

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL E SOBREVIVÊNCIA DE CAMUNDONGOS TRANSPLANTADO COM TUMORES EXPERIMENTAIS E TRATADOS COM ÁCIDO BARBÁTICO DE *CLADONIA SALZMANNII* (LÍQUEN)

Roseane Gonçalves da Silva¹; Noemia Pereira da Silva Santos²

¹Estudante do Curso de Enfermagem – CAV/UFPE; E-mail:roseane_g_silva@hotmail.com

²Docente/pesquisador do – CAV/UFPE . E-mail: npereiradasilvasantos@gmail.com

Sumário: Este trabalho teve como objetivo estudar a avaliação da atividade antitumoral e sobrevivência de camundongos Swiss transplantados com tumor carcinoma de Ehrlich e tratados com lipossomas contendo ácido barbático de *Cladonia salzmannii*. Os lipossomas convencionais (AB-LC) e furtivos (AB-LF) foram produzidos pelo método de hidratação do filme lipídico. A avaliação da atividade antitumoral foi realizada frente ao tumor experimental sólido sarcoma-180 e carcinoma de Ehrlich. A inibição tumoral foi de 21,79; 30,26 e 42,96% pra AB, AB-LC e AB-LF, respectivamente. Os animais tratados com lipossomas peguados, além de apresentarem maior inibição tumoral, tiveram um aumento no tempo de sobrevivência com relação aos animais tratados com a suspensão do ácido barbático. Estes achados demonstraram que a encapsulação do ácido barbático proporcionou redução na toxicidade, aumentando, portanto a sua atividade antitumoral.

Palavras-chave: ácido barbático; atividade antitumoral; sobrevivência;

INTRODUÇÃO

O ácido barbático apresenta diversas atividades biológicas tais como: antimicrobiana, inibidor da cadeia transportadora de elétrons, inibidor da síntese de leucotrieno B₄(LTB₄) e citotóxica frente a diferentes linhagens cancerígenas (TAKAHAGI et al., 2006; PEREIRA et al., 1994). Apesar de grandes interesses no estudo químico dos líquens, devido a ação antitumoral de seus metabólitos secundários, existe uma limitação para o uso dessas substâncias como protótipo para novas moléculas bioativas, devido principalmente a sua baixa hidrossolubilidade e aos efeitos tóxicos (MICHELETTI et al., 2009; PARHI et al., 2012). O ácido barbático apresenta diversas atividades biológicas tais como: antimicrobiana, inibidor da cadeia transportadora de elétrons, inibidor da síntese de leucotrieno B₄(LTB₄) e citotóxica frente a diferentes linhagens cancerígenas (TAKAHAGI et al., 2006). Apesar de grandes interesses no estudo químico dos líquens, devido a ação antitumoral de seus metabólitos secundários, existe uma limitação para o uso dessas substâncias como protótipo para novas moléculas bioativas, devido principalmente a sua baixa hidrossolubilidade e aos efeitos tóxicos (PARHI et al., 2012). Entre os vários sistemas de entrega de droga, os lipossomas, vesículas formadas por bicamadas lipídicas, representam uma abordagem avançada na veiculação de moléculas farmacológicas. Grande parte do interesse em explorar esses carreadores é devido às vantagens como a facilidade de obtenção, o seu tamanho e biocompatibilidade, a capacidade de encapsular fármacos hidrofílicos e lipofílicos e ainda pela possibilidade de modificar suas superfícies (WANG et al. 2011). Polímeros, tais como polietileno glicol (PEG) pode ser inserido na bicamada lipídica, formando assim “lipossomas furtivos” (PASUT et al., 2012). O PEG cria uma barreira estérica em torno da superfície do lipossoma, que impede a ligação de proteínas do sistema complemento, por conseguinte, impede o reconhecimento imunológico e a perda de estabilidade *in vivo*. Dessa forma, prolonga-se a circulação sanguínea dos sistemas peguados, o que pode melhorar a sua eficácia terapêutica de muitas moléculas

terapêuticas (CAVADAS et al., 2011). Diante do exposto, o objetivo deste trabalho será avaliar a atividade antitumoral de lipossomas furtivos contendo o ácido barbático de *Cladonia salzmannii* frente ao tumor sólido carcinoma de Ehrlich. Também será avaliado a sobrevivência de camundongos Swiss transplantados com tumor carcinoma de Ehrlich tratados com ácido barbático livre e encapsulado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os lipossomas convencionais (AB-LC) e furtivos e (AB-LF) contendo ácido barbático (AB) foram preparados utilizando-se a técnica de hidratação do filme lipídico. Para obtenção dos lipossomas convencionais (AB-LC), a fosfatidilcolina de soja, o colesterol e a esterealamina (7:2:1) e o ácido barbático serão pesados e solubilizados separadamente em 20 mL de uma mistura de solventes orgânicos clorofórmio/metanol (3:1), sob placa agitadora magnética. Os lipossomas furtivos (AB-LF) serão preparados utilizando a fosfatidilcolina de soja, o colesterol, PEG-2000 (1,8: 1,0: 0,15) [15, 16], e o ácido barbático, ambos serão solubilizados em 40 mL da mistura de solventes orgânicos clorofórmio/metanol (3:1). Os solventes serão removidos sob evaporação reduzida para produção de filme lipídico. O filme será hidratado utilizando 10 ml de uma solução tampão fosfato pH 7,4, obtendo-se assim lipossomas multilamelares. Para adquirir lipossomas unilamelares (SUV) as suspensões de MLV serão sonicadas por 300s. O estudo de atividade antitumoral foi realizado em camundongos Swiss, machos com 35-45g de peso corporal, 50-60 dias de idade. As experiências em animais foram realizadas de acordo com a aprovação do Comitê de Ética para Experimentos com Animais da Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brasil), Processo n. 23076.050904/2011/69. O tumor ascítico carcinoma de Ehrlich e Sarcoma -180 (5×10^6 células/ml/animal) foram inoculados subcutaneamente na região axilar direita de camundongos. O tratamento foi iniciado 24 horas após a inoculação, com injeções intraperitoneal diária de ácido barbático em suspensão (0,5 % v/v de Tween 80 em solução estéril de NaCl a 0,9%) ou lipossomas, convencionais ou furtivos contendo o ácido barbático a uma dose de 20 mg/kg/dia durante 7 dias. Um controle positivo foi tratado com 5-Fluoracil e outro grupo foi tratado diariamente com o veículo (solução estéril NaCl 0,9% e Tween 80 (0,05%)), durante 7 dias. Após o tratamento, os animais foram sacrificados com overdose do anestésico Uretane (1,25g/ Kg). Amostras de sangue serão coletadas em microtubos para análise hematológica. Tumores e órgãos (fígado, rins e baço) foram incisas, e seus pesos serão medidos. A inibição tumoral foi determinada a partir do peso médio dos tumores dos grupos de animais tratados em relação ao grupo controle. Estudo de Sobrevivência dos camundongos portadores do Sarcoma-180, foram divididos aleatoriamente em três grupos com 10 animais cada. Vinte e quatro horas após a inoculação do tumor os camundongos foram tratados via ip com ácido barbático em suspensão ou lipossomas furtivos de ácido barbático a uma dose 20 mg/kg/dia durante 8 dias. O comportamento dos animais foi monitorizado durante o tratamento e o tempo de sobrevivência registrado (SANTOS et al., 2006).

RESULTADOS

Nos estudos de atividade antitumoral frente ao tumor Sarcoma-180 o grupo controle negativo tratado com solução salina apresentaram uma massa tumoral média de $3,65 \pm 0,83$ g e controle positivo tratado com 5-Fu demonstraram $3,01 \pm 0,3$ g. Paralelamente os tumores dos animais tratados com AB, AB-LC e AB-LF foram reduzidos $2,78 \pm 0,44$ g, $2,48 \pm 0,41$ g e $1,99 \pm 0,41$ g respectivamente, a uma dose de 20mg/kg/dia de ácido barbático. Essas reduções deram taxa de inibição de 21,72; 30,27 e 42,97 %, respectivamente. Na mesma dose, o 5-Fu reduziu o peso do tumor em 8,91%, nas mesmas condições

experimentais. A inibição promovida por AB-LC a AB-LF foi significativamente estatística quando comparamos com o 5-Fu. Por outro lado no ensaio de atividade antitumoral com o tumor carcinoma de Ehrlich, observou-se que, o grupo controle negativo tratado com solução salina apresentaram uma massa tumoral média de $6,18 \pm 0,75$ g e controle positivo tratado com 5-Fu demonstraram $2,01 \pm 0,3$ g. Paralelamente os tumores dos animais tratados com AB, AB-LC e AB-LF apresentaram valores médios de $3,95 \pm 0,80$ g, $3,41 \pm 0,63$ g e $3,15 \pm 0,53$ g respectivamente, a uma dose de 20mg/kg/dia de ácido barbático. Essas reduções deram taxa de inibição de 35,98; 44,73 e 40,07 %, respectivamente. Na mesma dose, o 5-Fu reduziu o peso do tumor em 65,4%, nas mesmas condições experimentais. Análise de sobrevivência dos camundongos com Sarcoma 180 revelou que o comportamento e os achados clínicos foram preservados na primeira semana de tratamento, tanto no grupo controle quanto nos grupos tratados com AB e AB-LF. A partir da segunda semana, os animais apresentaram morte. Cinquenta por centos dos animais tratados com ácido barbático livre e 50% dos animais tratados com os lipossomas furtivos morreram no décimo primeiro dia após a inoculação do tumor. Além disso, 20% dos animais tratados com AB-LF sobreviveram até o décimo sétimo dia e 10% conseguiram resistir até 20º dia. Enquanto que o grupo de animais tratados com ácido barbático em suspensão atingiu 100% de mortalidade no 16º após a inoculação do tumor. No grupo controle, a taxa de mortalidade situou-se em 50%, 12 após a inoculação do tumor, atingindo 100% em 16 dias.

DISCUSSÃO

O encapsulamento do ácido barbático proporcionou uma maior regressão do tumor, quando comparado ao composto não encapsulado, corroborando com uma pesquisa onde se investigou a ação antitumoral, frente ao sarcoma-180 de outro metabólito secundário liquênico, o ácido úsnico. Observou-se que encapsulação melhorou a atividade do ácido úsnico em 26,4 % em contraste com a sua forma de suspensão (SANTOS et al., 2006). Os resultados aqui apresentados mostraram aumento da atividade antitumoral em 39,36% para a encapsulação em lipossoma convencional e 97,33% para os lipossomas furtivos com relação ao composto em suspensão (AB). Embora a encapsulação tenha potencializado a atividade antitumoral do ácido barbático, a peguilação dos lipossomas praticamente dobrou essa ação. Durante o estudo da análise de sobrevivência dos camundongos transplantados com Sarcoma 180 observou-se que durante este período, os animais nos dois grupos tratados com ácido livre e encapsulado apresentaram características clínicas semelhantes enquanto que no grupo controle e no grupo AB a taquicardia era mais evidente. Estes resultados demonstram que o encapsulamento ácido barbático em lipossomas furtivos foi capaz de atingir uma taxa de sobrevivência de 31,25%, quando em comparação com o grupo tratado com a suspensão de ácido barbático 16 dias após a inoculação do tumor. Um resultado semelhante foi descrito por Santos e colaboradores (2006), onde a encapsulação do ácido úsnico foi capaz de atingir uma taxa de sobrevivência de 33%, quando em comparação com o grupo tratado com a suspensão de ácido úsnico.

CONCLUSÕES

O ácido barbático demonstrou ter atividade antitumoral maior que o 5-Fu, frente ao sarcoma-180, além disso, a encapsulação em lipossomas potencializou sua atividade, porém a formulação furtiva dobrou a atividade antitumoral do referido composto. O tratamento com ácido barbático livre e encapsulado. Os animais tratados com lipossomas peguilados, além de apresentarem maior inibição tumoral, tiveram um aumento no tempo de sobrevivência com relação aos animais tratados com a suspensão do ácido barbático.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro durante a execução do projeto. A professora Dr^a. Noêmia pela orientação e pela oportunidade oferecida de engrandecer o meu curriculum e meus conhecimentos científicos.

REFERÊNCIAS

- CULBERSON, C. F; CULBERSON, W. L.; JOHNSON, A. Genetic and Environmental Effects on Growth and Production of Secondary Compounds in *Cladonia cristatella*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Carolina do Norte, v. 11, n. 2, p. 77-84, mai. 1983.
- BUNJES, H. Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, n. 5, p. 405-411, out. 2011.
- BERGRAN, B. R. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e cultura, São Paulo**, v. 60, n. 2, p. 54-57, 2008.
- DIEBOLD, Y.; JARRÍN, M.; SÁEZ, V.; CARVALHO, E.L.S.; OREA, M.; CALONGE, M.; SEJO, B.; ALONSO, M.J. Ocular drug delivery by liposomechitosan nanoparticle complexes (LCS-NP). **Biomaterials**, Amsterdam, v.28, n.8, p.1553-1564, mar. 2006.
- EDWARDS, H.G.; NEWTON, E.M.; WYNN-WILLIAMS, D.D. Molecular Structural Studies of Lichen Substances II: Atranorin, Gyrophoric Acid, Fumarprotocetraric Acid, Rhizocarpic Acid, Calycin, Pulvinic Dilactone and Usnic Acid. **Journal of Molecular Structure**, Villeneuve d'Ascq, v. 651-653, p. 27-37, jun. 2003.
- HONDA, N. K.; VILEGAS, W. A química dos líques. **Química nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 110-124, jan/fev. 1998
- MARTINS, C. B. M.; LIMA, M. J. G; SILVA, F. P.; SILVA, N. H.; PEREIRA, E. C. *Cladia aggregata* (lichen) from Brazilian Northeast: Chemical Characterization and Antimicrobial Activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.53, n.1, p. 115-122, jan-fev. 2010.
- NISHITOBA, Y.; NISHIMURA, H.; NISHIYAMA, T.; MIZUTANI, J. Lichen acids: plant growth inhibitors from *Usnea longissima*. **Phytochemistry**, Sapporo, v. 26, n.12, p. 3181-3185, 1987.
- MALLAVADHANI, U.V.; SUDHAKAR, A. V. S.; MAHAPATRA, A., NARASIMHAN, K.; THIRUNAVOKKARASU, M.; ELIX, J. A. Phenolic and steroidal constituents of the lichen *Usnea longissima*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 95-95, 2004.
- SANTOS N.P., NASCIMENTO S.C., WANDERLEY M.S.O, TELLES N., CASTRO C.M.M B., PEREIRA E.C., SILVA N.H., HONDA N.K., SANTOS-MAGALHÃES N.S., Nanoencapsulation of usnic acid: An attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity, **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v.64 p.154-160, 2006.
- PARHI, P.; MOHANTY, M.; SAHOO, S. K. Nanotechnology-based combinational drug delivery: an emerging approach for cancer therapy. **Drug Discovery Today**, Orissa, v.17, n. 17-18, p. 1-9, set. 2012.
- TAKAHAGI, T.; IKEZAWA, N.; ENDO, T.; IFUKU, K.; YAMAMOTO, Y.; KIMOSHITA, Y.; TAKESHITA, S.; SATO, F. Inhibition of PSII in Atrazine-Tolerant tobacco cells by Barbatic Acid, a lichen derived depside. **Bioscience, Biotechnology, Biochemistry**, v. 70, n. 1, p. 266-268, 2006.
- YAMAMOTO, Y.; MATSUBARA, H.; KINOSHITA, Y.; KINOSHITA, K.; KOYAMA, K.; TAKAHAHI, I. Naphthazarin derivatives from cultures of the lichen *Cladonia cristatella*, **Phytochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1239-1242, dez. 1996.