

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E HEMATOTOXICIDADE DA ISOTRETINOÍNA ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS E MICROCÁPSULAS

DINIZ, Danielle G A¹; LIMA, Eliana Martins²; VALADARES, M. C³

Palavras-chave: Isotretinoína, Atividade antitumoral, Leucemia.

1. INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

O objetivo principal da pesquisa quimioterápica visa, principalmente, a descoberta de novos agentes capazes de inibir especificamente a multiplicação viral e de células neoplásicas, sem afetar a divisão celular normal. A partir da década de 40, ocorreu enorme progresso na compreensão dos processos neoplásicos, havendo uma rápida expansão no arsenal de agentes citotóxicos disponíveis. Entretanto, o avanço no tratamento de tumores de ocorrência freqüente é ainda modesto. Somente no Brasil, estima-se a ocorrência de aproximadamente 90.000 óbitos por ano, chegando-se a mais de 4 milhões em todo o mundo (Sardenberg, 1996).

Os tratamentos de primeira escolha atualmente empregados na terapia do câncer, a quimioterapia e a radioterapia são destituídos de toxicidade seletiva, provocando efeitos colaterais graves, dentre eles a inibição da resposta imunológica, crítica para a recuperação do paciente. O conceito de intensidade da dose, ou aumento da quantidade de quimioterapia aplicada por unidade de tempo, tem sido alvo de intensa investigação. Neste sentido o emprego de tecnologia farmacêutica de sistemas transportadores de fármacos vem ao encontro da necessidade de diminuição da dose com otimização dos efeitos terapêuticos, podendo assim, dentre outras vantagens, aumentar a seletividade do agente antitumoral, minimizar sua toxicidade e, elevar as taxas de cura em diferentes tipos de câncer. A microencapsulação constitui um importante campo para o desenvolvimento de novas formulações, uma vez que possibilita, de maneira racional e efetiva, aumentar a eficiência terapêutica de substâncias já utilizadas no tratamento de grande variedade de doenças, além disso, torna possível a utilização de fármacos potencialmente tóxicos, como é o caso de muitos antineoplásicos (Feng, Huang, 2001; Mu, Feng, 2003).

2. METODOLOGIA

2.1. LINHAGENS CELULARES

A linhagem celular HL-60 será mantida em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com soro bovino fetal (Cultilab) e 2 mM de L-glutamina. Semanalmente esta linhagem será expandida para realização dos experimentos e congelamento.

A linhagem celular HL-60 será incubada com diferentes concentrações dos fármacos em estudo. na sua forma livre e encapsulada e forma comercial. por um

período de 48 horas.

2.2. ANIMAIS

Serão utilizados camundongos machos BALB/c com idade de 8 a 10 semanas, mantidos em gaiolas plásticas, em sala climatizada sob temperatura constante de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclo escuro de 12 horas, onde ficarão até o sacrifício para avaliação da atividade tumoricida dos fármacos. Os experimentos em animais serão realizados de acordo com os protocolos institucionais do comitê de ética em pesquisa.

2.4. TUMOR ASCÍTICO DE EHRLICH (TAE)

Os ensaios em modelos *in vivo* serão realizados com modelo experimental de Ehrlich, mantido nas dependências do laboratório através de passagens sucessivas intraperitoneais entre animais. As células tumorais de Ehrlich crescem como células ascíticas na cavidade peritoneal de camundongos, facilitando sua manutenção através de passagens consecutivas. O número e a viabilidade das células tumorais são determinados através do método de exclusão com corante azul-tripán, em câmara de Neubauer.

2.5. PREPARO DOS LIPOSSOMAS

Os lipossomas serão preparados por hidratação do filme lipídico seco contendo o fármaco. Um tratamento posterior, por ultra-som, levará à obtenção de vesículas unilamelares. A quantidade de fármaco encapsulado nas vesículas lipossômicas será determinada pela técnica de cromatografia de exclusão em coluna. Também será determinada a fração de fármaco encapsulado, tratando-se a formulação com detergente, promovendo desta forma a ruptura dos lipossomas e completa liberação do fármaco no meio aquoso circundante. Realizando-se posteriormente ensaio quantitativo por HRGC.

2.6. PREPARO DAS MICROCÁPSULAS

As microcápsulas serão preparadas por policondensação utilizando ácido poli-(D,L-lático) e ácido poli-(D,L-lático-co- glicólideo) Nestes métodos, tem-se geralmente a formação de dispositivos tipo reservatório, sendo o tamanho da partícula diretamente dependente do diâmetro da fase interna e do controle da reação (Andreo-Filho, Oliveira, 1999).

As microcápsulas formadas serão avaliadas quanto à forma e dimensões por microscopia eletrônica de varredura. Suas características termogravimétricas serão determinadas por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e o conteúdo de fármaco encapsulado será determinado por cromatografia líquida de alta eficiência.

2.7 POTÊNCIAL ANTITUMORAL (ENSAIOS *IN VITRO*)

2.7.1 Avaliação da citotoxicidade através do método de redução do tetrazolium.

Neste teste, tanto a proliferação como a citotoxicidade celulares podem ser avaliadas através de um sistema de oxi-redução mitocondrial. Desta forma, o tetrazolium é reduzido através das células viáveis, formando o sal de formazan. o

qual será solubilizado para a leitura das células viáveis através de ELISA a 570 nm (absorbância máxima). A célula da linhagem celular HL-60 será incubada em estufa úmida com 5% de CO₂ no ar, por 48 horas com diferentes concentrações do fármaco em estudo, na forma encapsulada e livre. Após este período, a solução de MTT (Kit – Boehringer Mannheim) será adicionada e a placa de cultura será incubada por mais 4 horas. Logo após, adicionar-se-á a solução solubilizante do MTT e incubar-se-á por 24 horas em estufa úmida com 5% de CO₂ no ar. No dia seguinte, será efetuada a leitura em ELISA a 570 nm e a citotoxicidade celular do fármaco encapsulado e livre. A concentração letal 50% (CL50) será definida como a concentração da droga que resulta em 50% de sobrevivência. A qual será derivada de uma curva dose-resposta (Mosmann, 1983).

2.7.2. Avaliação de inibição do crescimento tumoral

Os animais portadores do tumor serão tratados com o fármaco livre e encapsulado e, após o tratamento, o fluido ascítico da cavidade peritoneal, induzido por métodos de tumorização, será quantitativamente isolado por lavagem peritoneal 24 horas após última administração do fármaco, seja na forma livre ou encapsulada e, o número total de células tumorais avaliado pelo método de exclusão por azul de tripan.

3. DESAFIOS E PERSPECTIVAS

O grande desafio deste trabalho é a obtenção de sistemas transportadores de fármacos antineoplásicos capazes de proporcionar melhor qualidade de vida aos pacientes portadores de câncer.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREO-FILHO, N; OLIVEIRA, A.G. Sistemas de Micro/Nanoencapsulação de fármacos. *Infarma*. v. 9, 1999.
- FENG, S; HUANG, G. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol) from nanospheres of biodegradable polymers. *J. Control. Rel.*,v. 71, p. 53-69, 2001.
- SARDENBERG, I. Revista Veja, 17 de abril, 76, 1996.
- MU, L; FENG, S.S. A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. *J. Control. Rel.* v. 86, p. 33-48, 2003.
- MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for celularv growth and survival: application to proliferation and citotoxicity assays. *J Immunol Methods*. v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq - FINEP

¹Aluna de Doutorado do Programa de Pós graduação em Ciências da Saúde (UFG / UNB / UFMS). Faculdade de Farmácia - FARMATEC - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, danielle@farmacia.ufg.br

² Orientadora /Faculdade de Farmácia / UFG, emlima@farmacia.ufg.br

³ Co-orientadora /Faculdade de Farmácia / UFG, marizecv@farmacia.ufg.br