

# ESTUDO DAS PROPRIEDADES BIOCAMPATÍVEIS DO BIOCONJUGADO DE POLI( $\epsilon$ CAPROLACTONA)-CROTOXINA

S.G Lorenzetti.(1); O.Z Higa,(1);,M.A.P Camillo (1);,N Nascimento(1);,A.A.A de Queiroz.(2)

(1) Centro de Biotecnologia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN/CNEN, São Paulo, SP, Brasil

(2) Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Itajuba, Av. BPS. 1303, CEP.37500-903 Itajuba, Minas Gerais, Brasil. alencar@unifei.edu.br

## RESUMO

Microesferas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) contendo crotoxina (Cx) foram obtidas para aplicação como sistemas de liberação controlada de fármacos. Microesferas monodispersas quanto à distribuição de tamanho do bioconjugado PCL-Cx foram obtidas pela técnica de extração-evaporação de solvente de uma emulsão óleo-água. Os estudos *in vitro* de liberação da crotoxina a partir das microesferas indicaram uma liberação contínua e gradual, reduzindo de modo significativo a toxicidade nativa da proteína (Cx). Os ensaios biológicos *in vivo* mostraram uma maior perda de peso por parte dos animais que receberam Cx livre comparativamente aos animais que sofreram implantes do bioconjugado sugerindo uma menor toxicidade do sistema de liberação controlada (PCL-Cx) relativamente à proteína livre. Os resultados *in vivo* e *in vitro* obtidos confirmam o uso potencial das microesferas de PCL bioconjugadas com crotoxina como um sistema eficiente de liberação de fármacos e de baixa toxicidade.

Palavras-chave: poli( $\epsilon$ -caprolactona), crotoxina, bioconjugado, microesferas, atividade antitumoral.

## INTRODUÇÃO

O polímero poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) é um poliéster alifático muito utilizado em dispositivos para tratamento de lesões e em suportes para a engenharia de tecidos.

Por sofrer biodegradação no fluido fisiológico e possuir características biocompatíveis, o PCL pode constituir um sistema de liberação controlada uma vez que pode liberar um composto bioativo de interesse clínico. O objetivo de um sistema de liberação controlada baseado no PCL é manter a concentração do fármaco entre os níveis terapêuticos e plasmáticos por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única dosagem.

As toxinas provenientes de venenos ofídicos têm sido reconhecidas como uma importante fonte de princípios bioativos e contribuído para a elucidação de processos bioquímicos relacionados a patologias e desenvolvimento de novos medicamentos e reagentes de diagnóstico <sup>(1)</sup>.

A crotoxina é uma proteína obtida a partir do veneno da cascavel *Crotalus durissus terrificus* que tem mostrado resultados promissores no tratamento de tumores de mama e pulmão, porém sua utilização clínica fica limitada por seus efeitos neurotóxicos. Neste sentido, os níveis séricos contínuos podem ser uma vantagem para a administração desta droga, mantendo a eficácia e minimizando os efeitos colaterais. Este trabalho teve como objetivo a síntese e caracterização de microesferas do bioconjugado PCL-Cx.

A crotoxina é responsável por diversos efeitos biológicos, e o de interesse neste trabalho é sua ação citotóxica *in vitro*, conforme demonstrado em diversas linhagens celulares tumorais de origem murina e humana <sup>(2-8)</sup>. Segundo Rudd et al.(1994)<sup>(8)</sup> o efeito citotóxico da crotoxina é muito significativo pois promoveu 100 % de mortalidade de células Hs578T (carcinoma de ducto mamário humano) e SK-LU-1 (adenocarcinoma pulmonar) em ensaio *in vitro*. Corin et al.(1993)<sup>(7)</sup> demonstraram que a subunidade B (ou fosfolipase A2) da crotoxina esta envolvida no efeito citotóxico em células de eritroleucemia humana. Em 2002, foi administrada em pacientes com câncer avançado e promoveu a inibição no crescimento tumoral, sendo 83% para carcinoma pulmonar, 69% para carcinoma mamário humano e 44% para leucemia <sup>(9)</sup>. No entanto, ocorreram efeitos colaterais decorrentes da neurotoxicidade (diplopia, nistagmus, ptose papebral, miotoxicidade, sialorreia) ou de reação anafilática após alguns dias de tratamento. Assim, embora os resultados obtidos fossem promissores, a toxicidade da crotoxina, tem limitado o interesse em sua utilização como fármaco antitumoral.

A incorporação da proteína Cx em um sistema polimérico de liberação controlada biocompatível pode contribuir para a redução da toxicidade da proteína

ofídica preservando ao mesmo tempo sua bioatividade com relação à atividade tumoral.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção da crotoxina

O veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi gentilmente cedido pelo CEVAP (Centro de Estudos de Venenos e de Animais Peçonhentos) da UNESP, Botucatu. A crotoxina foi isolada por gel filtração e troca iônica <sup>(10)</sup>. Resumidamente, a gel filtração foi em Superdex 75 equilibrado em tampão formiato de amônio 0,1 M, pH 3,0 e a troca aniônica em Mono Q Sepharose FF, em 50 mM Tris-HCl pH 7,8 eluída em gradiente salino (0-0,5 M NaCl). Foi utilizado o fluxo constante de 0,7mL/min e em ambas as etapas foram coletadas frações de 1 mL. A densidade óptica das frações foi determinada em 280 nm. O conteúdo protéico foi determinado por método colorimétrico <sup>(11)</sup>. A integridade da proteína isolada foi confirmada com o ensaio de atividade fosfolipásica <sup>(12)</sup> e análise em eletroforese de sistema descontínuo, não reduzido, em gel a 15% <sup>(13)</sup>.

### Obtenção do bioconjugado PCL-Cx

O polímero poli-ε-caprolactona (PCL) com peso molecular de 20 kDa foi sintetizado a partir da polimerização induzida pelo iodo do monômero poli-ε-caprolactona de acordo com metodologia desenvolvida em nossos laboratórios (De Arruda Almeida et al., 2004). As microesferas de PCL-Cx foram obtidas através da técnica de extração-evaporação de solvente de uma emulsão óleo-água. A fase interna aquosa foi obtida após a dissolução de uma quantidade apropriada de crotoxina em água destilada e deionizada.

Uma fase orgânica foi preparada após dissolução do polímero PCL (5% p/p) em acetonitrila e diclorometano na proporção 1:1. Uma emulsão foi preparada após homogeneização do sistema a 24.000 rpm com auxílio de um agitador tipo turbina por 1 minuto para obter uma emulsão primária do tipo Água-Óleo  $W_1/O_1$ .

A emulsão primária obtida foi novamente emulsionada em uma segunda fase oleosa constituída por isoparafina e Span80 1% (p/p) obtendo-se então uma emulsão do tipo água-óleo-óleo  $W_1O_1O_2$ . Esta foi transferida para um reator tipo tanque agitado (950 rpm) sendo o sistema mantido sob agitação constante a 30 °C

por 1 hora e meia. A emulsão foi então diluída com óleo de canola para evitar o colapso das microesferas obtidas. Esta emulsão foi transferida para um béquer onde permaneceu sob agitação magnética por 2 horas a 30 °C. As microesferas obtidas foram centrifugadas e lavadas exaustivamente em hexano para remoção da fase oleosa.

Após purificação, as microesferas foram secas à temperatura ambiente (25 °C). A eficiência quanto ao encapsulamento da proteína foi determinado a partir da diferença de concentração na solução inicial de proteína e no sobrenadante após a bioconjugação.

As microesferas de PCL-Cx foram analisadas morfologicamente com o auxílio de microscópio eletrônico de varredura (MEV) sendo a análise de distribuição de tamanhos efetuada por visão computacional utilizando-se o software específico para aquisição de imagens (Hlimage ++).

#### Teste in vitro de liberação da crotoxina

Cerca de 10 mg de microesferas foram transferidas para um béquer contendo 3mL de NaOH 0.1 M, SDS 5%. O sistema foi mantido sob agitação a 25 °C por uma noite à temperatura ambiente (25 °C). Após centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos, 0,25 mL do sobrenadante foi ensaiado para dosagem protéica <sup>(11)</sup>.

#### Teste de citotoxicidade

A toxicidade *in vitro* da crotoxina e das microesferas de poli-ε-caprolactona foram determinadas em células CHO-K1 utilizando MTS e PMS como indicadores da viabilidade celular <sup>(15)</sup>.

#### Ensaio de atividade biológica

O ensaio da atividade biológica foi realizado em sala climatizada no biotério do IPEN. Os animais foram criados e mantidos em microisoladores dentro de uma estante ventilada, com temperatura e unidade controladas. Receberam alimentação e água *ad libitum*. Na toxicidade sistêmica *in vivo* foram utilizados camundongos da linhagem C3H, fêmea, sadias, pesando em média 20 g, divididas em 3 grupos com 3 animais cada.

A crotoxina livre foi comparada com a encapsulada em microesfera e com a solução salina (0,15M NaCl), com injeções intraperitoneais diárias de 0,15 mg/gr de

peso corpóreo. No grupo controle foi administrado solução salina via intraperitoneal, no mesmo volume que a crotoxina (0,15 mL).

O implante das microesferas foi realizado em condições assépticas, em fluxo laminar vertical, com os animais anestesiados. O material polimérico foi introduzido logo abaixo da epiderme, e em seguida o corte foi fechado com cola cirúrgica. Durante 20 dias, os animais foram pesados diariamente e observados quanto ao seu comportamento e aspecto físico.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 ilustra a atividade biológica da proteína confirmada pela atividade fosfolipásica e a análise em gel de poliacrilamida da crotoxina obtida neste trabalho. Portanto, a proteína isolada mostrou-se ativa e com pureza adequada para sua utilização na obtenção do bioconjugado PCL-Cx.

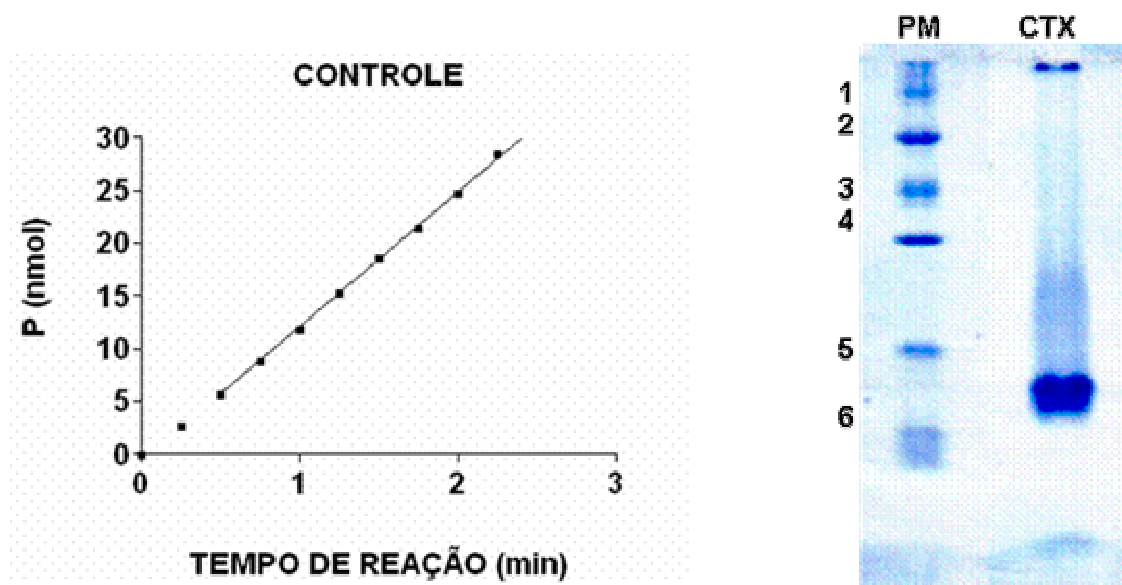
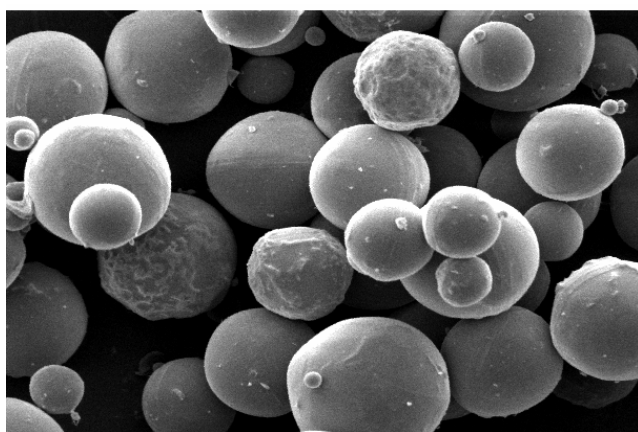


Figura 1. Gráfico da atividade fosfolipásica da crotoxina purificada e análise em eletroforese.

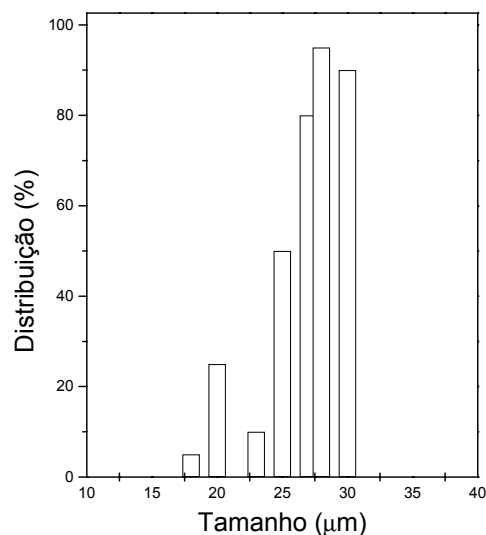
### Análise Morfológica e Distribuição de Tamanhos das Microesferas obtidas

A Figura 2 ilustra a micrografia MEV das microesferas do bioconjugado PCL-Cx obtido neste trabalho. As microesferas do bioconjugado PCL-Cx foram obtidas com bom rendimento (84%). Observa-se que a metodologia utilizada neste trabalho levou à obtenção de microesferas de baixa polidispersão e tamanho reduzido (20  $\mu\text{m}$ ). Observa-se nitidamente que as microesferas de PCL-Cx obtidas apresentam uma estrutura compacta, sem a presença de poros superficiais.

A distribuição do tamanho das microesferas PCL-Cx através do espalhamento de luz (lazer de 488 nm, Mastersize S) mostrou uma distribuição unimodal, com diâmetro médio em torno de 28  $\mu\text{m}$ .



(A)



(B)

Figura 2. Micrografia MEV das microesferas de PCL contendo crotoxina (A) e distribuição de tamanho (B).

### Ensaio *in vitro* de liberação da crotoxina

As microesferas de poli- $\epsilon$ -caprolactona foram analisadas quanto à cinética de liberação da crotoxina incorporada sendo os resultados obtidos apresentados na Figura 3. Os estudos de liberação controlada demonstram que o sistema PCL-Cx

apresenta uma cinética de liberação de ordem zero observando-se a liberação acumulativa de 90% de Cr em 120 horas.

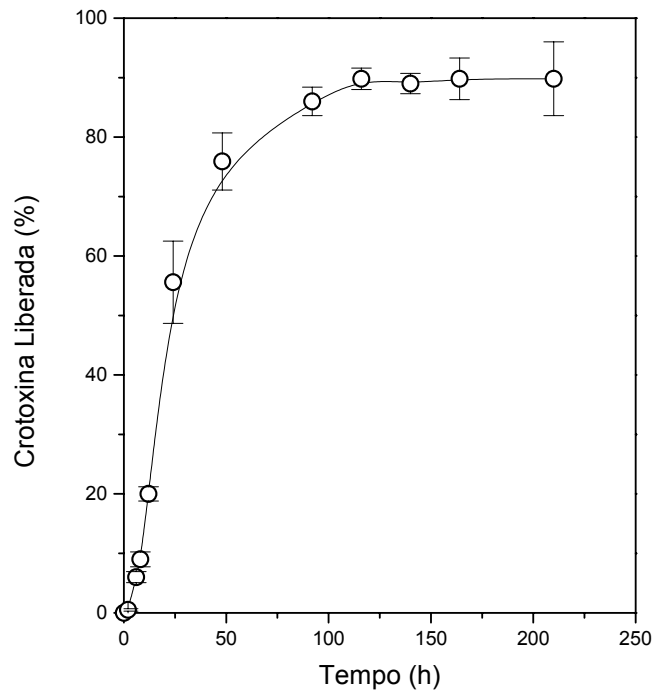


Figura 3. Cinética de liberação *in vitro* de crotoxina incorporada nas microesferas de PCL em solução tampão fosfato salina (PBS, pH 7,4) a 37 °C contendo 2 % (m/v) de Tween 80®.

#### Teste de citotoxicidade do bioconjugado PCL-Cx

A curva de citotoxicidade obtida com células CHO-K1 é apresentada na Figura 4. O índice de citotoxicidade ( $IC_{50\%}$ ) calculado foi de 650  $\mu\text{g/mL}$ .

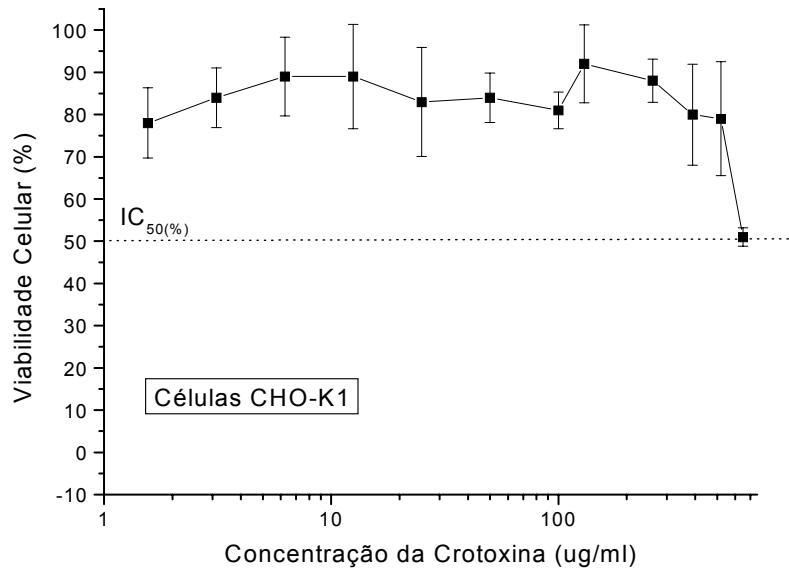


Figura 4. Curva de citotoxicidade da crotoxina em contato com células CHO-K1.

#### Ensaio de atividade biológica do bioconjugado PCL-Cx

O índice de variação de peso dos animais em função das diferentes formas de administração do princípio bioativo foi acompanhado por 20 dias. Na Figura 5 são apresentadas as variações de peso dos grupos que receberam a administração diária de crotoxina ou o implante da microesferas de liberação lenta. O peso dos animais mostra que não houve alterações significativas em todos os grupos; no entanto é perceptível o início da queda de peso do grupo injetado com crotoxina livre. Em todos os grupos não foram observadas alterações comportamentais evidentes. Também não ocorreram reações inflamatórias no local do implante das microesferas do bioconjugado PCL-Cx.

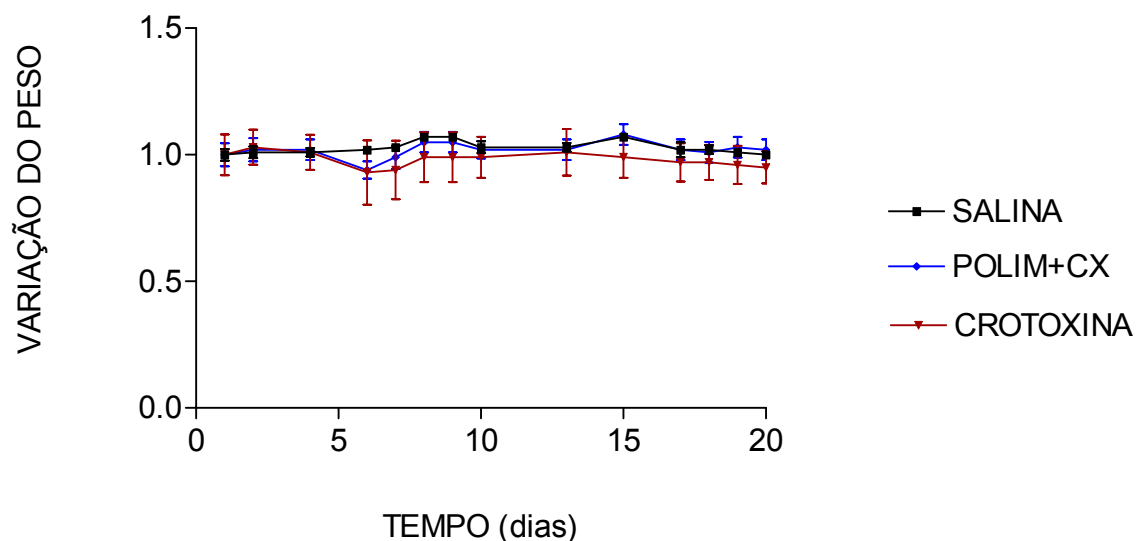


Figura 5. Gráfico da variação do peso dos animais injetados com solução salina crotoxina livre ou implantado com microesferas de liberação contínua de crotoxina.

## CONCLUSÕES

A utilização de microesferas para a obtenção de sistemas de liberação controlada de fármacos representa um importante avanço na tecnologia farmacêutica. Estes sistemas se caracterizam pelo tamanho reduzido das partículas e compartimentalização dos princípios bioativos em ambientes restritos, podendo, com isso, direcionar o fármaco para regiões específicas favorecendo sua interação com o sistema biológico.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a incorporação da crotoxina em microesferas biodegradáveis de PCL reduziu significativamente a toxicidade da proteína ofídica sem contudo, alterar sua atividade biológica. São resultados promissores e estão sendo utilizados como ponto de partida para investigar novos sistemas de liberação de crotoxina em escala mais reduzida tais como nanoesferas biodegradáveis de PCL como novas alternativas para a administração desta proteína. Ressalta-se entretanto que, as microesferas de PCL-Cx ainda necessitam ser submetidas a ensaios para avaliação da neurotoxicidade local de forma a garantir sua utilização segura na prática clínica.

## REFERENCIAS

1. CAMARGO, A.C.M, The Sweet Side of Venom - Center for Applied Toxinology. ***Drug Discovery Technology***, p. 1-4, 2004.
2. TU AT, GILTNER JB. Cytotoxic effects of snake venoms on KB and Yoshida sarcoma cells. ***Res Commun Chem Pathol Pharmacol***. v. 9. n..4. p.783-786. 1974.
3. CHAIM-MATYAS A, OVADIA M. Cytotoxic activity of various snake venoms on melanoma, B16F10 and chondrosarcoma. ***Life Sci***. v. 40. n.16. p.1601-1607. 1987
4. BRAGANCA BM, PATEL NT, BADRINATH PG. Isolation and properties of a cobra venom factor selectively cytotoxic to Yoshida sarcoma cells. ***Biochim Biophys Acta***. v.136. n.3. p.508-520. 1967
5. KANEDA N, HAMAGUCHI M, KOJIMA K, KANESHIMA H, HAYASHI K. Action of cobra venom cardiotoxin on chick embryonal fibroblasts transformed with a temperature-sensitive mutant of Rous sarcoma virus. ***FEBS Lett***. v.192. n.2. p:313-316. 1985
6. CHWETZOFF S, TSUNASAWA S, SAKIYAMA F, MENEZ A. Nigexine, a phospholipase A2 from cobra venom with cytotoxic properties not related to esterase activity. Purification, amino acid sequence, and biological properties. ***J Biol Chem***. v.264. n.22. p.13289-13297. 1989
7. CORIN, R.E.; VISKATIS, L.J.; VIDAL, J.C.; ETCHEVERRY, M.A., Cytotoxicity of crotoxin on murine erythroleukemia cells *in vitro*. ***Invest. New Drugs***. v. 11 n.1, p. 11-15, 1993.
8. RUDD ET AL.,1994 RUDD, C.J.; VISKATIS, L.J.; VIDAL, J.C.; ETCHEVERRY, M.A., *In vitro* comparison of cytotoxic effects of crotoxin against three human tumors and a normal human epidermal keratinocyte cell line, ***Investigational New Drugs***, v. 12, p.183-184, 1994.
9. CURA, J.E; BLANZACO, D.P.; BRISSON, C.; CURA, M.A.; CABROL, R.; LARRATEGUY, L.; MENDEZ, C.; SECHI, J.C.; SILVEIRA, J.S.; THEILLER, E.;ROODT, A.R.; VIDAL, J.C, Phase I and Pharmacokinetics Study of Crotoxin (Cytotoxic PLA<sub>2</sub>, NSC-624244) in Patients with Advanced Cancer. ***Clinical Cancer Res.***, v. 8. p. 1033-1041. 2002.
10. DO NASCIMENTO N, SEEBART CS, FRANCIS B, ROGERO JR, KAISER II. Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. ***Toxicon***. v.34. n.1. p.123-131. 1996.
11. BRADFORD, M.M., A rapid and sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. ***Anal. Biochem.***, v. 72, p. 248-254, 1976.
12. HOLZER, M., MACKESSY, S.P. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A<sub>2</sub>. ***Toxicon***, v. 34. n.10. p.1149-1155, 1996.

13. LAEMMLI, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** (London), v. 227, p. 680-685, 1970.
14. DE ARRUDA ALMEIDA K, DE QUEIROZ AA, HIGA OZ, ABRAHAM GA, SAN ROMAN J. Macroporous poly(epsilon-caprolactone) with antimicrobial activity obtained by iodine polymerization. **J Biomed Mater Res A**. v.68. n.3: p.473-478. 2004.
15. DOS SANTOS KS, COELHO JF, FERREIRA P, PINTO I, LORENZETTI SG, FERREIRA EI, HIGA OZ, GIL MH. Synthesis and characterization of membranes obtained by graft copolymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate and acrylic acid onto chitosan. **Int J Pharm**. V.310. n.1-2. p.37-45. 2006

## **STUDY OF THE BIOCOMPATIBLE PROPERTIES OF THE POLY( $\epsilon$ CAPROLACTONE)-CROTOXIN BIOCONJUGATE**

### **ABSTRACT**

Poli( $\epsilon$  caprolactone) (PCL) microspheres with incorporated crotoxin (Cx) were prepared for the composition of a controlled drug delivery system. The monodispersed microspheres of the macromolecular bioconjugate PCL-Cx were obtained by the extraction evaporation technique of the solvent in an oil-water emulsion. The *in vitro* study of Cx release from the microspheres indicated a gradual and continuous release, reducing in a meaningful way the native toxicity of the protein. The *in vivo* biological assay pointed out a higher loss of weight in the group of animals injected with free Cx in comparison with the group of animals implanted with the PCL-Cx bioconjugate. This fact suggests a minor toxicity of the controlled release system of PCL-Cx relatively to the free protein. The results of the biological tests showed the potential use of PCL microspheres bioconjugate with Cx in an effective delivery system with decreased toxicity.

Key-words: Poli( $\epsilon$  caprolactone) , crotoxin , bioconjugate , microspheres , antitumoral activity