

NANOCÁPSULAS DE CETOPROFENO PROMOVEM A REDUÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE LINHAGEM DE GLIOMA C6

**JULIANA HOFSTATTER AZAMBUJA¹; ELITA FERREIRA DA SILVEIRA¹;
FERNANDA CARDOSO TEIXEIRA¹; PRISCILA T. RAMOS¹; CARLUS AUGUSTU
TAVARES DO COUTO¹; ELIZANDRA BRAGANHOL¹**

¹*Centro de Ciências Químicas, Farmacêutica e de Alimentos - CCQFA - UFPEL
julianahazambuja@hotmail.com
elizbraganhol@yahoo.com.br*

1. INTRODUÇÃO

O glioblastoma multiforme constitui a forma mais comum e devastadora de tumor cerebral e representam cerca de 50% de todas as neoplasias do Sistema Nervoso Central, sendo caracterizados também por possuírem ampla heterogeneidade histológica e clínica (HOLLAND, 2001).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) os gliomas são classificados em grau I à IV de acordo com as características de malignidade, sendo os gliomas de grau IV, o glioblastoma multiforme, tumores altamente invasivos, agressivos e neurologicamente destrutivos e considerados os mais comuns, malignos e letais. Sua incidência vem aumentando ao longo dos anos e o prognóstico para os pacientes permanece muito ruim com sobrevida média de 9 a 12 meses, devido a sua rápida progressão e a elevados índices de recorrência.

O tratamento empregado atualmente é à cirurgia, quando possível, seguido de radioterapia e quimioterapia (BUTOWSKI et al., 2006) porém esses tratamentos demonstram eficácia limitada devido a capacidade desses tumores de difundir-se amplamente no parênquima normal circundante o que frequentemente exclui a ressecção cirúrgica completa e a barreira hematoencefalica (BHE) que dificulta uma eficaz entrega de medicamentos para a massa tumoral (HUSE, 2009). Apesar de intensos esforços em desenvolver novas terapias, agentes efetivos ainda não são disponíveis.

Nanocápsulas são sistemas carreadores de fármacos submicroscópicos compostas por polímeros (COUVREUR, 2002). Fármacos carreados por nanopartículas têm mostrado um potencial promissor na área da oncologia (BÉDUNEAU et al, 2007). Sendo promissoras estruturas para o tratamento de gliomas considerando sua capacidade de atravessar barreiras, incluindo a BHE, proporcionando uma liberação dose-controlada e sítio específica, aumentando o efeito terapêutico e diminuindo os efeitos colaterais.

Fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) convencionais são comumente utilizados para tratar a dor e inflamação, eles são inibidores seletivos de duas isoformas da ciclooxigenase (COX): COX-1 e COX-2. (Buttgereit, 2001). A superexpressão da enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2), uma enzima chave na produção de mediadores inflamatórios como as prostaglandinas, está associada com gliomas clinicamente mais agressivos e de pior prognóstico para os pacientes (SHONO et al., 2001).

Foi demonstrado que os AINEs possuem atividade antitumoral frente a diferentes linhagens celulares (SADEGHI-ALIABADI, 2013). Nesse contexto eles podem constituir uma estratégia interessante para a terapia anti-glioma. Assim o cetoprofeno (ácido [2-(3-benzoilfenil) propanóico]) um AINE inibidor da COX, em

formulação de nanocápsulas pode ser uma alternativa promissora para o tratamento dos gliomas.

O objetivo desse trabalho é avaliar o efeito de nanocápsulas de cetoprofeno sobre a proliferação *in vitro* de glioma C6.

2. METODOLOGIA

2.1 Culturas de células

A linhagem de GBM de rato (C6) (ATCC) foi cultivada em DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) mantida a 37°C em atmosfera umidificada e 5% de CO₂.

Para a cultura primária de astrócitos, o córtex de ratos Wistar neonatos (1-2 dias) foi removido e dissociado mecanicamente em CMF pH 7,4. O homogeneizado celular foi centrifugado a 1000 rpm – 10 min e o pellet foi ressuspenso em DMEM/10%SFB pH 7,6. As células foram semeadas em placas de 96 poços (4 x 10⁴ células/poço) contendo poli-L-lisina. Após 4 horas as culturas foram gentilmente lavadas com PBS e o meio foi trocado. As células foram cultivadas durante 15-20 dias com trocas periódicas de meio a cada 4 dias.

2.2 Tratamento

As formulações de nanocápsulas contendo cetoprofeno foram preparadas em parceria com a UFSM. Cultura de astrócitos de ratos ou células de glioma de rato C6 foram semeadas em placas de 96 poços e tratadas por 48 ou 72 h com solução de cetoprofeno livre (CL) ou em formulação de nanocápsulas (Ceto-CN) nas concentrações de 1, 10, 50 e 100 µM. Células tratadas com DMSO ou nanocápsulas sem o fármaco (NC-Branca) foram utilizadas como controle.

2.3 Viabilidade celular

A viabilidade das células C6 e da cultura primária de astrócitos foi determinada por determinação da redução de MTT solúvel [3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-Diphenyltetrazolium brometo] para formazano insolúvel em água. Após o tratamento, as células foram lavadas gentilmente com PBS e 50 µL de MTT a uma concentração final de 0.5 mg/mL foi adicionado por poço. Por fim, as células foram incubadas durante 60 minutos a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. O precipitado formado foi eluído com 50 µL de DMSO e a absorbância foi determinada em um leitor de microplacas (492 nm).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Enquanto que o tratamento com cetoprofeno na forma livre não promoveu alteração na proliferação celular, esse fármaco na forma nanoencapsulada reduziu entre 40 e 50% a viabilidade dos gliomas nas doses de 1 a 100 µM quando comparados com a NC-Branca. Além disso, as formulações de cetoprofeno não promoveram citotoxicidade das culturas de astrócitos, indicando uma seletividade de efeito.

Tabela 1. Análise do efeito do cetoprofeno na forma livre ou em nanocápsulas sobre a viabilidade celular de cultura de linhagem de glioma C6.

Média	Controle	CL-1µM	CL- 10 µM	CL-50 µM	CL-100 µM	NC	CN-1µM	CN-10µM	CN-50 µM	CN-100 µM
C6-48h	0,437	0,402	0,449	0,416	0,435	0,462	0,376	0,278*	0,266*	0,225**
Abs%	100	91,9	102,8	95,2	99,6	105,6	86,1	63,7*	60,9*	51,4*
C6-72h	0,540	0,538	0,529	0,536	0,581	0,460	0,272*	0,232*	0,217*	0,236*
Abs%	100	99,7	98,0	99,3	107,6	85,3	50,5*	42,9*	40,1*	43,6*

Os dados foram expressos como médias e foram analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey. *diferença significativa quando comparado ao controle para um $P \leq 0,01$. Controle (DMEM/5%SFB), CL (cetoprofeno-livre), NC (controle nanocápsula branca), CN (cetoprofeno em nanocápsulas).

Tabela 2. Análise do efeito do cetoprofeno na forma livre ou em nanocápsulas sobre a viabilidade celular de cultura primária de astrócitos de ratos.

Média	Controle	CL-1µM	CL- 10 µM	CL-50 µM	CL-100 µM	NC	CN-1µM	CN-10µM	CN-50 µM	CN-100 µM
As-48h	0,543	0,532	0,538	0,395	0,585	0,458	0,540	0,404	0,378	0,448
Abs%	100	98,0	99,2	72,7	107,8	84,3	99,4	74,5	69,6	82,5
As-72h	0,482	0,528	0,622	0,589	0,456	0,557	0,631	0,563	0,454	0,504
Abs%	100	109,4	128,9	122,1	94,2	115,3	130,8	116,7	94,0	104,4

Os dados foram expressos como médias e foram analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey. Controle (DMEM/5%SFB), CL (cetoprofeno-livre), NC (controle nanocápsula branca), CN (cetoprofeno em nanocápsulas).

4. CONCLUSÕES

Esses dados indicam que a utilização de fármacos na forma nanoencapsulada constitui uma alternativa promissora para o tratamento de tumores cerebrais, além de ampliar o leque de aplicações para fármacos já utilizados na terapêutica, como o cetoprofeno.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HOLLAND, E.C. Progenitor cells and glioma formation. **Curr Opin Neurol**, v.14, n6, p.683-8. 2001.

BUTOWSKI N.A.; SNEED P.K.; CHANG S.M. Diagnosis and treatment of recurrent highgrade astrocytoma. **Journal of Clinical Oncology**, p.24, n.8, p. 1273-1280. 2006.

HUSE, T.J.; HOLLAND, E.C. Genetically Engineered Mouse Models of Brain Cancer and the Promise of Preclinical Testing. **Brain Pathol**, v.19, n.1, p. 132-143. 2009.

COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst**, v.19, n.2, p.99-134. 2002.

BÉDUNEAU, A.; SAULNIER, P.; BENOIT J.P. Active targeting of brain tumors using nanocarriers. **Biomaterials**, v.28, n.33, p.4946-67. 2007.

SHONO, T.; TOFILON, J.; BRUNER, M.; OWOLABI, O.; LANG, F. Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. **Cancer Res**, v. 61, p. 4375- 4381, 2001.

Buttgereit, F.; Burmester, G.R.; Simon, L.S. Gastrointestinal toxic side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2-specific inhibitors. **Am J Med**, 2001.

SADEGHI-ALIABADI, H.; ALIASGHARLUO, M.; FATTAHI A.; MIRIAN, M. GHANNADIAN, M. In vitro cytotoxic evaluation of some synthesized COX-2 inhibitor derivatives against a panel of human cancer cell lines. *Res Pharm Sci*. v.4, p.298-303. 2013.