

## **AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO *IN VITRO* DE TRETINOINA EM ADENOCARCINOMA DE PULMÃO (A549) COMO TRIAGEM PARA NANOENCAPSULAÇÃO**

**SCHULTZE, Eduarda<sup>1\*</sup>; OURIQUE, Aline Ferreira<sup>2</sup>; BECK, Ruy Carlos Ruver<sup>2</sup>; SEIXAS, Fabiana<sup>1</sup>; COLLARES, Tiago<sup>1\*\*</sup>**

*<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular, Biotecnologia/Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas*

*<sup>2</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
\* dudashultze@gmail.com \*\* collares.t@gmail.com*

### **1. INTRODUÇÃO**

Derivados e análogos retinóides têm sido largamente estudados como agentes antitumorais devido a seus efeitos antiproliferativos e pró-diferenciativos (CHOMIENNE, 1991; CHANSRI, 2008; ALTUCCI, 2001). Os retinóides exercem sua função através de receptores nucleares que são chamados de receptor de ácido retinóico (RAR) ou receptores retinóides (RXR) (SOPRANO, 2004). Através da ligação aos receptores retinóides, esses compostos regulam a expressão de diversos genes envolvidos no processo de controle de ciclo celular.

A Tretinoína, também conhecida como ácido retinóico é um derivado retinóide que exerce atividade antiproliferativa em diversos tipos de tumores. Este composto tem sido usado como adjuvante no tratamento de leucemia promielocítica aguda com excelentes índices de remissão da doença (HUANG, 1988). Além disso, tretinoína já mostrou efeito em tumores sólidos de hamster (CHANSRI, 2008), células-tronco tumorais cerebrais (NIU, 2010) e carcinoma de células escamosas (XU, 2008). Entretanto, células de adenocarcinoma de pulmão humano em geral exibem uma forte resistência aos efeitos da tretinoína (GERADTS, 1993), a qual parece estar relacionada com a deficiência no *up-take* celular de tretinoína nesse tipo de célula (KAWAKAMI, 2006). Uma estratégia para aumentar a atividade antiproliferativa de tretinoína é aumentar a internalização celular do composto através de carreadores como lipossomas ou outras vesículas como nanocápsulas ou nanoesferas.

Nanocápsulas são estruturas poliméricas que contém um núcleo oleoso capaz de carrear moléculas altamente lipofílicas como a tretinoína. Nanocápsulas de núcleo lipídico contendo tretinoína (TT-LCNC) foram previamente descritas como tendo uma alta eficiência antitumoral contra células leucêmicas (OURIQUE, 2010). Esta formulação apresentou uma alta estabilidade físico-química e fotoestabilidade adequada sobre radiação UVA e UVB. Além disso, TT-LCNC se mostraram mais eficiente em longo prazo quando comparada com tretinoína livre em tratamento de linhagem celular de células de leucemia promielocítica aguda.

Kawakami et al. (2006) demonstraram que tretinoína incorporada em lipossomos de colesterol aniônicos tiveram ação antiproliferativa em células de adenocarcinoma de pulmão, linhagem A549, superando a resistência apresentada no tratamento com tretinoína livre. Os autores comprovaram que a atividade antiproliferativa, medida pelo ensaio de MTT [3(4,5- dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium], estava relacionada com o aumento no *up-take* celular de tretinoína. Entretanto, o uso de lipossomas exhibe alguns problemas inerentes desse tipo de composto como baixa taxa de encapsulação, rápida liberação de compostos

solúveis em água em presença de componentes sanguíneos em caso de administração parenteral e baixa estabilidade físico-química sobre condições de armazenamento.

Nanocápsulas poliméricas apresentam algumas vantagens comparadas a lipossomas na medida em que oferecem maior estabilidade físico-química inclusive sob radiação e oferecem uma liberação controlada do fármaco ou droga em questão, podendo ser utilizadas em formulações para administração parenteral.

Com isso, o objetivo do presente estudo foi realizar uma triagem inicial das concentrações de tretinoína que exercem atividade anti-proliferativa *in vitro* sobre células de adenocarcinoma de pulmão, a fim de produzir uma formulação de tretinoína nanoencapsulada que potencialize sua atividade anti-tumoral.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Cultura celular

As células de adenocarcinoma de pulmão (A549) foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Elas foram cultivadas em meio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), obtidos respectivamente da Vitrocell Embriolife (Campinas, Brasil) e Gibco (Grand Island, NY, USA). As células cresceram a 37 °C em estufa umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Os experimentos foram realizados com as células em fase logarítmica de crescimento.

### 2.2 Avaliação de citotoxicidade

As células foram submetidas a um teste de triagem para a determinação da dose citotóxica de tretinoína. As células foram semeadas numa densidade de 10<sup>4</sup> células por poço em uma placa de 96 poços contendo 100 µL de DMEM acrescido de 10% de FBS em cada poço. Após 24 horas em estufa, a morfologia celular foi avaliada em microscópio e as seguintes concentrações de tretinoína foram adicionadas: **160; 80; 40; 20; 10; 5; 2,5 e 1,25 mM**, bem como os controles, nos tempos de **24, 48 e 72 horas**. A concentração de DMSO nos poços não ultrapassou 0,2%.

Após o tempo determinado, foi realizado o teste de proliferação celular por ensaio colorimétrico de MTT (SLADOWSKI, 1993). O meio foi removido e a cada poço foi adicionado 20 µL de MTT (5mg/mL) com 180 µL de DMEM+FBS. Após 3 horas na estufa, os cristais de formazan formados pela degradação do MTT pelas células vivas foram diluídos pela adição de DMSO e a leitura da reação foi feita em 492 nm. Cada resultado foi proveniente da média das absorbâncias de 3 poços diferentes.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A atividade antitumoral de tretinoína em células de adenocarcinoma de pulmão, linhagem A549, foi avaliada por ensaio colorimétrico por MTT e os resultados foram reportados em termos de inibição de crescimento em relação ao controle. Para tanto, a absorbância média do controle foi considerada como 100% e as absorbâncias médias dos testes foram comparadas ao controle. O teste de citotoxicidade evidenciou que somente a concentração de 160 µM em 72 horas de

tratamento inibiu mais do que 50% do crescimento celular, conforme Figura abaixo. Considerando que células responsivas ao tratamento com tretinoína tem seu crescimento inibido por concentrações de tretinoína entre 1 e 2  $\mu\text{M}$ , pode-se confirmar a resistência dessa linhagem celular aos efeitos anti-proliferativos deste composto. Foi descrito por Kawakami et al. (2006) que esta resistência parece estar envolvida com o baixo *up-take* celular de tretinoína pelas células de adenocarcinoma de pulmão.

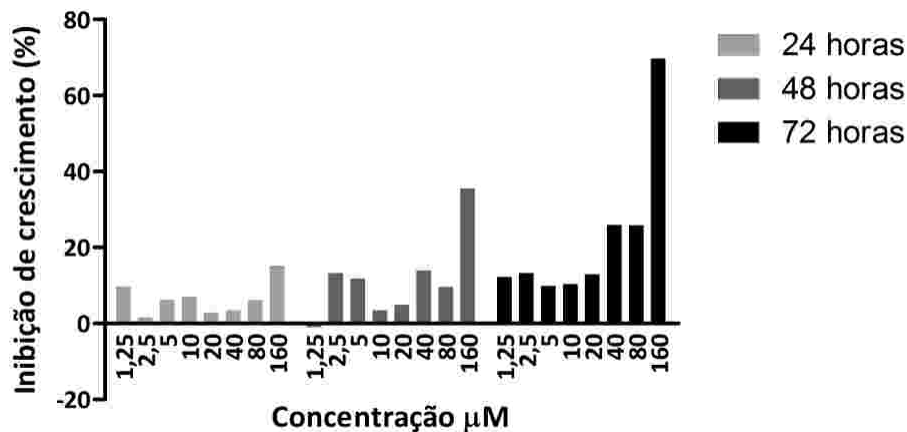


Figura 1 - Taxa de inibição média apresentada pelo tratamento com diversas concentrações de tretinoína nos tempos de 24, 48 e 72 horas. O tratamento com 160  $\mu\text{M}$  de tretinoína durante 72 horas inibiu 70% do crescimento celular.

#### 4. CONCLUSÕES

A fim de testar nanocápsulas de núcleo lipídico como carreador de tretinoína em tratamento de adenocarcinoma de pulmão, o presente estudo foi eficiente em estabelecer as concentrações necessárias de nanoformulação a ser produzida para os testes futuros.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTUCCI, L; GRONEMEYER, H. The promise of retinoids to fight against cancer. **Nat Rev Cancer**, 1:181-193, 2001.

CAMPOS, VF; COLLARES, T; DESCHAMPS, JC; SEIXAS, FK; DELLAGOSTIN, OA; LANES, CF; SANDRINI, J; MARINS, LF; OKAMOTO, M; SAMPAIO, LA; ROBALDO, RB. Identification, tissue distribution and evaluation of brain neuropeptide Y gene expression in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. **J Biosci**, 35:405-413, 2010.

CHANSRI, N; KAWAKAMI, S; YOKOYAMA, M; YAMAMOTO, T; CHAROENSIT, P; HASHIDA, M. Anti-tumor effect of all-trans retinoic acid loaded polymeric micelles in solid tumor bearing mice. **Pharm Res**, 25:428-434, 2008.

CHOMIENNE, C; BALITRAND, N; BALLERINI, P; CASTAIGNE, S; DE, The H; DEGOS, L. All-trans retinoic acid modulates the retinoic acid receptor-alpha in promyelocytic cells. **J Clin Invest**, 88:2150-2154, 1991.

HUANG, ME; YE, YC; CHEN, SR; CHAI, JR; LU, JX; ZHOA, L; GU, LJ; WANG, ZY. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. **Blood**, **72**:567-572, 1988.

KAWAKAMI, S; SUZUKI, S; YAMASHITA, F; HASHIDA, M. Induction of apoptosis in A549 human lung cancer cells by all-trans retinoic acid incorporated in DOTAP/cholesterol liposomes. **J Control Release**, **110**:514-521, 2006.

NIU, CS; LI, MW; NI, YF; CHEN, JM; MEI, JM; LI, J; FU, XM. Effect of all-trans retinoic acid on the proliferation and differentiation of brain tumor stem cells. **J Exp Clin Cancer Res**, **29**:113, 2010.

PFÄFFL MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, **29**:e45, 2001.

SLADOWSKI, D; STEER, SJ; CLOTHIER, RH; BALLS, M. An improved MTT assay. **J Immunol Methods**, **157**:203-207, 1993.

SOPRANO, DR; QIN, P; SOPRANO, KJ. Retinoic acid receptors and cancers. **Annu Rev Nutr**, **24**:201-221, 2004.

XU, Q; ZHANG, Z; ZHANG, P; CHEN, W. Antisense oligonucleotides and all-trans retinoic acid have a synergistic anti-tumor effect on oral squamous cell carcinoma. **BMC Cancer**, **8**:159, 2008.

ZUCCARI, G; BERGAMANTE, V; CAROSIO, R; GOTTI, R; MONTALDO, PG; ORIENTI, I. Micellar complexes of all-trans retinoic acid with polyvinylalcohol-nicotinoyl esters as new parenteral formulations in neuroblastoma. **Drug Deliv**, **16**:189-195, 2009.

ZUCCARI, G; CAROSIO, R; FINI, A; MONTALDO, PG; ORIENTI, I. Modified polyvinylalcohol for encapsulation of all-trans-retinoic acid in polymeric micelles. **J Control Release**, **103**:369-380, 2005.