



Nanoencapsulação de um peptídeo isolado de anuros: citotoxicidade *in vitro* em células tumorais humanas

José Jauro Lopes Anchiêta Júnior¹; Handerson Rodrigues Silva Lima²; Isabella Macário Ferro Cavalcante³; José Roberto de Souza de Almeida Leite⁴; Nereide Stela Santos Magalhães³; Hercília Maria Lins Rolim^{1*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

² Graduação em Farmácia, Campus Ministro Petrônio Portella

³ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco.

⁴ Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, Campus Ministro Reis Velloso, Universidade Federal do Piauí.

RESUMO

A terapia antineoplásica tradicional apresenta algumas limitações que podem ser superadas através da utilização dos lipossomas. Estes nanossistemas de carregamento possibilitam o direcionamento de fármacos e reduzem efeitos secundários. Alguns peptídeos catiônicos sintetizados na pele de anuros apresentam atividade citotóxica seletiva (microorganismos e/ou tumores). Neste sentido, espécies do gênero *Phyllomedusa* secretam as dermaseptinas. Objetivou-se neste estudo, avaliar a citotoxicidade *in vitro* da dermaseptina 01 (DS 01) livre e encapsulada em lipossomas unilamelares pequenos (SUVs) em células tumorais humanas. Os lipossomas foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico seguido de sonicação. Foram produzidas formulações neutras e catiônicas, convencionais e furtivas. A citotoxicidade foi analisada em células tumorais de pulmão (NCI-H292), cólon (HT-29) e laringe (HEp-2), pelo ensaio de redução do sal tetrazólio (MTT) em placas de 96 poços. Os lipossomas foram submetidos a testes de estabilidade acelerada e em longo prazo. Em NCI-H292, a DS 01 livre apresentou efeito citostático médio de 35,6%. A encapsulação do peptídeo em lipossomas convencionais neutros aumentou o efeito, ao contrário dos furtivos. Para HT-29 e HEp-2, a DS 01 livre inibiu o crescimento celular em aproximadamente 50%, em média. A encapsulação em lipossomas catiônicos potencializou o efeito; os lipossomas convencionais inibiram na faixa de 80% e os furtivos, mais que 95% para as duas linhagens celulares. A DS 01, um peptídeo catiônico antimicrobiano, apresentou efeito citotóxico *in vitro* para células tumorais humanas que foi potencializado com a nanoencapsulação.

Palavras-chave: Antineoplásicos. Citotoxicidade *in vitro*. Dermaseptina 01. Lipossomas. Peptídeos catiônicos. Tetrazólio.

INTRODUÇÃO

Câncer é a denominação genérica dada a um conjunto de mais de 200 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos (tumores malignos), podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase) (Brasil, 2011). É uma das doenças mais comuns do mundo e resulta de alterações em oncogenes e/ou supressores tumorais que podem modificar as vias sinalizadoras de proliferação ou destruição de células cancerosas (Liu et al., 2011).

Os tratamentos farmacológicos convencionais dos tumores malignos humanos apresentam várias limitações, principalmente nos casos avançados. Isso acontece devido às características dos fármacos atualmente disponíveis e às características fisiopatológicas das células cancerosas, tais como instabilidade genética, heterogeneidade, resistência farmacológica intrínseca ou adquirida; existência de uma fase de baixo crescimento celular, apresentação antigênica reduzida, comportamentos *in vivo* e *in vitro* diferentes, e diagnósticos em estágios avançados (metástase) (Gomez-Navarro et al., 1999).

Boa parte dos antineoplásicos apresentam propriedades farmacêuticas e farmacológicas inadequadas, como baixa hidrossolubilidade, instabilidade, farmacocinética desfavorável (biodistribuição não-seletiva e metabolismo rápido) e toxicidade orgânica elevada. Além disso, a resistência farmacológica múltipla vem se tornando mais comum e um obstáculo à uma quimioterapia bem-sucedida, resultando em uma resposta terapêutica incompleta, recorrente e em metástases, e na baixa qualidade de vida do paciente (Allen et al., 2006).

Os sistemas nanométricos de liberação controlada estão atraindo uma atenção considerável como uma forma de superar as limitações da terapia antineoplásica convencional. Lipossomas são nanossistemas arquetípicos de carregamento e liberação de fármacos que possibilitam o direcionamento específico de anticancerígenos para tumores, previnem efeitos secundários em tecidos saudáveis e aumentam a captação celular destes fármacos (Bao et al., 2006; Wang et al., 2011; Jack Hu & Zhang, 2012; Slingerland et al., 2012).

Estes lipossomas, também conhecidos como vesículas lipídicas, podem conter uma única bicamada

lipídica ou bicamadas múltiplas em torno do compartimento aquoso interno, sendo classificadas como unilamelar e multilamelar, respectivamente. Em relação ao tamanho, as vesículas unilamelares podem ser pequenas ou grandes, assim são observados lipossomas unilamelares pequenos - SUV (*small unilamellar vesicles*) e lipossomas unilamelares grandes - LUV (*large unilamellar vesicles*) (Batista et al., 2007).

Os lipossomas também podem ser classificados segundo a interação com os sistemas biológicos, como convencionais, de longa circulação e sítio-específicos. Lipossomas convencionais são tipicamente compostos por fosfolípidos neutros e/ou carregados, e/ou colesterol. Lipídeos com carga são incorporados às membranas lipossomais para prevenir a agregação de vesículas e aumentar o volume aquoso interno. Para a obtenção de lipossomas carregados, frequentemente são utilizadas as seguintes substâncias: octadecilamina (estearilamina), fosfatidilserina, fosfatidilglicerol e ácido fosfatídico, sendo que a primeira apresenta carga positiva, e as seguintes, negativas. Os lipossomas de longa circulação, também chamados *stealth* ou furtivos, contêm na sua superfície carboidratos hidrofílicos (ex.: polímeros de potietilenoglicol) que evadem o reconhecimento pelo sistema retículoendotelial, aumentando o tempo de meia-vida das vesículas e tornando a farmacocinética dos lipossomas dose-independente. Os lipossomas sítio-específicos aumentam a especificidade de interação entre lipossomas e células-alvo, e a quantidade de fármaco liberado nestas células. São utilizados ligantes acoplados em sua superfície, o que confere seletividade ao sítio de ação desejado (Rolim-Santos et al., 2006; Batista et al., 2007).

Apesar dos grandes avanços na terapia anticâncer, existe um interesse considerável no desenvolvimento de agentes antineoplásicos com novos mecanismos de ação, devido ao desenvolvimento de resistência farmacológica pelas células tumorais aos medicamentos convencionais. Um crescente número de estudos tem demonstrado que alguns peptídeos catiônicos antimicrobianos (naturais e sintéticos), que são ativos contra microorganismos, apresentam um amplo espectro de citotoxicidade para células cancerosas, o que vem aumentando a relevância dessas moléculas (Hoskin & Ramamoorthy, 2008).

Peptídeos citolíticos são sintetizados em glândulas granulares presentes na pele de espécies de anuros (sapos, rãs e pererecas) e constituem um importante componente da imunidade inata destes animais, protegendo-os contra a invasão por patógenos e ingestão por predadores. Essas substâncias são liberadas em resposta a infecções ou condições de estresse, geralmente em altíssimas concentrações. *Phyllomedusa* é um gênero de perereca da América Central e do Sul que vive na região entre a Costa Rica e o sul da Argentina, compreende 56 espécies e é uma fonte rica de peptídeos agrupados, segundo suas semelhanças estruturais nas seguintes famílias: dermaseptinas (DSs), dermatoxinas, filoxinas, filoseptinas e Gly-Leu-rich peptídeos. Os membros dessas famílias diferem em sua estrutura primária e atividade biológica, mas conservam as sequências de aminoácidos e regiões amino-terminais, características herdadas dos seus precursores biossintéticos (Hancock, 2001; Vanhoye et al., 2003; Conlon et al., 2007; Amiche et al., 2008).

As DSs são os principais componentes peptídicos antimicrobianos em perereca e rãs. São sintetizadas pelo gênero *Phyllomedusa* e formam uma grande família com cerca de 30 diferentes peptídeos. Em geral, possuem uma cadeia longa de 27 a 34 aminoácidos e são catiônicas, com 3 a 6 resíduos de lisina dispersos uniformemente e 1 resíduo de triptofano na posição 3. Esta disposição espacial dos aminoácidos contribui para a estrutura anfipática de tais moléculas perante as membranas celulares. O provável mecanismo de ação das DSs é o “de tapete”, em que ocorre a formação de α -hélices anfipáticas que se associam às bicamadas fosfolipídicas das membranas celulares provocando permeabilização e ruptura (La Rocca et al., 1999; Shai, 1999; Rosal et al., 2005; Thompson et al., 2007).

A dermaseptina 01 (DS 01) é secretada por algumas espécies como *P. hypochondrialis* e *P. oreades*, que ocorrem no delta do rio Parnaíba entre os estados do Piauí e Maranhão. Este peptídeo apresenta estrutura primária: GLWS-TIKQKGKEAAIAAAKAA-GQAALGAL – NH₂, massa molecular: 2793,39 Da, carga global total: +4, ponto isoelétrico teórico: 10,0 e hidrofobicidade: 1,8. É composto por cerca de 70% de aminoácidos apolares, mas também contém resíduos alifáticos e polares neutros. As cadeias de aminoácidos são projetadas para baixo do eixo da α -hélice (Brand et al., 2002; Brand et al., 2006; Leite et al., 2008; Zampa et al., 2009; De Moraes et al., 2011). Esses autores também estudaram a atividade antimicrobiana para espécies de bactérias, fungos e protozoários.

A aplicação de proteínas bioativas como agentes terapêuticos é fortemente limitada por sua rápida depuração após administração, seja no sítio de aplicação ou na circulação. Fármacos protéicos de baixo peso molecular possuem estabilidades química e física limitadas, sendo assim suscetíveis à proteólise, modificação química e desnaturação. Doses frequentes são necessárias para que se atinja níveis terapêuticos, o que pode resultar em efeitos colaterais sistêmicos graves. Assim, a utilização adequada dessas macromoléculas na terapia médica depende do desenvolvimento de sistemas que contornem estes problemas. Os lipossomas são carreadores amplamente utilizados e podem encapsular proteínas, protegendo-as contra a proteólise ou outros fatores desestabilizadores (Meyenburg et al., 2000; Van Slooten et al., 2001).

O presente estudo teve como objetivo encapsular satisfatoriamente a DS 01 em lipossomas unilamelares pequenos (SUVs) e estudar a citotoxicidade *in vitro* deste peptídeo livre e encapsulado em células tumorais humanas.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação dos lipossomas

Os lipossomas foram preparados pelos métodos de hidratação do filme lipídico e sonicação, segundo Lasic (1992), com modificações. A literatura mostra que, com esta metodologia obtêm-se valores mais elevados de moléculas lipofílicas encapsuladas. A concentração peptídica encapsulada foi 50 μ g/mL e a concentração lipídica total, 38 μ M. Foram delineados quatro tipos de lipossomas contendo DS 01:

1. Lipossomas convencionais neutros contendo DS 01 (LCD): fosfatidilcolina de soja / colesterol (8 : 2);

2. Lipossomas furtivos neutros contendo DS 01 (LFD): fosfatidilcolina de soja / fosfatidiletanolamina-polietilenoglicol (DSPE-PEG 2000) / colesterol (7,5 : 0,5 : 2).

3. Lipossomas convencionais catiônicos contendo DS 01 (LCD+): fosfatidilcolina de soja / colesterol / estearilamina (7 : 2 : 1);

4. Lipossomas furtivos catiônicos contendo DS 01 (LFD+): fosfatidilcolina de soja / DSPE-PEG / colesterol / estearilamina (6,5 : 0,5 : 2 : 1).

Esses constituintes foram solubilizados em uma mistura de clorofórmio/metanol (3:1, v/v), sob agitação magnética em um balão volumétrico. A solução foi rotaevaporada por aproximadamente 60 minutos ($36 \pm 1^\circ\text{C}$, 80 rpm), formando-se um fino filme lipídico no balão. Este filme foi hidratado com solução de DS 01 50 $\mu\text{g/mL}$ (10 mL) por agitação leve para a formação das vesículas multilamelares. Foi adicionada Trealose (1 g) à solução para possibilitar a liofilização dos lipossomas. Para homogeneidade no tamanho e número de lamelas, as vesículas foram submetidas à sonicação através de sonda ultrassônica (Vibra Cell, BRANSON, EUA) a 200 W e 40 Hz por 600 segundos, obtendo-se as vesículas unilamelares pequenas (SUVs). Ao final, todas as amostras foram filtradas (Milipore, Billerica, Massachusetts, USA) com poros de 0,22 μm e armazenadas a 4°C para a utilização nos testes pré-clínicos.

Após 24 h, foi realizada a caracterização físico-química inicial. Tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta foram determinados através da espectroscopia de correlação de fótons (Microtac Zetatrac S 3500). Foi verificado também o pH, bem como as características morfológicas gerais e físicas. Para a estabilidade acelerada, os lipossomas foram submetidos às seguintes condições distintas: centrifugação por 1 hora, 4°C e 6000 rpm, e agitação mecânica horizontal por 48 h, $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Para a estabilidade em longo prazo, os parâmetros foram aferidos após os períodos de 7, 14 e 21 dias. Para a obtenção das formulações liofilizadas, foi utilizado o sistema EZ-DRY; FTS System, USA.

Os valores dos resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média dos dados.

Ensaio de citotoxicidade do tetrazólio (MTT)

A citotoxicidade *in vitro* da DS 01 livre e encapsulada foi analisada em células de carcinoma mucoepidêmico de pulmão humano (NCI-H292), adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) e carcinoma epidermóide de laringe humana (HEp-2). Essas células foram cultivadas em meio essencial mínimo. O corante azul tripan foi utilizado para avaliar a viabilidade (Rolim-Santos et al., 2006). As células foram semeadas em placas de culturas de 96 poços (10^5 células/mL, 200 μL cada). O estudo compreendeu a análise de 5 amostras:

1. DS 01 livre (50 $\mu\text{g/mL}$)

2. Lipossomas convencionais neutros contendo DS 01 (50 $\mu\text{g/mL}$) - LCD;

3. Lipossomas furtivos neutros contendo DS 01 (50 $\mu\text{g/mL}$) - LFD;

4. Lipossomas convencionais catiônicos contendo DS 01 (50 $\mu\text{g/mL}$) - LCD+;

5. Lipossomas furtivos catiônicos contendo DS 01 (50 $\mu\text{g/mL}$) - LFD+

Inicialmente, uma alíquota de 20 μL de cada amostra foi adicionada a cada poço (duplicata) nas placas, sendo o volume final de cada poço de 220 μL . Uma das colunas foi utilizada como controle negativo (células não tratadas). A concentração final do peptídeo livre e encapsulado, teoricamente, foi de aproximadamente 4,55 $\mu\text{g/mL}$. Em seguida, as placas foram armazenadas por 72 h em estufa (37°C , 5% de CO_2).

Na sequência, o meio de cultura foi aspirado, foi adicionado 25 μL de brometo de 3-(4,5-dimetil triazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) a cada um dos poços e as placas foram novamente armazenadas por 3 h nas mesmas condições. Em seguida, foi adicionado 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). A leitura foi realizada em ELISA, à 540 nm. Os valores dos resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média dos dados.

RESULTADOS

Preparação dos lipossomas

Ao tempo zero (24 h após preparação), os lipossomas apresentaram tamanho médio inferior a 150 nm, exceto LCD. Os lipossomas catiônicos apresentaram-se com menor e mais uniforme tamanho médio de partícula (tabela 1). Adicionalmente, os lipossomas LCD+, LFD+, LCD e LFD apresentam média do potencial zeta de $+11,89 \pm 2,11$; $+10,29 \pm 1,08$; $+0,003 \pm 0,001$ e $+0,004 \pm 0,000$, respectivamente.

Os testes de estabilidade acelerada simulam as condições de estresse, as quais os lipossomas são submetidos durante fabricação, transporte e tempo de armazenamento. A centrifugação simula a passagem acelerada do tempo, a agitação mecânica e as condições de transporte (Lira et al., 2009). Sendo assim, os lipossomas produzidos foram submetidos aos testes em questão (tabela 1).

Tabela 1 – Caracterização inicial (tempo zero) e testes de estabilidade acelerada dos lipossomas contendo DS 01.

Formulação	Parâmetro / Teste	Tempo 0	Centrifugação	Agitação mecânica
LCD	TP (nm)	185,4 \pm 5,2	105,3 \pm 12,5	138,1 \pm 2,4
	PDI	0,307 \pm 0,018	0,516 \pm 0,126	0,310 \pm 0,019
	pH	7,3	7,4	7,3
LFD	TP (nm)	95,8 \pm 19,4	76,4 \pm 11,5	89,2 \pm 1,3
	PDI	0,427 \pm 0,034	0,466 \pm 0,143	0,252 \pm 0,013
	pH	7,3	7,4	7,3
LCD+	TP (nm)	100,7 \pm 14,9	128,0 \pm 31,6	106,6 \pm 19,2
	PDI	0,154 \pm 0,072	0,135 \pm 0,003	0,119 \pm 0,007
	pH	7,5	7,5	7,5
LFD+	TP (nm)	105,7 \pm 2,0	87,6 \pm 12,6	129,9 \pm 1,3
	PDI	0,279 \pm 0,008	0,320 \pm 0,029	0,231 \pm 0,018
	pH	7,5	7,5	7,3

TP = Tamanho médio de partícula; PDI = Índice médio de polidispersão; LCD: lipossomas convencionais neutros contendo DS 01; LFD: lipossomas furtivos neutros contendo DS 01; LCD+: lipossomas convencionais catiônicos contendo DS 01; LFD+: lipossomas furtivos catiônicos contendo DS 01.

Conforme a tabela 1, os lipossomas neutros apresentaram resultados satisfatórios nos testes de estabilidade acelerada. Foi observado que os lipossomas convencionais, que reduziram o diâmetro após os testes de caracterização inicial, permaneceram estáveis frente aos de estabilidade acelerada. Os lipossomas catiônicos apresentaram resultados melhores, evidenciados pelos valores de tamanho médio de partícula e índice de polidispersão. Em ambos os casos, as formulações furtivas apresentaram diâmetro médio de partícula menor.

De maneira geral, os lipossomas neutros e catiônicos apresentaram estabilidade em longo prazo por pelo menos 21 dias na forma líquida (não-liofilizada). Dentre as formulações neutras, a furtiva apresentou menor tamanho médio de partícula. Para as formulações catiônicas, não houve diferenças consideráveis entre convencionais e furtivas. Os lipossomas furtivos apresentaram menor índice de polidispersão e os valores de pH mantiveram-se entre 7,4 e 7,5.

Ensaio de citotoxicidade do tetrazólio (MTT)

A tabela 2 apresenta as porcentagens de inibição do crescimento das linhagens celulares de carcinoma humano de pulmão (NCI-H292), cólon (HT-29) e laringe (HEp-2) expostas à DS 01 livre e encapsulada.

Tabela 2 – Inibição do crescimento de NCI-H292, HT-29 e HEp-2 expostas à DS 01 livre e encapsulada.

Formulação	NCI-H292	HT-29	HEp-2
	Inibição % ± DP	Inibição % ± DP	Inibição % ± DP
LCD	46,03 ± 1,00	NT	NT
LFD	32,24 ± 2,80	NT	NT
LCD +	NT	82,26 ± 2,71	86,18 ± 4,36
LFD +	NT	96,32 ± 0,81	100 ± 0,00
DS 01 4,55 µg/mL	35,64 ± 9,23	50,10 ± 1,32	51,34 ± 3,52

Legenda: LCD: lipossomas convencionais neutros contendo DS 01; LFD: lipossomas furtivos neutros contendo DS 01; LCD+: lipossomas convencionais catiônicos contendo DS 01; LFD+: lipossomas furtivos catiônicos contendo DS 01; DP: desvio padrão; NT: não testado.

DISCUSSÃO

Os peptídeos catiônicos anfipáticos geralmente apresentam atividade ampla e seletiva contra microorganismos e células cancerígenas. Isso ocorre devido às diferenças entre a composição fosfolipídica das membranas de procarióticos e eucarióticos, e de células saudáveis e cancerosas. Membranas formadas por fosfolípidios e esteróides neutros (maioria dos eucariotes) não são suscetíveis à ação desestabilizadora dos peptídeos. Essas moléculas atuam principalmente em membranas compostas por fosfolípidios zwitteriônicos (bactérias Gram negativas) e negativos (bactérias, alguns fungos e tumores) (Simons & Ikonen, 2000; Bowdish et al., 2005; Dobrzynska et al., 2005; Hoskin & Ramamoorthy, 2008; Schweizer, 2009; Teixeira et al., 2012). Observando-se que os lipossomas deste trabalho foram preparados com fosfolípidios e esteróides neutros, pode-se presumir que a encapsulação da DS 01 não desestabilizará essas vesículas.

De maneira geral, os lipossomas furtivos apresentaram menor diâmetro médio de vesícula. Além disso, segundo Centis & Vermette (2008) e Park et al. (2011), o PEG é um polímero biologicamente inerte usado em carreadores farmacológicos para criar uma barreira estérica e/ou uma estrutura aquosa ao redor dos lipossomas, para protegê-los contra as proteínas plasmáticas do corpo. Esta barreira também poderia prevenir a fusão, agregação e ruptura dos lipossomas, reduzindo o seu tamanho e aumentando a eficiência de encapsulação.

O potencial zeta indica a estabilidade potencial de um sistema coloidal. Tal potencial aumenta proporcionalmente às forças de repulsão entre as partículas, conduzindo a uma formulação mais estável, pois as partículas não tendem à agregação (Paolino et al., 2006; Mady et al., 2012). Em um colóide estável, as partículas permanecem separadas e dispersas; já em um sistema instável, aglomeram-se gradualmente. Se estas possuem cargas elevadas, repelem-se; se a carga for próxima ou igual a zero, o movimento browniano provoca colisão e fusão entre as vesículas. Sendo assim, é desejável maximizar as cargas das partículas para alcançar maior estabilidade (Plessis et al., 1996). Os resultados evidenciaram que para os lipossomas convencionais, a presença de estearilamina dando carga positiva aos lipossomas, preveniu o aumento do diâmetro médio, efeito desejável para manter a estabilidade do sistema.

Ensaio colorimétrico que utilizam o sal MTT são amplamente empregados para a avaliação da citotoxicidade e viabilidade celular de substâncias. Este sal forma uma solução aquosa amarelada que, na presença de desidrogenases e agentes redutores de células metabolicamente ativas, torna-se um precipitado azul-violeta denominado formazan, de quantidade diretamente proporcional ao número de células vivas. Este precipitado pode ser solubilizado e extraído com solventes orgânicos para a leitura das absorbâncias e determinação da viabilidade celular (Berridge et al., 2005; Van Meerloo et al., 2011; Stockert et al., 2012).

Conforme a tabela 2, a encapsulação da DS 01 em lipossomas furtivos neutros reduziu levemente a sua ação citotóxica em NCI-H292. Sugere-se que o PEG, ao revestir a membrana lipossomal, criou uma barreira que provavelmente dificultou a liberação do peptídeo ou reduziu a fusão entre as membranas lipossomal e celular. Assim, durante o período em que as células ficaram armazenadas em estufa (72 h), os lipossomas convencionais promoveram uma maior liberação peptídica que os furtivos. Em um período mais longo, a concentração de DS 01, liberada a partir dos LFD, poderia se tornar progressivamente mais elevada, obtendo uma inibição do crescimento celular igual ou maior que LCD.

A encapsulação da DS 01 em lipossomas catiônicos potencializou a citotoxicidade do peptídeo em células HT-29 e HEp-2. Lipossomas catiônicos proporcionam um aumento na captação celular e citotoxicidade *in vitro* devido à interação eletrostática com as células, facilitando a endocitose e a liberação para o citosol (Jung et al., 2009).

Entre os lipossomas catiônicos, os furtivos foram mais citotóxicos com inibição de 100% para HEp-2. O PEG, ao favorecer uma redução no diâmetro médio das vesículas, possibilitou uma interação mais potente entre

lipossomas e células e, portanto, possivelmente uma maior liberação peptídica. Neste caso, sugere-se que a presença de estearilamina dificultou que o PEG funcionasse como uma barreira estérica, isto é, a presença das cargas na superfície superou a ação do carboidrato, conseqüentemente interferindo na liberação da DS 01. É válido ressaltar ainda que lipossomas vazios não apresentaram efeito antiproliferativo nas células testadas, evidenciando que este efeito provavelmente foi provocado pela ação do peptídeo carregado por lipossomas. Segundo Cortesi et al. (1994), fosfolípidios não são significativamente citotóxicos.

Sendo assim, foram produzidos lipossomas convencionais e furtivos, neutros e catiônicos, contendo o peptídeo DS 01, que permaneceram estáveis frente a experimentos que testam a resistência das formulações. Ensaio *in vitro* em células tumorais humanas (HEp-2, NCI-H292 e HT-29) demonstraram que o peptídeo livre tem ação citotóxica sobre estas linhagens e de maneira geral, a nanoencapsulação potencializou essa atividade.

AGRADECIMENTOS

À CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro; ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) – UFPE pela caracterização dos nanossistemas; ao Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia (UFPI) pelo fornecimento da molécula em estudo; e ao Laboratório de Cancerologia Experimental – UFPE (Profs. Dra. Gardênia Carmen Gadelha Militão e Dra. Teresinha Gonçalves da Silva) pelos testes *in vitro*.

ABSTRACT

Nanoencapsulation of a peptide isolated from anurans: in vitro cytotoxicity in human tumor cells

The conventional anticancer therapies show some limitations that can be overcome by using liposomes. This type of nanocarriers allows preferential targeting of drugs and reduces undesirable secondary effects. Some cationic peptides synthesized by the skin of anurans exhibit selective cytotoxicity (to pathogens and/or tumors). Species of *Phyllomedusa* secrete dermaseptins (DSs). The aim of this study was to assess the *in vitro* cytotoxicity of free and small unilamellar vesicle (SUV)-encapsulated dermaseptin 01 (DS 01) in various human tumor cells. Liposomes were prepared by lipid film hydration followed by sonication. Neutral and cationic, conventional and stealth liposomes were produced. Cytotoxicity was analyzed in lung (NCI-H292), colon (HT-29) and larynx (HEp-2) cancer cells, by the tetrazolium reduction method (MTT) carried out in 96-well microplates. Liposomes were tested for accelerated and long-term stability. In NCI-H292, free DS 01 showed a medium cytostatic effect of 36.5%. The conventional neutral liposome encapsulation of peptide increased this effect, whereas the stealth did not. In HT-29 and HEp-2, free DS 01 inhibited the cell growth by approximately 50% on average. The cationic liposome encapsulation was synergic, inhibition being about 80% in conventional and higher than 95% in stealth liposomes for both cell lines. Thus, DS 01, an antimicrobial cationic peptide,

showed *in vitro* cytotoxicity to human tumor cells that was potentiated by nanoencapsulation.

Keywords: Antineoplastics. Cationic peptides. Dermaseptin 01. *In vitro* cytotoxicity. Liposomes. Tetrazolium.

REFERÊNCIAS

Allen TM, Cheng WWK, Hare JI; Laginha, KM. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of lipidic nanoparticles in cancer. *Anticancer Agents Med Chem.* 2006;6:513-523.

Amiche M, Ladram A, Nicolas P. A consistent nomenclature of antimicrobial peptides isolated from frogs of the subfamily Phyllomedusinae. *Peptides.* 2008;29:2074-82.

Bao A, Phillips WT, Goins B, Zheng X, Sabour S, Natarajan M, Woolley FR, Zavaleta C, Otto RA. Potential use of drug carried-liposomes for cancer therapy via direct intratumoral injection. *Int J Pharm.* 2006;316:162-9.

Batista CM, De Carvalho CMB, Santos-Magalhães NS. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. *Braz J Pharm Sci.* 2007;43:167-79.

Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* 2005;11:127-52.

Bowdish DME, Davidson DJ, Hancock REWH. A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. *Current Protein and Peptide Science.* 2005;6:35-51.

Brand GD, Leite JRSA, Silva LP, Albuquerque S, Prates MV, Azevedo RB, Carregaro V, Silva JS, Sá VCL, Brandão RA, Bloch Jr C. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distinct* anti – *Trypanosoma cruzi* activity without cytotoxicity to mammalian cells. *J Biol Chem.* 2002;277:49332-40.

Brand GD, Leite JRSA, Mandel SMS, Mesquita DA, Silva LP, Prates MV, Barbosa EA, Vinecky F, Martins GR, Galasso JH, Kuckelhaus SAS, Sampaio RNR, Furtado Jr JR, Andrade AC, Bloch Jr C. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;347:739-46.

Brasil. Ministério da Saúde. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro (RJ); 2011.

Centis V, Vermette P. Physico-chemical properties and cytotoxicity assessment of PEG-modified liposomes containing human hemoglobin. *Colloids Surf B: Biointerfaces.* 2008;65:239-46.

Conlon JM, Woodhams DC, Raza H, Coquet L, Leprince J, Jouenne T, Vaudry H, Rollins-Smith LA. Peptides with differential cytolytic activity from skin secretions of the lemur leaf frog *Hylomantis lemur* (Hylidae: Phyllomedusinae). *Toxicon.* 2007;50:498-506.

Cortesi R, Esposito E, Gambari R, Menegatti E, Nastruzzi C. Liposome-associated retinoids: production,

- characterization and antiproliferative activity on neoplastic cells. *European J Pharm Sci.* 1994;2:281-91
- De Moraes J, Nascimento C, Miura LMCV, Leite JRSA, Nakano E, Kawano T. Evaluation of the in vitro activity of dermaseptin 01, a cationic antimicrobial peptide, against *Schistosoma mansoni*. *Chem Biodivers.* 2011;8:548-58.
- Dobrzynska J, Szachowicz-Petelska B, Sulkowski S, Figaszewski Z. Changes in electric charge and phospholipids composition in human colorectal cancer cells. *Mol Cell Biochem.* 2005;276:113-9.
- Gómez-Navarro J, Curiel DT, Douglas, JT. Gene therapy for cancer. *Eur J Cancer.* 1999;35:2039-57.
- Hancock RE. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis.* 2001;1:156-64.
- Hoskin DW, Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochem Biophys Acta.* 2008;1778:357-75.
- Jack Hu C, Zhang L. Nanoparticle-based combination therapy toward overcoming drug resistance in cancer. *Biochem Pharmacol.* 2012;83:1104-11.
- Jung SH, Jung SH, Seong H, Cho SH, Jeong K, Shin BC. Polyethylene glycol-complexed cationic liposomes for enhanced cellular uptake and anticancer activity. *Int J Pharm.* 2009;382:254-61.
- La Rocca P, Shai Y, Sansom MSP. Peptide-bilayer interactions: simulations of dermaseptin B, an antimicrobial peptide. *Biophys Chem.* 1999;76:145-59.
- Lasic DD. Liposomes. *Am Sci.* 1992;80:20-30.
- Leite JRSA, Brand GD, Silva LP, Kuckelhaus SAS, Bento WRC, Araújo ALT, Martins GR, Lazzari AM, Bloch Júnior C. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: secondary structure, antimicrobial activity, and mammalian cell toxicity. *Comp Biochem Physiol.* 2008;151:336-43.
- Lira MCB, Siqueira-Moura MP, Rolim-Santos HML, Galetti FCS, Simioni AR, Santos NP, Egito EST, Silva CL, Tedesco AC, Santos-Magalhães NS. In vitro uptake and antimycobacterial activity of liposomal usnic acid formulation. *J Liposome Res.* 2009;19:49-58.
- Liu J, Lin M, Yu J, Liu B, Bao J. Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. *Cancer Lett.* 2011;300:105-14.
- Mady MM, Fathy MM, Youssef T, Khalil WM. Biophysical characterization of gold nanoparticles-loaded liposomes. *Eur J Med Phys.* 2012;4:288-295.
- Meyenburg S, Lilie H, Panzner S, Rudolph R. Fibrin encapsulated liposomes as protein delivery system. Studies on the in vitro release behavior. *J Control Release.* 2000;69:159-68.
- Paolino D, Fresta M, Sinha P, Ferrari M. Drug delivery systems. *Encyclopedia of medical devices and instrumentation.* 2006;2:427-495.
- Park SJ, Choi SG, Davaa E, Park JS. Encapsulation enhancement and stabilization of insulin in cationic liposomes. *Int J Pharm.* 2011;415:267-72.
- Plessis J, Ramachandran C, Weiner N, Muller DG. The influence of lipid composition and lamellarity of liposomes on the physical stability of liposomes upon storage. *Int J Pharm.* 1996;127:273-8.
- Rolim-Santos HML, De Queiroz, FB, Maior RMS, Do Nascimento SC, Santos-Magalhães NS. Cytotoxicity of doxorubicin-loaded Com A-liposomes. *Drug Develop Res.* 2006;67:430-47.
- Rosal R, Brandt-Rauf P, Pincus MR, Wang H, Mao Y, Li Y, Fine R.L. The role of alpha-helical structure in p53 peptides as a determinant for their mechanism of cell death: necrosis versus apoptosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57:653-60.
- Schweizer F. Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. *Eur J Pharmacol.* 2009;625:190-4.
- Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1462:55-70.
- Simons K, Ikonen E. How cells handle cholesterol. *Science.* 2000;290:1721-6.
- Slingerland M, Guchelaar H, Gelderblom H. Liposomal drug formulations in cancer therapy: 15 years along the road. *Drug Discov Today.* 2012;17:160-6.
- Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* 2012;114(8):785-96.
- Teixeira V, Feio MJ, Bastos M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progr Lipid Res.* 2012;51:149-177.
- Thompson AH, Bjourson AJ, Orr, DF, Shaw C, McClean S. A combined mass spectrometric and cDNA sequencing approach to the isolation and characterization of novel antimicrobial peptides from the skin secretions of *Phyllomedusa hypochondrialis azurea*. *Peptides.* 2007;28:1331-43.
- Vanhoye D, Bruston F, Nicolas P, Amiche M. Antimicrobial peptides from hylid and ranin frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain. *Eur J Biochem.* 2003;270:2068-81.
- Van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods in Molecular Biology.* 2011;731:237-245.

Van Slooten ML, Boerman O, Romoren K, Kedar E, Crommelin DJA, Storm G. Liposomes as sustained release system for human interferon- γ : biopharmaceutical aspects. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1530:134-145.

Wang X, Li Y, Yao H, Ju R, Zhang Y, Li R, Yu Y, Zhang L, Lu W. The use of mitochondrial targeting resveratrol liposomes modified with a dequalinium polyethylene glycol-distearoylphosphatidyl ethanolamine conjugate to induce apoptosis in resistant lung cancer cells. *Biomaterials*. 2011;32:5673-87.

Zampa MF, Araújo IMS, Costa V, Costa CHN, Santos Jr JRS, Zucolotto V, Eiras C, Leite JRAL. Leishmanicidal activity and immobilization of dermaseptin 01 antimicrobial peptides in ultrathin films for nanomedicine applications. *Nanomed: Nanotechnol, Biol, Med*. 2009;5:352-8.

Recebido em 28 de janeiro de 2013

Aceito para publicação em 20 de maio de 2013

