

DENDRÍMERO DE POLIGLICEROL: NANOPLATAFORMA PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER

Alexandra Rodrigues Pereira da Silva¹, Maria Aparecida P. Camillo², Olga Zazuco Higa²,
Alvaro Antonio Alencar de Queiroz¹

¹Universidade Federal de Itajubá, Instituto de Ciências Exatas/Departamento de Física e Química, Av. BPS, 1303, Pinheirinho, 37500-093, Itajubá - Minas Gerais (MG)/Brasil. E-mail: alencar@unifei.edu.br

²Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo/Centro de Biotecnologia, São Paulo (SP)/Brasil

RESUMO

É fato bem conhecido que a terapia moderna do câncer se tornou um desafio multidisciplinar, requerendo a colaboração entre as ciências da natureza e as engenharias, particularmente a engenharia de materiais. Neste trabalho apresentamos nossos resultados recentes acerca das propriedades biocompatíveis e antitumorais do dendrímero de poliglicerol salicilado (PGLD). A atividade antitumoral do nanossistema desenvolvido foi testada contra a linhagem celular de câncer de mama (MCF-7). O nanossistema bioativo desenvolvido apresentou atividade antiproliferativa, concentração dependente e efeito citostático sobre a linhagem celular MCF-7. O PGLD induziu alterações morfológicas na membrana celular da linhagem MCF-7, provavelmente associadas à morte celular por apoptose. Os resultados obtidos indicam que o nanossistema desenvolvido poderá permitir um melhor controle da cinética de liberação de quimioterápicos, resultando em níveis plasmáticos terapêuticos com menores efeitos tóxicos, representando um passo importante no desenvolvimento de uma nova terapêutica para o câncer.

Palavras chave: Dendrímero de poliglicerol salicilado (PGLD), atividade antitumoral, liberação controlada de fármaco.

INTRODUÇÃO

Apesar de todo o avanço alcançado na medicina clínica preventiva, o câncer é uma ameaça oculta de surgimento inesperado. O câncer de mama é o mais temido pelas mulheres devido à sua alta frequência e principalmente pelos seus efeitos psicológicos⁽¹⁾. No Brasil, o câncer de mama é o que mais causa mortes entre as mulheres, sendo que o número de novos casos esperados para o ano de 2008 é de 49.400. As taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda seja diagnosticada em estágios avançados⁽²⁾.

Devido ao alto custo dos tratamentos hoje existentes e aos problemas decorrentes destes, como efeitos colaterais e mutilações, existe uma grande necessidade de busca por medicamentos menos dispendiosos, mais eficientes e com menores efeitos colaterais.

Um sucesso significativo foi conseguido na área da quimioprevenção com o uso do ácido acetilsalicílico (AAS) e de outras drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINEs) para prevenir neoplasia coloretal, de mama, dentre outras⁽³⁾.

Através da inibição da enzima ciclooxygenase, o AAS inibe processos inflamatórios e alguns processos relacionados à carcinogênese. Porém, devido ao seu caráter não seletivo, também inibe processos fisiológicos importantes como citoproteção da mucosa gástrica e algumas funções da coagulação sanguínea⁽⁴⁻⁷⁾.

A elevada funcionalidade e biocompatibilidade do dendrímero de poliglicerol (PGLD) parece trazer uma luz à busca de um tratamento mais eficiente com menores efeitos colaterais. O PGLD, ilustrado na Figura 1, é um polímero solúvel em água que contém grupos hidroxilas e ligações éter. A baixa citotoxicidade e a aprovação do poliglicerol (PLG) pela FDA, como emulsificante nas indústrias farmacêutica e alimentícia, fizeram dele um polímero promissor para o uso no campo biomédico⁽⁸⁻⁹⁾.

A necessidade de uma elevada dosagem do AAS para o tratamento do câncer e o período prolongado de tempo necessário para conseguir atingir melhoras no quadro clínico são fatores limitantes no uso desse medicamento como quimiopreventivo ou quimioterápico. Entretanto, devido às propriedades dos dendrímeros, como entrega controlada e vetorizada do medicamento ao local alvo e por um período de tempo prolongado⁽¹⁰⁻¹¹⁾, tornam o conjugado PGLD-AAS um sistema promissor para o tratamento do câncer.

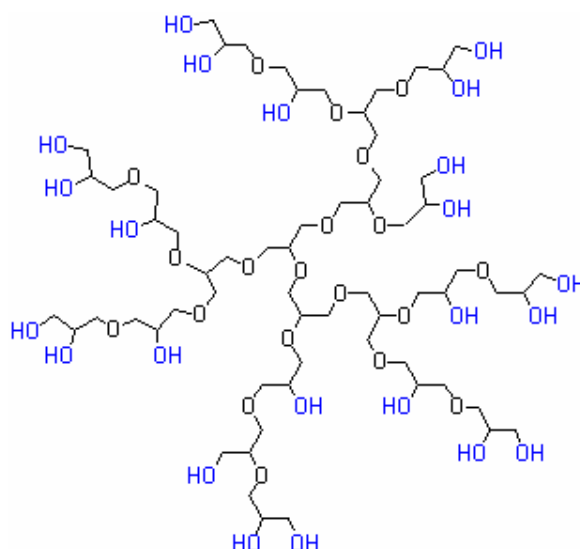


Figura 1: Dendrímero de poliglicerol.

MATERIAIS E MÉTODOS

Teste de inibição do crescimento das células MCF-7

Para este ensaio foram utilizadas linhagem celular do câncer de mama MCF-7 (ATCC número HTB-22TM) que foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de antibióticos e antifúngico e 1% de L-glutamina mantido em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

Para o ensaio foi utilizada uma placa de Elisa com 96 poços e foram distribuídas 6000 células por poço. O composto PGLD-AAS e o controle PGLD foram diluídos no intervalo de dose 10 a 0,02% com o fator de diluição 1:2 no próprio meio de cultura RPMI 1640 sem os suplementos e foram esterilizados por filtração em 0,45 µM.

Como controle positivo foi utilizado fenol 0,3% e como controle negativo o polietileno molecular de alta densidade, ambos no intervalo de 100 a 6,25% com o fator de diluição 1:2. Todas as diluições foram analisadas em quadruplicata. A viabilidade celular foi medida após 72 horas de incubação, com a adição de MTS 0,2% + PMS 0,9%. A leitura foi realizada duas horas depois em leitor de microplacas em 490 nm.

Os resultados foram expressos relacionando inibição do crescimento celular com concentração do composto. Para o ajuste foi utilizado o modelo sigmoidal dose-resposta e determinado a dose efetiva de 50%.

Análise da morfologia das células MCF-7 submetidas à ação do PGLD-AAS

Neste ensaio foi utilizada uma placa de cultura de 12 poços contendo 20.000 células por poço e adicionado a concentração da EC50% de PGLD-AAS e dos controles PGLD e meio de cultura. Foram feitas fotos da cultura celular em diferentes intervalos de tempo utilizando o microscópio invertido da marca Nikon e aumento de 200 vezes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios de determinação da viabilidade celular foram realizados para se verificar as alterações na sobrevivência das células MCF-7 quando tratadas ou não com o conjugado PGLD-AAS, estabelecendo assim o tempo e concentrações ideais de incubação com o dendrímero bioativo. Observou-se que as células tratadas com o PGLD-AAS exibiram uma diminuição da viabilidade celular de maneira dependente da dose de incubação. Notou-se que o aumento da concentração do PGLD-AAS induziu uma diminuição da viabilidade das células MCF-7, como pode ser observado na Figura 2, confirmando que a resposta ao dendrímero bioativo é dependente da dose utilizada. A Figura 3 demonstra que o extrato PGLD-AAS possui atividade antiproliferativa com IC₅₀ calculada de 0,75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, concentração dependente e efeito citostático sobre a linhagem celular MCF-7.

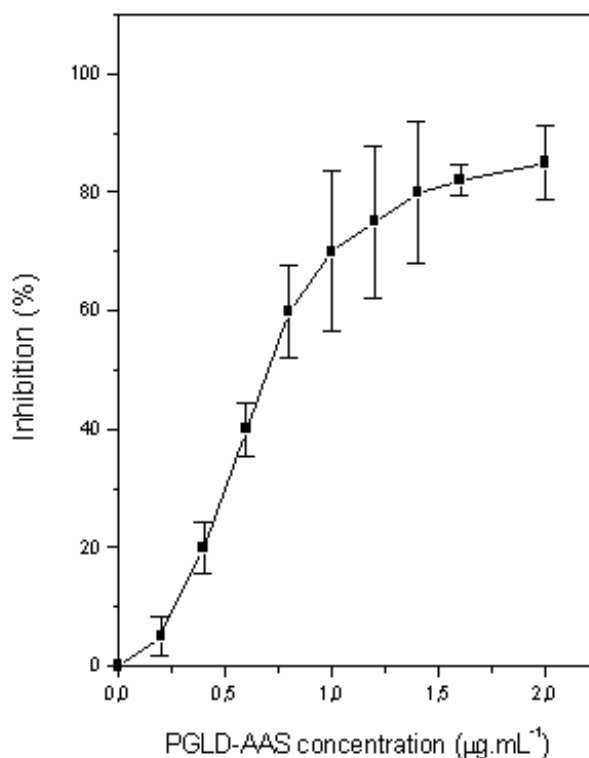


Figura 2: Influência da concentração de PGLD-AAS no ensaio de inibição de crescimento de células MCF-7. O percentual de crescimento foi determinado em ensaio MTS por 72 horas.

Uma vez confirmada que a resposta das células MCF-7 ao PGLD-AAS era dependente da concentração do bioconjugado, resolveu-se investigar as alterações morfológicas decorrentes do uso do dendrímero bioativo. Após tratamento com PGLD-AAS observaram-se alterações morfológicas significativas das células MCF-7 provavelmente associadas à morte celular por apoptose (Figura 3).

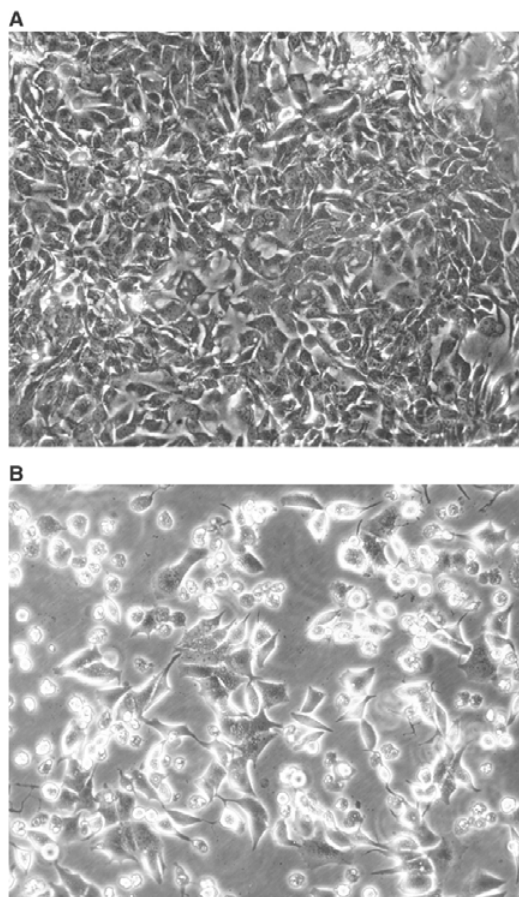


Figura 3: Microscopia por contraste de fase: em (A) observa-se o controle e em (B) observa-se o efeito do PGLD-AAS na morfologia das células MCF-7 em cultura *in vitro*. Aumento 200X.

CONCLUSÕES

Os ensaios de biocompatibilidade sugerem que o conjugado PGLD-AAS possui propriedades adequadas para o contato com o organismo humano e pode atuar funcionalmente como transportador de quimioterápicos. A atividade antitumoral contra células de câncer de

mama (MCF-7) indica que o bioconjugado PGLD-AAS exibiu atividade específica para a linhagem MCF-7, sendo observado apoptose celular resultante desta interação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro do CNPq, da Capes, da Finep e da Fapemig.

REFERÊNCIAS

- [1] MEIRA, D. D. *Avaliação dos efeitos do clotrimazol em células MCF-7 de carcinoma mamário humano*. 2005. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Faculdade de Farmácia. Rio de Janeiro.
- [2] Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/>>. Acesso em: 04 de janeiro de 2008.
- [3] TERRY, M. B.; GAMMON, M. D.; ZHANG, F. F.; Tawfik, H.; TEITELBAUM, S. L.; BRITTON, J. A.; SUBBARAMAIAH, K.; DANNENBERG, A. J; MD; NEUGUT, A. I. Association of Frequency and Duration of Aspirin Use and Hormone Receptor Status With Breast Cancer Risk. *Journal American Medical Association*, v. 291, n. 20, 2004.
- [4] MÉRIC, J-B.; *et al.* Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. v. 59, p. 51–64, 2006.
- [5] GIOVANNUCCI, E. The prevention of colorectal cancer by aspirin use. *Biomed & Pharmacother*, v. 53, p. 303-308, 1999.
- [6] CHUN, K. S.; SURH, Y. J. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochemical Pharmacology*. v. 68, p. 1089–1100, 2004.
- [7] SINGH-RANGER, G.; MOKBEL, K. The role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in breast cancer, and implications of COX-2 inhibition. *European Journal of Surgical Oncology*; v. 28, p. 729-737, 2002.
- [8] FERNANDES, E. G. R.; QUEIROZ, A. A. A.; ABRAHAN, G. A.; ROMAN, J. S. Propriedades antitrombogênicas do bioconjugado dendrímeros estreptoquinase-poliglicerol. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, v. 17, p. 105-111, 2006.
- [9] GIAROLA, V. M. *Ressonância de Plásmom de Superfície aplicada ao desenvolvimento de sistemas arborescentes hemocompatíveis*. 2007. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Itajubá (Unifei), Itajubá.
- [10] GILLIES, E. R.; FRÉCHET, J. M. J. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discovery Today*, v.10, n. 1, p. 35-43, 2005.

[11] TOMALIA, D. A. Introduction to “Dendrimers and Dendritic Polymers”. *Program Polymer Science*. v. 30, p. 217–219, 2005.

POLIGLYCEROL DENDRIMER: A NANOPLATFOM FOR CANCER THERAPY

ABSTRACT

It is well known that the modern treatment of cancer has become a multidisciplinary challenge, requiring the collaboration between natural sciences and engineering, particularly materials engineering. In this work we presented our recent results on the biocompatible and antitumoral properties of salicilated polyglycerol dendrimer (PGLD). The antitumoral activity of developed nanosistem was tested against the breast cancer cell line (MCF-7). The bioactive nanosistem developed presented antiproliferative activity, concentration and dependent cytostatic effect on the cell line MCF-7. The PGLD induced morfologic changes in MCF-7 cell line membrane, probably associated with cell death by apoptosis. The results indicate that the nanosistem developed could allow better control on the kinetics of chemotherapics release, resulting in therapeutic plasma levels with fewer toxic effects, representing an important step in the development of a new cancer therapy.

Key words: Salicilated polyglycerol dendrimer (PGLD), antitumoral activity, drug system delivery.