



ARTIGO ORIGINAL

Visualização da Rede Linfática Pulmonar Profunda usando Radioliposomas

M.F. Botelho^{a,*}, J.J.P. De Lima^a, I.C. Dormehl^b, M. Fontes Baganha^c, C.M. Gomes^a,
A.C. Santos^a, J.N. Moreira^d e E. Kilian^b

^a Instituto Biofísica/Biomatemática, IBILI, Faculdade de Medicina, Azinhaga de Santa Comba, Coimbra, Portugal

^b Institute for Life Sciences, Pretoria University, Pretoria, South Africa

^c Centro de Pneumologia da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

^d Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra, Faculdade de Farmácia, Coimbra, Portugal

Recebido em 24 de junho de 2010; aceite em 29 de novembro de 2010

Disponível na Internet em 13 de abril de 2011

PALAVRAS-CHAVE

Liposomas;
Drenagem linfática;
Cintigrafia;
Libertação pulmonar
controlada;
Estudos *in vivo*

KEYWORDS

Liposomes;
Lymphatic drainage;
Scintigraphy;
Pulmonary delivery;
In vivo studies

Resumo A drenagem linfática profunda desempenha um papel importante no pulmão, uma vez que remove materiais estranhos depositados sobre a superfície das vias respiratórias, tais como microrganismos patogénicos. Esta drenagem está igualmente associada às vias de disseminação tumoral. Liposomas com uma membrana especificamente desenhada foram usados para simular partículas estranhas a ser removidas pelos linfáticos pulmonares. Pretendem obter-se imagens dos linfáticos profundos em babuínos usando liposomas que encapsulam ^{99m}Tc-HMPAO sob a forma de aerossol. Observaram-se gânglios linfáticos axilares 30 min pós-inalação, que se tornaram mais evidentes 1 hora após, quando os gânglios abdominais e aórticos também se tornaram visíveis. Imagens tardias não acrescentaram informação relevante. Foram desenhadas ROI's (regiões de interesse), bem como as correspondentes curvas de actividade-tempo para obter informação acerca da biocinética. Em conclusão, pode dizer-se que a técnica proposta torna possível a visualização da rede linfática profunda do pulmão e os gânglios linfáticos. Esta metodologia poderá vir a ser importante na libertação pulmonar controlada de fármacos citotóxicos.

© 2011 Publicado por Elsevier España, S.L. em nome da Sociedade Portuguesa de Pneumologia.

Visualization of deep lung lymphatic network using radioliposomes

Abstract Deep lymphatic drainage plays an important role in the lung, as it removes foreign materials laying on the airways surface, such as pathogenic microorganisms. This drainage is also associated with lung tumour dissemination route. Liposomes with a specially tailored membrane were used as foreign particles to be removed by the lung lymphatics. We aim to obtain images of deep lung lymphatics in baboons using liposomes encapsulating ^{99m}Tc-HMPAO, as aerosols. Axillary lymph nodes were visualized 30 min post-inhalation, becoming more evident 1 hour

* Autor para correspondência.

Correio electrónico: filomena@ibili.uc.pt (M.F. Botelho).

after, when abdominal aortic and inguinal lymph nodes were also observed. Late images added no additional information. ROI's and their time-activity curves were drawn to obtain biokinetic information. In conclusion, we can say that the proposed technique enables visualization of the deep lymphatic lung network and lymph nodes. This methodology may be an important tool for targeted lung delivery of cytotoxic drugs.

© 2011 Published by Elsevier España, S.L. on behalf of Sociedade Portuguesa de Pneumologia.

Introdução

A densa rede linfática profunda existente no tecido conjuntivo da pleura visceral, tanto dos folhetos peribrônquicos como dos perivasculares de todos os lobos pulmonares e da região justa-alveolar, desempenha um papel crucial na remoção de materiais estranhos e na disseminação dos tumores do pulmão¹⁻⁵.

Os liposomas foram propostos como promissores sistemas de transporte de fármacos anti-tumorais, devido à sua capacidade de encapsulamento^{6,7}. São igualmente adequados para a obtenção de imagens da rede linfática profunda, uma vez que se comportam como partículas estranhas e são drenados. Podem ser administrados através de várias vias como, por exemplo, sob a forma de aerossóis. Com base na patofisiologia da infecção pulmonar por *Bacillus tuberculosis* podem modular-se liposomas específicos. Estes liposomas podem ser produzidos para mimetizar a composição da parede de esporos de *Bacillus subtilis* (um microrganismo saprófita das vias respiratórias), de modo a serem capturados pelos linfáticos pulmonares^{8,9}.

Material e métodos

Reagentes¹

A distearoilfosfatidilcolina (DSPC) foi seleccionada como fosfolípido principal (temperatura de transição de fase 56 °C) uma vez que permite a produção de liposomas estáveis na presença de fluidos biológicos^{6,7,10}. Como fosfolípido com carga negativa escolheu-se o fosfatidilglicerol (PG)^{11,12} e o ácido glutâmico (GA) para actuar como resíduo presente quer na camada interna quer na densa camada externa^{13,14}. DSPC, PG, GA e glutatona (GSH) foram adquiridos à empresa Sigma (St. Louis, MO, EUA) e o Sephadex G-25 à Pharmacia (Upsala, Sweden). Como anestésicos utilizaram-se o Ketalar® (Parke Davis, Cape Town, S.A.) e o Sagatal (Kyron Laboratories Pty. Ltd., Benrose, S.A.). O ^{99m}Tc foi obtido a partir de um gerador comercial de ⁹⁹Mo/^{99m}Tc (NECSA, África do Sul). A Exametazima (Cerotec™) foi adquirida à G.E. Healthcare (UK). Para determinação da eficiência de marcação e pureza radioquímica usaram-se tiras de ITLC-SG (Gelman Sciences Inc., Ann Arbor, EUA) e de papel Whatman n° 1.

¹ Todos os reagentes não especificados no texto são de grau de pureza analítica ou equivalente.

Produção de liposomas

A formulação liposomal é constituída por DSPC:PG:GA, respectivamente na proporção molar de 8:1:1. A mistura lipídica, com uma concentração de 50 mg/ml, foi dissolvida em 2 ml de clorofórmio num balão de fundo redondo. Efectuou-se a sua evaporação à temperatura ambiente, sob pressão reduzida e atmosfera inerte, durante 2 h, para formar um fino filme lipídico que foi seco durante a noite sob vácuo¹⁵. 100 mM de GSH reduzido (em soro fisiológico a 0,9%) foram adicionados aos referidos filmes através de agitação em vórtex forte¹⁶⁻¹⁹. O balão foi colocado em banho-maria a 65 °C durante 10 min, para promover a hidratação do filme lipídico.

Os liposomas multilamelares, produzidos por este método, foram depois extrusados a 70 °C através de 2 filtros de policarbonato sobrepostos (Nucleopore, CA, EUA) com poros de 100 nm, montados num mini-extrusor (LiposoFast™, Avestin, Canada) acoplado a duas seringas Hamilton de 0,5 ml (Hamilton, NV, EUA)²⁰⁻²². De modo a obter liposomas unilamelares com um pequeno índice de polidispersão, os liposomas multilamelares foram passados pelos filtros 20 vezes²³.

Para remover todo o GSH extravascular presente, a suspensão liposomal (500 µl de cada vez) foi eluída através de minicolunas cromatográficas de exclusão molecular de Sephadex G-25 à temperatura ambiente, acopladas a filtros Durapore® (Millipore, Ireland) com poros de 0,45 µm²³⁻²⁶. As minicolunas foram lavadas com soro fisiológico a 0,9% e pH = 7,4 com um fluxo de ± 21 ml/h^{15,22,27}.

Protocolo de marcação

A marcação dos liposomas foi efectuada de acordo com o protocolo de Phillips *et al.*¹⁸. Kits de Cerotec® (contendo 0,5 mg de Exametazima, 7,6 µg de SnCl₂ e 4,5 mg de NaCl) foram reconstituídos com 740 MBq (20 mCi) de ^{99m}Tc em 1 ml de NaCl a 0,9% e incubados durante 5 min.

De acordo com o fabricante usou-se um sistema de 3 tiras de ITLC para testar a marcação do complexo lipofílico de ^{99m}Tc-Exametazima, em relação aos contaminantes pertecnato livre, ^{99m}Tc reduzido hidrolisado e complexo hidrofílico²⁸. Apenas os kits com uma marcação do complexo lipofílico ^{99m}Tc-Exametazima superior a 80% foram usados para radiomarkação dos liposomas.

Aproximadamente 3 ml da suspensão liposomal foram adicionados a 0,5 ml de ^{99m}Tc-Exametazina. 10 min após a incubação, os liposomas foram separados do ^{99m}Tc livre por filtração através de uma coluna de Sephadex G-25. A efi-

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/4213930>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/4213930>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)