tuberculose em diferentes ambientes, em parte, explica a utilização de mais de um fármaco no tratamento da doença, uma vez que cada um deles tem um espectro de ação específico. Porém, a razão principal consiste na prevenção da emergência de cepas resistentes a um ou mais fármacos, pois a ação combinada de dois ou mais destes agentes resulta em rápida destruição dos bacilos em seus vários estágios evolutivos¹⁰.

Os fármacos correntemente utilizados no tratamento de TB são divididos em dois grupos, de acordo com a

eficácia e a toxicidade apresentadas. Os fármacos de primeira linha, também chamados de fármacos de escolha, são a isoniazida, a rifampicina, a pirazinamida, a estreptomicina e o etambutol. O grupo de fármacos de segunda linha é formado por etionamida, ácido p-amino-salicílico, canamicina, amicacina, ciclosserina, capreomicina, tioacetazona e ofloxacino¹⁰.

A isoniazida (INH), principal fármaco do arsenal antituberculose, surgiu da observação de atividade antimicobacteriana da nicotinamida e subsequente avaliação de seus análogos¹⁰. Seu mecanismo de ação não está completamente esclarecido, porém sabe-se que envolve a inibição da síntese de ácidos micólicos, componentes essenciais da parede celular do bacilo. Outros mecanismos de ação foram propostos, incluindo a ação como antimetabólito para NAD ou piridoxal fosfato¹⁰. A INH é um bactericida efetivo contra bacilos em crescimento do complexo *M. tuberculosis*, tendo atividade variável *in vitro* contra micobactérias não causadoras de tuberculose e nenhuma atividade contra *M. avium*¹⁰.

A isoniazida é bem absorvida, atingindo concentrações plasmáticas entre 3 e 5 µg/ml de 1 a 2 horas após uma dose oral de 300 mg. É metabolizada pelo fígado à acetilhidrazida, ácido nicotínico e isonicotinil glicina. Aproximadamente 75% a 95% da dose administrada é excretada na urina após 24 horas, como INH e seus metabólitos. O efeito adverso mais comum é a neuropatia periférica, causada pelo aumento da excreção de piridoxina (vitamina B6) induzida pela INH¹⁰.

A pirazinamida (PZA) também é um análogo da nicotinamida, cujo mecanismo de ação não é conhecido. Possui espectro restrito de ação, apresentando atividade bacteriostática contra *M. tuberculosis*, porém é inativa contra *M. bovis*. A importância da utilização de pirazinamida reside em sua capacidade de destruir bacilos no interior dos monócitos. Estudos sugerem que PZA seja um pró-fármaco do ácido pirazinóico, sendo este último responsável pela atividade. A maior importância do emprego de PZA está em sua aplicação em terapias de curto prazo, complementando a atividade da isoniazida e rifampicina. Os efeitos adversos mais comuns estão relacionados à hepatotoxicidade e hiperuricemia¹⁰.

A rifampicina (RMP), sintetizada pela primeira vez em 1965, é resultante de modificações moleculares efetuadas em compostos com atividade antimicrobiana, as rifamicinas. É um fármaco bactericida importante no tratamento de doenças causadas por micobactérias em geral, apresentando boa atividade contra *M. tuberculosis* intra e extracelular, atividade mediana contra o complexo *M. avium* e baixa atividade contra *M. fortuitum*¹⁰. O mecanismo de ação da RMP parece ser a inibição de β-subunidade de RNA polimerase DNA-dependente. De grande importância para o desenvolvimento dos regimes de curta duração, combinado à isoniazida permitiu a redução do tratamento de 18-24 meses para 6-9 meses¹⁰. A rifampicina é metabolizada no fígado por deacetilação, sendo o metabólito eliminado na urina. A administração de doses elevadas, acima de 15 mg/Kg, tem sido associada à ocorrência de anemia, falha renal aguda e leucopenia¹⁰.

Antibiótico da classe dos aminoglicosídeos, a estreptomicina (SM) tem atividade bactericida contra micobactérias extracelulares. O mecanismo de ação parece ser a inibição de síntese protéica por ligar-se à subunidade 30 S ribossômica, o que resulta em danos à membrana do bacilo. É administrada por via parenteral por ser escassamente absorvida a partir do intestino. Distribui-se amplamente pelos fluidos orgânicos, acumulando-se nos tecidos, com liberação lenta. Entre os efeitos adversos, pode causar dano ao oitavo nervo craniano, nefropatia e ototoxicidade¹⁰.

O etambutol (EMB) é um tuberculostático desenvolvido a partir de um programa de *screening*, no qual vários análogos de N, N'-diisopropil-etilenodiamina foram sintetizados e testados, resultando o etambutol como o composto mais ativo¹⁰. Quase todas as cepas de *M. tuberculosis* e *M. kansasii*, e muitas cepas do complexo *M. avium*, são sensíveis a este fármaco. A importância de seu emprego reside em sua capacidade de suprimir o crescimento da maioria dos bacilos resistentes à isoniazida e estreptomicina. Embora o mecanismo de ação não esteja completamente esclarecido, o EMB parece inibir a incorporação de ácido micólico na parede celular micobacteriana. A dose usual de 15 mg/Kg é bem tolerada, com raros relatos de neurite retrobulbar, seu mais importante efeito adverso, relacionado à dose e duração da terapia. A acuidade visual deve ser acompanhada durante o tratamento¹⁰.

A tioacetazona (TZA) é uma tiosemicarbazona de baixa atividade antimicobacteriana, porém indicada para utilização com isoniazida e estreptomicina por não apresentar resistência cruzada em relação a estes fármacos. Seu uso clínico apresenta limitações devido a sérios efeitos adversos, como perturbações gastrointestinais e anemia. Seu mecanismo de ação é desconhecido¹⁰.

Esquemas de tratamento

Em linhas gerais, o tratamento da tuberculose é dividido em duas fases. Uma intensiva ou de ataque, durante a qual o objetivo é destruir a população de bacilos que estão se multiplicando; outra, de manutenção ou continuação, que visa destruir os bacilos que se encontram em estado latente e aqueles não atingidos pela primeira fase. Um número maior de fármacos é usado na primeira fase, que pode variar de 1 a 2 meses, do que os empregados na de manutenção, cuja duração varia de 4 a 10 meses. Nos regimes para tratamento de casos novos são usados fármacos de primeira linha: isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol. Em alguns países subdesenvolvidos emprega-se a tioacetazona por seu baixo custo¹⁰.

Os regimes de tratamento de TB são expressos utilizando-se um código padrão composto de números e letras, no qual os números indicam a duração do tratamento, em meses, e as letras representam o fármaco utilizado, a saber: H para isoniazida, T para tioacetazona, R para rifampicina, S para estreptomicina, E para etambutol e Z para pirazinamida. Um número subscrito após a letra que designa o fármaco indica o número de vezes por semana em que este deve ser administrado¹⁰.

Na década de 1960, o regime padrão 2STH/10-16TH, utilizado em muitos programas nacionais de controle, demandava de 12 a 18 meses de tratamento. Este prazo foi reduzido para seis meses em 1993, com o regime de curta duração 2HRZE/4HR, recomendado pela OMS e pela American Thoracic Society. Apesar dos custos elevados dos fármacos utilizados nestes regimes, comparados ao aplicado anteriormente, a sua adoção resultou em benefícios evidentes, índices de cura mais elevados, maior aderência do paciente ao tratamento e notável redução do surgimento de resistência micobacteriana. Além destas vantagens, a quimioterapia de curto prazo demonstrou melhor relação custo-benefício¹⁰.

Existem várias combinações de fármacos para elaborar diferentes regimes adequados ao orçamento e ao sistema de saúde de cada país. Em situações especiais os esquemas não se aplicam, sendo necessária prescrição individualizada¹⁰.

Lipossomas

Diante do exposto, temos que um dos mais modernos representantes do mecanismo de liberação prolongada consiste nos chamados vetores medicamentosos. Dentre estes, podemos citar como exemplos os lipossomas, estruturas vesiculares e microscópicas formadas, basicamente, por fosfolipídios organizados em bicamadas concêntricas que circundam compartimentos aquosos. Devido a suas propriedades anfifílicas, os lipossomas podem incorporar substâncias tanto no compartimento aquoso como na bicamada lipídica. Eles são formados espontaneamente, quando lipídios anfifílicos são dispersos em água.

Os componentes formadores dos lipossomas se agregam, formando, assim, as bicamadas que se fecham sobre si mesmas e as estruturas esféricas, onde uma ou mais camadas lipídicas englobam parte da solução de fármaco no seu interior. Eles possuem inúmeras vantagens em relação a outras formas farmacêuticas, entre as quais podemos ressaltar a sua grande especificidade, o que possibilita o exercício de sua atividade farmacológica, com diminuição de efeitos secundários. Como conseguem atingir um alvo bem determinado, até mesmo receptores celulares específicos, os vetores medicamentosos tornam-se bem menos tóxicos e necessitam de posologia menor para realizarem o mesmo efeito terapêutico, o que leva, também, a uma diminuição drástica no tempo total do tratamento.

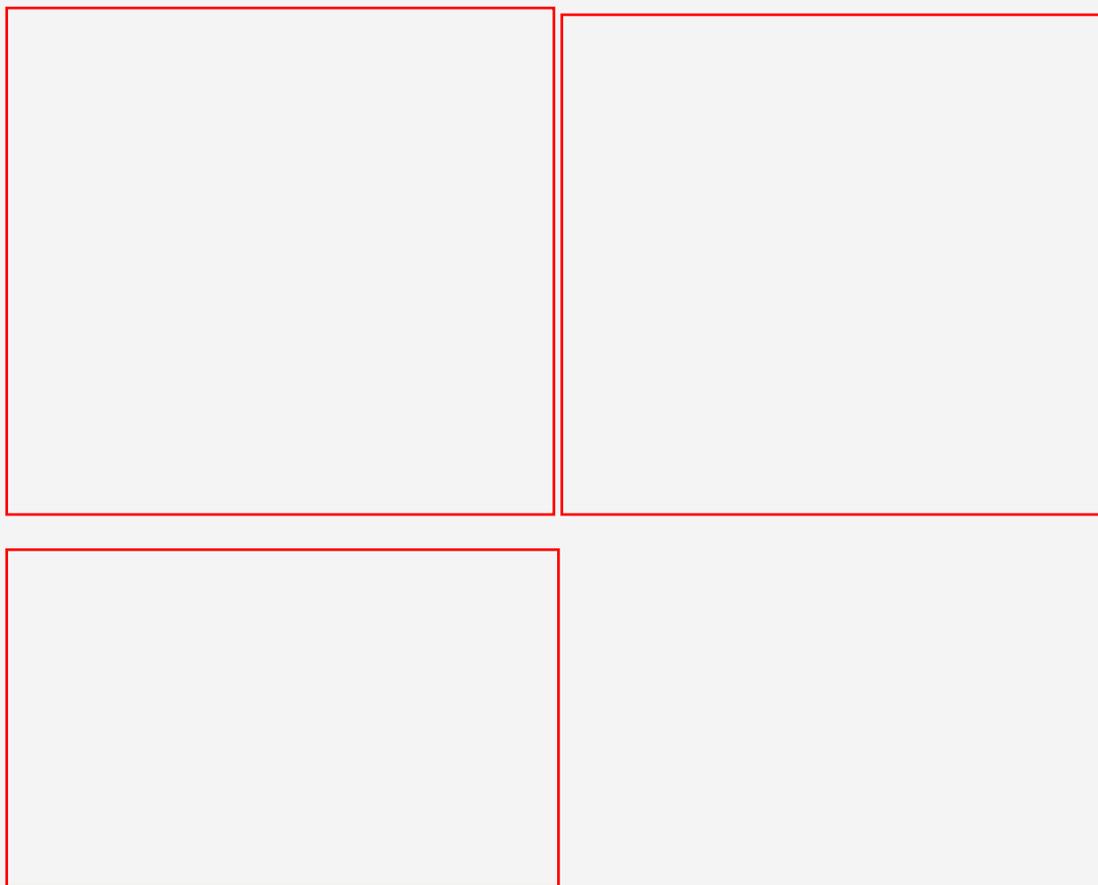


Figura 2. Aspecto de lipossomas em criofratura. J Fr Ophtalmol. 2003; 26(9):981-5.

A primeira descrição sobre os lipossomas foi feita pelo cientista britânico Alec Bangham, na década de 1960. Desde então, eles têm sido usados como carreadores de fármacos em uma série de aplicações farmacêuticas. Várias formulações envolvendo lipossomas e fármacos convencionais, como a anfotericina B e a doxorrubicina, assim como proteínas, oligonucleotídeos e genes, encontram-se atualmente em estágios avançados de desenvolvimento, sendo que alguns já estão sendo comercializados.

Os numerosos estudos pré-clínicos e clínicos mostram que, quando veiculados em lipossomas, os fármacos exibem toxicidade reduzidas a tecidos normais, enquanto retêm ou melhoram a sua eficácia. Sistemas lipossomais com materiais fusogênicos (ex.: polietilenoglicol), atualmente em desenvolvimento, têm o potencial de liberar fármacos intracelularmente, melhorando e muito a sua atividade terapêutica. Quando em vacinas, estes lipossomas funcionam como uma alternativa às formas de subunidades e aos adjuvantes clássicos, gerando produtos eficazes, de efeito duradouro, sem causar reações de hipersensibilidade e de possível liofilização^{11,12,13,14}.

Os lipossomas podem ter em sua composição várias combinações lipídicas que resultam em diversas propriedades relacionadas com estabilidade em diferentes temperaturas, grau de rigidez de suas camadas e carga de superfície das vesículas formadas. Além disso, podem ser produzidos em uma vasta gama de tamanhos e terem a sua superfície modificada de modo a permitir o direcionamento específico e a liberação controlada do material encapsulado. Tais características devem ser consideradas, de acordo com a aplicação desejada, e a escolha das partículas é capaz de garantir, em grande parte, o sucesso esperado.

De uma maneira geral, o desenvolvimento de lipossomas como veículo eficiente para liberação sistêmica de fármacos implica a correta escolha dos compostos lipídicos que irão compô-lo e quais características (presença de carga na sua superfície ou não, maior ou menor fluidez, presença de promotores de especificidade, como os anticorpos monoclonais, enzimas etc.) lhe serão adequadas tanto em relação ao fármaco que irá transportar quanto o sítio de ação que irá atingir.

Além da administração por via intravenosa, os lipossomas possuem flexibilidade de composição, de modo a permitir, também, sua administração por todas as vias conhecidas. Na via pulmonar, por exemplo, podem ser usados lipossomas tanto convencionais como os do tipo *stealth*, com composição adequada, produzindo diferentes taxas de liberação do material encapsulado.

Várias metodologias usando diversos princípios físicos e bioquímicos vêm sendo propostas para examinar o desenvolvimento de sistemas com um grau terapêutico aceitável para alvos específicos^{15,16}. O uso de imunolipossomas usando anticorpos monoclonais ligados ao lipossoma, para carrear tanto drogas hidrofóbicas quanto hidrofílicas, tem recebido muita atenção. Tem sido demonstrado que o específico direcionamento de fármacos para células-alvo é bem mais eficiente quando se trabalha com imunolipossomas do que com lipossomas desprovidos de anticorpo¹⁷; e essa eficiência dependeria da densidade de anticorpos adsorvidos na superfície¹⁸.

Lipossomas vêm sendo extensivamente testados em animais. O maior desenvolvimento nos últimos anos tem sido o dos vetores com um prolongado tempo de circulação no sangue, comumente chamados lipossomas de circulação longa. Lipossomas contendo monosialogangliosídeo GM₁¹⁹, polietilenoglicol ou derivado de fosfatidiletanolamina^{20,21} não são rapidamente englobados por macrófagos do sistema retículo-endotelial e permanecem na circulação por muito mais tempo que os lipossomas ditos convencionais.

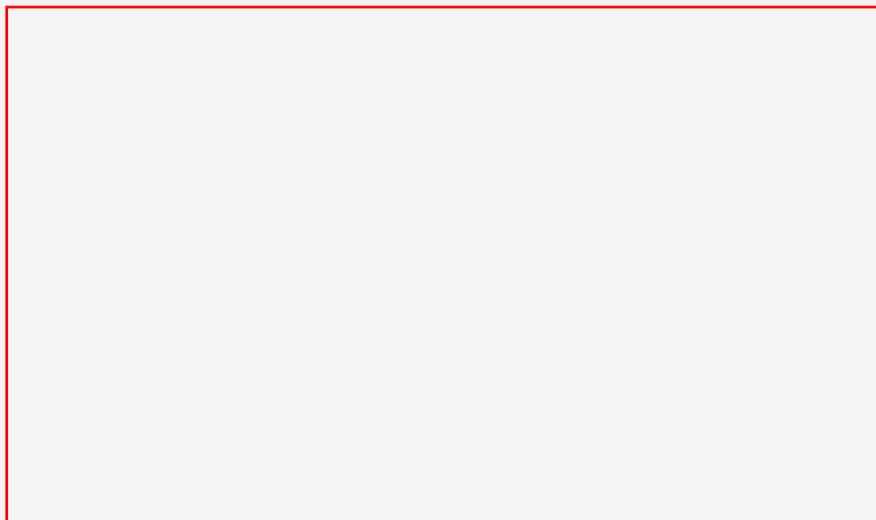
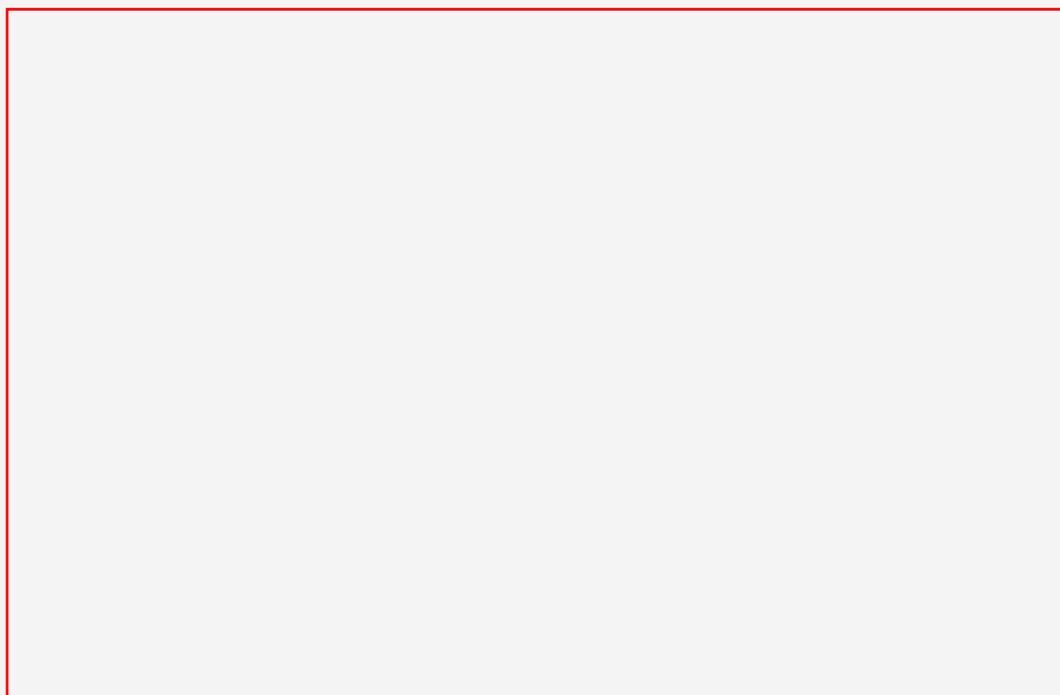


Figura 3. Preparo de diferentes tipos de lipossomas inteligentes. Anticorpos monoclonais são ligados em lipossomas contendo antibiótico em seu interior. J. Cell. Mol. Med. 2002; 6:465-474



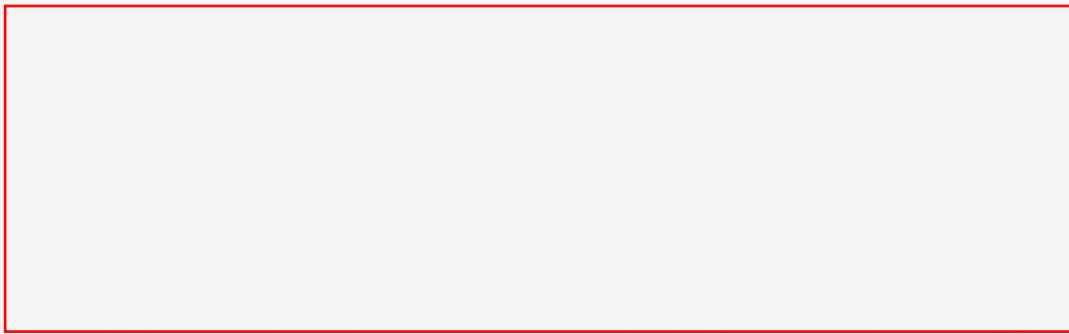


Figura 4. Diagrama de um lipossoma transportador de fármacos, ambos com SSL e sem CL envolvidos por PEG. Os lipossomas possuem uma membrana lipídica que engloba um espaço aquoso interno usado para transportar quimioterápicos (no caso). Tais fármacos podem ser encapsulados em uma concentração que exceda sua solubilidade em água, formando, assim, cristais no interior do lipossoma. Uma outra alternativa seria o transporte destes fármacos no meio das bicamadas lipídicas. Outras modificações em sua bicamada, como a ligação de porções Fab, podem gerar lipossomas que serão capturados e endocitados pelas células, por exemplo cancerígenas, através da ligação com receptores específicos presentes nestas mesmas células (ex.: HER2 de câncer de mama). A estrutura química dos três principais componentes lipídicos dos lipossomas é também apresentada – DSPC (A) ou equivalente, HSPC, o lípide mais usado, assim como o Chol (B). PEG-DSPE é incorporado em concentrações que variam de 4-6 mol%. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:11460–4.

O objetivo do presente projeto é a produção de anticorpos monoclonais específicos para antígenos de superfície do *M. tuberculosis*. Estes anticorpos serão ligados à bicamada lipídica de lipossomas e, assim, veicularão fármacos de primeira escolha na terapêutica tuberculosa (rifampicina). O produto assim obtido contribuirá imensamente, diante de tudo que foi exposto, com uma terapêutica mais eficaz, específica, rápida e menos tóxica para o tratamento da tuberculose pulmonar. Representa, ainda, uma enorme contribuição para a contenção dessa patologia, que só aumenta em números de casos, mesmo diante de todo o arsenal terapêutico, em todo o mundo, indo de encontro a anseios tanto da OMS quanto do governo brasileiro, que hoje vem incentivando cada vez mais pesquisas de desenvolvimento e melhoramento de fármacos nesta área²² (dados atuais sobre tuberculose no Estado de São Paulo e indicadores de morbimortalidade e indicadores de desempenho pode ser consultados no suplemento 4, vol. 3, 2006 do Bepa).

Para a realização deste trabalho, de grande importância social e em saúde pública, contaremos com a valiosa colaboração e experiência acumuladas durante vários anos de trabalho em lipossomas e sistemas inteligentes de transporte e liberação de fármacos do nosso colaborador Tulio Nakazato da Cunha, que utilizou em sua dissertação de mestrado técnicas de produção, controle e otimização de processos envolvendo lipossomas para o transporte de fármacos tuberculostáticos, no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. O trabalho, agora, tem prosseguimento em seu doutorado, sob a orientação da Dra. Elizabeth N. De Gaspari (Programa Interunidades em Biotecnologia – USP), gerando diversas contribuições em diferentes áreas do conhecimento. Tese de mestrado “Preparação e avaliação de sistemas lipossomais para transporte da rifampicina”. São Paulo, 2004, 120p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP)–, sob a orientação da Prof. Dra. Ida Caramico Soares. Há dois anos estamos trabalhando em colaboração neste projeto, aprovado pelo CCD/BM/Cepial do IAL, sob a coordenação da Dr. Elizabeth N. De Gaspari, da Seção de Imunologia.

Objetivos

- q Produção de anticorpos monoclonais.
- q Otimização da terapêutica contra a tuberculose através da preparação de vetores dirigidos para o alvo específico (anticorpos monoclonais ligados a lipossomas transportando fármacos tuberculostáticos).

“...a saúde é a chave da prosperidade; as boas condições de saúde levam ao crescimento econômico, enquanto que as más conduzem à pobreza.”

Nações Unidas

Agradecimentos

À pesquisadora Emy Takemota, da Seção de Óleos e Gorduras e Condimentos, da Divisão de Bromatologia e Química, do Instituto Adolfo Lutz, pelo suporte técnico e laboratorial durante a preparação de lipossomas. À aluna de mestrado Tatiane Ferreira, do programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia, USP, pelo apoio técnico, sob a orientação da Dra Elizabeth De Gaspari, e à pesquisadora Regina T. Kimura, pela assessoria e apoio no processo de liofilização de nossas partidas, ambas da Seção de Imunologia do IAL.

Referências bibliográficas

1. Reichman L.B. e Hershfield E.S. (ed). Tuberculosis: a comprehensive international approach. Nova York: Marcel Dekker, Inc., 1993.
2. CVE. Centro Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Tuberculose São Paulo: Secretaria do Estado da Saúde, 1998.
3. Campinas LLSL, Ferrazoli L, Telles MAS, Tatsumoto NF, Biagolini REM, Ferraz SMP, Arpiani SO. Manual de orientação para coleta de amostras de escarro, e outros materiais para baciloscopia e cultura para diagnóstico e controle da tuberculose. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Divisão de Tuberculose, 2002.
4. MS. Ministério da Saúde. Manual de Normas para o Controle da Tuberculose, 1995.
5. Ansell PR. Hybridoma technology: a view from the patent arena. **Immunol Today** 2000; 21:357-8.
6. Borrebaeck CA. Antibodies in diagnostics – From immunoassays to protein chips. **Immunol Today** 2000; 21:379-82.
7. Glennie MI, Johnson PW. Clinical trials of antibody therapy. **Immunol Today** 2000; 21:403-10.
8. Little M, Kipriyanov SM, Le Gall F, Moldenhauer G. Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. **Immunol Today** 2000; 21:364-70.
9. Milstein C. With the benefit of hindsight. **Immunol Today** 2000; 21:359-64.
10. Assis MA. Resolução de (+/-)-2-amino-1-butanol: precursor para obtenção de etambutol. [Dissertação de Mestrado]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2001. 91p.
11. Frezard F. Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines. **Braz J Med Biol Res** 1999; 32:181-189.
12. Green S, Fortier A, Dijkstra J, Madsen J, Swartz G, Einck L, Gubish E, Nacy C. Liposomal vaccines. *Advanced and Experimental Medical Biology* 1995; 383:83-92.
13. Gregoriadis G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends in Biotechnology* 1995; 13:527-537.
14. Gregoriadis G, McCormack B, Obrenovic M, Saffie R, Zadi B, Perrie Y. Vaccine entrapment in liposomes. **Methods** 1999; 19:156-162.
15. Beatty WL, Rhoades ER, Ullrich HJ, Chatterjee D, Heuser JE, Russell DG. Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages. **Traffic** 2000; 1:235-247.
16. Armstrong JA, Hart PD. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with Phagosomes. **J Exp Med** 1971; 134:713-740.

17. Crowle AJ, Dahl R, Ross E, May MH. Evidence that vesicles containing living, virulent *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium avium* in cultured human macrophages are not acidic. **Infect Immun** 1991; 59:1823-1831.
18. Bruyn De, Bosmans JR, Nyabenda J, Van Vooren JP. Effect of zinc deficiency on the appearance of two immunodominant protein antigens (32 kDa and 65 kDa) in culture filtrates of mycobacteria. **J Gen Microbiol** 1989; 135:79-84.
19. Fifis T, Costopoulos C, Radford AJ, Bacic A, Wood PR. Purification and characterization of major antigens from a *Mycobacterium bovis* culture filtrate. **Infect Immun** 1991; 59:800-807.
20. Frehel C, Chastellier C, Lang T, Rastogi N. Evidence for inhibition of fusion of lysosomal and prelysosomal compartments with phagosomes in macrophages infected with pathogenic *Mycobacterium avium*. **Infect Immun** 1986; 52:252-562.
21. Fukui Y, Hirai T, Uchida T, Yoneda M. Extracellular proteins of tubercle bacilli. IV. Alpha and beta antigens as major extracellular protein products and as cellular components of a strain (H37Rv) of *Mycobacterium tuberculosis*. **Biken J** 1965; 8:189-199.
22. Horwitz MA, Lee BW, Dillon BJ, Harth G. Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. **Proc Natl Acad Sci** 1995; USA 92:1530-1534.

Correspondência/Correspondence to:

Seção de Imunologia – IAL

Av. Dr. Arnaldo, 355, 1º andar, Cerqueira César

CEP.: 01246-000, São Paulo/SP, Brasil

Tel.: 55 (11) 3068-2898

egaspari@ial.sp.gov.br



Bepa

Av. Dr. Arnaldo, 351 - 1º andar, s. 135 – CEP: 01246-000

São Paulo - SP - tels.: (11) 3066-8823 / 3066-8825

e-mail: bepa@saude.sp.gov.br

Fale conosco

