

CETOPROFENO EM FORMULAÇÃO DE NANOCÁPSULAS REDUZ A PROLIFERAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME

**ELITA FERREIRA DA SILVEIRA¹; JULIANA HOFSTATTER AZAMBUJA¹;
FERNANDA CARDOSO TEIXEIRA¹; ANA PAULA HORN²; LETÍCIA CRUZ³;
ELIZANDRA BRAGANHOL⁴**

¹Centro de Ciências Químicas, Farmacêutica e de Alimentos-CCQFA- UFPEL
elitafs24@gmail.com

²Departamento de Morfologia-Instituto de Ciências Biológicas-FURG

³Departamento de Farmácia Industrial-UFSM

⁴Centro de Ciências Químicas, Farmacêutica e de Alimentos-CCQFA UFPEL
elizbraganhol@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Gliomas constituem os tumores cerebrais sólidos mais comuns em adultos (MAHER e RAFELL, 2004) e representam cerca de 50% de todas as neoplasias do Sistema Nervoso Central (PREUSSER et al., 2006; YIN et al., 2007; DUNN et al., 2007), sendo caracterizados também por possuírem ampla heterogeneidade histológica e clínica. Sua incidência vem aumentando e o tratamento empregado atualmente é à cirurgia, quando possível, seguido de radio- e/ou quimioterapia (BUTOWSKI et al., 2006) sendo que a sobrevivência média após o diagnóstico é de até cinco anos, porém, pacientes diagnosticados com glioma de alto grau (glioblastoma multiforme) sucumbem à doença em apenas 6-12 meses (HUNCHAREK e MUSCAT, 1998).

O Glioblastoma Multiforme (GBMs) é caracterizado histologicamente pela presença de células neoplásicas pouco diferenciadas com áreas de proliferação vascular e/ou necrose (SATHORNUSUMETEE et al., 2008), possuem descontrole da proliferação celular, infiltração difusa no parênquima cerebral, angiogênese, intensa resistência a apoptose e elevada instabilidade genômica (LAWS e SHAFFREY, 1999). Os GBMs são quase sempre infiltrativos o que frequentemente exclui a possibilidade de ressecção cirúrgica completa e a barreira hematoencefálica (BHE) dificulta a entrega de medicamentos para a massa tumoral (HUSE, 2009).

Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) convencionais são comumente utilizados para tratar a dor e a inflamação, sendo inibidores de duas isoformas da ciclooxigenase (COX): COX-1 e COX-2 (Buttgereit, 2001). A superexpressão da 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]; (Figura 1) um AINE inibidor da COX, em formulação de nanocápsulas pode ser uma alternativa promissora para o tratamento dos gliomas. Portanto, o objetivo desse trabalho é avaliar o efeito de nanocápsulas de cetoprofeno sobre a proliferação *in vitro* e em modelo pré-clínico em gliomas.

2. METODOLOGIA

Preparação das nanocápsulas: As suspensões de nanocápsulas de cetoprofeno foram sintetizadas no laboratório de Nanofármacos no departamento de Farmácia Industrial da Universidade Federal de Santa Maria. As moléculas foram

preparadas por deposição interfacial do polímero pré-formado. Na sequência o perfil de libertação de cetoprofeno foi obtido pela técnica de difusão de diálise (dados não mostrados) e para comparação, as formulações sem o fármaco (nanocápsulas branca), também foram preparadas.

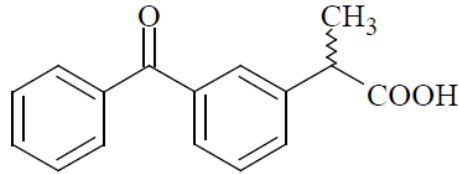


Figura 1. Estrutura química do cetoprofeno (ácido [2-(3-benzoilfenil) propanóico]). (Fonte: Farmacopéia Brasileira, 2010).

Cultivo celular e tratamento: A linhagem de glioma de rato C6 foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC) e cultivada em DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e mantida a 37°C em atmosfera umidificada e 5% de CO₂. Para a cultura primária de astrócitos, o córtex de ratos neonatos Wistar com idade entre 1 ou 2 dias foram removidos e dissociados segundo protocolo específico e cultivadas durante 15-20 dias com trocas de meio ocorrendo entre 4 dias. As placas de 96 poços foram tratadas com formulações de cetoprofeno na forma livre ou em nanocápsulas em concentrações de 1, 10, 50 e 100 µM. Células tratadas com nanocápsulas branca ou DMEM/5% SFB foram utilizadas como controle. Após 48 e 72 h de tratamento, a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT, o qual avalia a funcionalidade mitocondrial. Foram realizados no mínimo 3 experimentos independentes e os dados foram analisados por ANOVA seguido por post-hoc de Tukey.

Modelo Pré-clínico de glioma: células de glioma C6 foram implantadas em cérebro de ratos Wistar por meio de cirurgia estereotáxica. Cinco dias após o implante, os animais foram divididos em quatro grupos (1) Controle (DMSO - controle veiculo); (2) NC (nanocápsula branca); (3) Ceto-Livre (3 mg/Kg/dia com cetoprofeno dissolvido em DMSO); (4) Ceto-NC (3 mg/Kg/dia com cetoprofeno em nanoencápsulas) e tratados durante 15 dias. Ao final do tratamento, os animais foram eutanaziados e os tumores implantados foram analisados por coloração histológica HE. Os dados foram analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Enquanto que o tratamento com cetoprofeno na forma livre (CL) não promoveu alteração na proliferação celular de glioma C6 em cultura (modelo *in vitro*), esse fármaco na forma nanoencapsulada (CN) reduziu em torno de 40 a 50% a viabilidade das células nas doses de 50 e 100 µM, respectivamente, em ambos os tempos (48 e 72 h) quando comparados com o controle (NC) (Tabela 1). Além disso, as formulações de cetoprofeno não promoveram citotoxicidade nas culturas de astrócitos, células análogas normais, indicando uma seletividade de efeito (Tabela 2).

No modelo pré-clínico de glioma, o tratamento com Ceto-NC reduziu em torno de 60% o volume dos tumores implantados o qual foi acompanhado de diminuição das características de malignidade, incluindo redução da presença de edema, proliferação vascular e hemorragia intratumoral (Tabela 3).

Tabela 1. Análise da viabilidade celular de cultura de gliomas tratadas com cetoprofeno.

Grupos	Controle	CL 1 µM	CL 10 µM	CL 50 µM	CL 100 µM	NC	CN 1 µM	CN 10 µM	CN 50 µM	CN 100 µM
C6-48 h	0,437	0,402	0,449	0,416	0,435	0,462	0,376	0,278*	0,266*	0,225*
C6-72 h	0,540	0,538	0,529	0,536	0,581	0,460	0,272	0,232*	0,217*	0,236*

Células de glioma C6 foram tratadas com 1, 10, 50 e 100 µM de cetoprofeno na forma livre ou em formulação de nanocápsulas e a viabilidade celular foi avaliada pelo teste do MTT. Os dados foram expressos como média da absorbância e foram analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey. *diferença significativa quando comparado ao controle para um $P \leq 0,01$. CL (cetoprofeno na forma livre); NC (nanocápsula-branca); CN (cetoprofeno em nanocápsulas).

Tabela 2. Análise da viabilidade celular de cultura primária de gliomas tratadas com cetoprofeno.

Grupos	Controle	CL 1 µM	CL 10 µM	CL 50 µM	CL 100 µM	NC	CN 1 µM	CN 10 µM	CN 50 µM	CN 100 µM
Ast-48h	0,543	0,532	0,538	0,395	0,585	0,458	0,540	0,404	0,378	0,448
Ast-72h	0,482	0,528	0,622	0,589	0,456	0,557	0,631	0,563	0,454	0,504

Culturas primárias de astrócitos foram tratadas com 1, 10, 50 e 100 µM de cetoprofeno na forma livre ou em formulação de nanocápsulas e a viabilidade celular foi avaliada pelo teste do MTT. Os dados foram expressos como média da absorbância e foram analisados por ANOVA seguido de post-hoc de Tukey. CL (cetoprofeno na forma livre); NC (nanocápsula-branca); CN (cetoprofeno em nanocápsulas).

Tabela 3. Características histológicas dos gliomas implantados.

	Controle (n=5)	NC (n=5)	Ceto-Livre (n=5)	Ceto-NC (n=4)
Necrose coagulativa	4/5	3/5	3/5	1/4
Hemorragia Intratumoral	3/5	3/5	2/5	0/4
Infiltração Linfocitária	5/5	4/5	3/5	1/4
Edema Peritumoral	5/5	4/5	4/5	1/4
Proliferação Vascular	5/5	5/5	3/5	0/4

As variáveis histológicas (necrose coagulativa, hemorragia intratumoral, infiltração linfocitária, edema peritumoral e proliferação vascular) foram avaliadas quanto à presença ou ausência.

4. CONCLUSÕES

A principal inovação desse trabalho é a utilização de fármacos na forma nanoencapsulada, o qual 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.

Considerando que o glioblastoma multiforme é um tumor letal e que não apresenta um tratamento efetivo, o efeito antitumoral apresentado pode representar uma nova alternativa terapêutica para os pacientes, podendo ser utilizada isoladamente ou em combinação com a quimioterapia padrão.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUTOWSKI NA, SNEED PK, CHANG SM . Diagnosis and treatment of recurrent high-grade astrocytoma. **J Clin Oncol**, Boston, 24 (8): 1273-1280,2006.
- 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.
- DUNN, G. P.; DUNN, I. F.; CURRY, W. T. Focus on TILs; Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human glioma. **Cancer Immunity**, 7, New York, 12-28, 2007.
- Huncharek M, Muscat J. Treatment of recurrent high grade astrocytoma; results of a systematic review of 1,415 patients. **Anticancer Res**.18 (2B): 1303-1311, 1998.
- 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.
- LAWS ER JR, SHAFFREY ME. The inherent invasiveness of cerebral gliomas: implications for clinical management. **Int J Dev Neurosci**. Galveston, 17: 413-420,1999.
- MAHER,CO AND RAFFEL, C. Neurosurgical treatment of brain tumors in children. **Pediatr Clin North Am.**, New York, 51 (2): 327-357,2004.
- PREUSSER M., HABERLER C., HAINFELLNER J.A., WIEN. Med. Wochenschr. 156 Malignant glioma: neuropathology and neurobiology. **Wien Med Wochenschr.**, Berlim, 156 332-337,2006.
- 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 humancancer cell lines. **Res Pharm Sci**. v.4, p.298-303. 2013.
- 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.
- YIN, L. T.; FU, Y. J.; XU, Q. L.; YANG. J.; LIU, Z. L.; LIANG, A. H.; FAN, X. J.;et al. Potential biochemical therapy of glioma cancer. **Biochem. Bioph. Res. Co.**, 362, Stony Brook, 225-229,2007.