

NANOCÁPSULAS DE DISSELENETO DE DIFENILA MODIFICADAS COM POLIETILENOGLICOL: DESENVOLVIMENTO, TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL IN VITRO

Jéssica Brandão Reolon ¹

Luana Mota Ferreira ²

Marcel Henrique Marcondes Sari ³

Juliana Hofstatter Azambuja ⁴

Elizandra Braganhol ⁵

Letícia Cruz ⁶

Resumo:

O glioma é um tipo de neoplasia que acomete o sistema nervoso central (SNC), correspondendo à maior parte dos casos de neoplasias cerebrais malignas em adultos. As terapias convencionais apresentam na maioria dos casos uma baixa eficácia e elevada toxicidade. Sendo assim, o dissenleto de difenila (PhSe)₂, um composto orgânico de selênio, vem sendo estudado por suas promissoras atividades farmacológicas, incluindo antitumoral. Porém, este composto apresenta elevada lipofilia e efeitos tóxicos, o que dificulta seu uso clínico. Nesse sentido, as nanocápsulas poliméricas (NCs) tornam-se uma alternativa interessante para contornar as limitações do (PhSe)₂, aprimorando suas características físico-químicas e reduzindo efeitos indesejáveis. Diante disso, este estudo teve como objetivo o desenvolvimento de NCs contendo (PhSe)₂ previamente desenvolvidas com superfície modificada com polietilenoglicol 6000, avaliando-se a viabilidade de administração por via intravenosa, bem como a atividade antitumoral in vitro contra linhagens de células de glioma. As NCs foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado e caracterizadas em relação ao tamanho médio de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, teor do composto e eficiência de encapsulamento. A fim de se observar a hemocompatibilidade das NCs e (PhSe)₂ livre, o teste de hemólise foi realizado. Avaliou-se também a viabilidade celular e atividade antitumoral frente a linhagens celulares de astrócitos e glioma maligno (C6), utilizando método do MTT, testando-se (PhSe)₂ livre e nanoencapsulado, em diferentes concentrações. As NCs apresentaram-se macroscopicamente homogêneas, com coloração amarela e aspecto leitoso. O pH das suspensões mostrou-se levemente ácido, sendo compatível com os materiais empregos no preparo. A análise granulométrica mostrou partículas em escala nanométrica e faixa de distribuição de tamanho estreita. O potencial zeta mostrou valores negativos, característico do PCL e polissorbato 80 empregados no preparo. O teor de fármaco foi próximo do teórico, com eficiência de encapsulamento próxima a 100%. O teste de hemólise não indicou efeito hemolítico para (PhSe)₂, livre ou nanoencapsulado, demonstrando ser compatível com as células sanguíneas. A avaliação da viabilidade celular e efeito antitumoral in vitro demonstrou que o (PhSe)₂, livre ou nanoencapsulado, apresentou efeito citotóxico contra células C6, sem prejuízo de células saudáveis. Desta forma, as NCs desenvolvidas foram desenvolvidas e caracterizadas com sucesso, demonstrando serem sistemas compatíveis com uma via de administração intravenosa. Além disso, estes sistemas mostraram efeito citotóxico seletivo frente a células C6, servindo como base para novos estudos visando seu emprego na terapêutica do glioma.

Palavras-chave: selênio, nanopartículas, câncer, toxicidade, antitumoral.

**NANOCÁPSULAS DE DISSELENETO DE DIFENILA MODIFICADAS COM POLIETILENOGLICOL:
DESENVOLVIMENTO, TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL IN VITRO**

¹ Aluno de pós-graduação. jessica_breolon@yahoo.com.br. Autor principal

² Outro. luanamotaferreira@gmail.com. Co-autor

³ Outro. marcondes.sari@gmail.com. Co-autor

⁴ Aluno de pós-graduação. jumattiazzi@gmail.com. Co-autor

⁵ Docente. elizbraganhol@yahoo.com.br. Co-autor

⁶ Docente. leli.cs@gmail.com. Orientador

NANOCÁPSULAS DE DISSELENETO DE DIFENILA MODIFICADAS COM POLIETILENOGLICOL: DESENVOLVIMENTO, TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO*

1 INTRODUÇÃO

O glioma é um tipo de câncer que acomete o sistema nervoso central (SNC), correspondendo à maior parte dos casos de neoplasias cerebrais malignas em adultos. Este tipo de neoplasia apresenta alta taxa de proliferação e padrão de crescimento infiltrativo, impedindo a neurocirurgia curativa. Além disso, os fármacos convencionais apresentam baixa efetividade no tratamento devido à dificuldade de ultrapassar a barreira sangue-cérebro, limitando a chegada ao SNC. Tais limitações justificam a busca por terapias alternativas que visem o tratamento efetivo do glioma (LOUIS et al., 2016).

O disseleneto de difenila (PhSe)₂ é um composto orgânico de selênio que apresenta diversas atividades biológicas já relatadas, como anti-inflamatória, antioxidante e, de especial importância, antitumoral, entre outras (NOGUEIRA e ROCHA, 2010). Porém, algumas limitações relacionadas com suas características físico-químicas (alta lipofilicidade) (PRIGOL, et al. 2013) e também alguns efeitos tóxicos associados ao composto (BARBOSA et al., 2018), comprometem estudos mais aprofundados assim como a evolução destes para a etapa clínica.

Diante das potencialidades do (PhSe)₂, as nanocápsulas poliméricas (NCs) podem ser uma alternativa promissora para contornar as limitações de solubilidade e toxicidade do composto (FRANK et al., 2015). As NCs são suspensões coloidais constituídas por um núcleo oleoso envolto por uma parede polimérica que apresentam vantagens como carreadores de fármacos, sendo capazes de protegê-los e aumentar a solubilidade aquosa aparente de substâncias hidrofóbicas. Além disso, é possível a modulação das propriedades de superfície das NCs, possibilitando que as partículas escapem da captação pelo sistema retículo-endotelial, permanecendo por mais tempo em circulação no organismo.

Apesar da escassez, estudos que avaliam a associação entre nanotecnologia e compostos orgânicos de selênio já vem sendo conduzidos e resultados promissores têm sido obtidos pela associação de ambos (GIORDANI et al., 2014). Recentemente, nosso grupo de pesquisa propôs a incorporação do (PhSe)₂ à uma suspensão de NCs utilizando poli(ε-caprolactona) como polímero e triglicerídeos de cadeia média como núcleo oleoso (FERREIRA et al., 2018). A formulação apresentou características compatíveis com sistemas nanoestruturados carreadores de fármacos, adequada estabilidade química e aprimorou o efeito citotóxico contra células de melanoma humano. Em vista disso, o presente trabalho objetivou o desenvolvimento de suspensões de NCs contendo (PhSe)₂ funcionalizadas com polietilenoglicol 6000, bem como estudar o potencial antitumoral *in vitro* destas contra o glioma e avaliar a toxicidade das formulações em linhagens celulares.

2 METODOLOGIA

As NCs foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, utilizando como material polimérico poli- ε-caprolactona (PCL) e triglicerídeos de cadeia média (TCM) como núcleo oleoso (FERREIRA et al., 2018). Para fins de modificação de superfície, utilizou-se polietilenoglicol 6000 (PEG) no preparo das formulações.

Depois de obtida, as NCs foram caracterizadas quanto ao pH por potenciometria, avaliação do diâmetro e índice de polidispersão utilizando espectroscopia de correlação de

fótons e determinação do potencial zeta por microeletroforese (Zetasizer Nanoseries). O teor total de $(\text{PhSe})_2$ nas formulações, bem como a porção nanoencapsulada foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sob condições previamente validadas.

As NCs desenvolvidas foram submetidas ao teste de hemólise *in vitro*, no qual uma suspensão de eritrócitos de camunongos (número do protocolo do aceite do comitê de ética-UFPEL 23110009402/2016-01), preparada conforme Ferreira e colaboradores (2015), foi incubada com diferentes concentrações de $(\text{PhSe})_2$ livre e nanoencapsulado (10-100 μM) durante 1 hora a 37° C. As mesmas diluições foram realizadas para uma formulação placebo (NC-B-PEG), assim como para alguns constituintes da formulação, de forma isolada. Após a incubação, os tubos foram centrifugados e a hemoglobina liberada foi quantificada por espectrofotometria (540 nm).

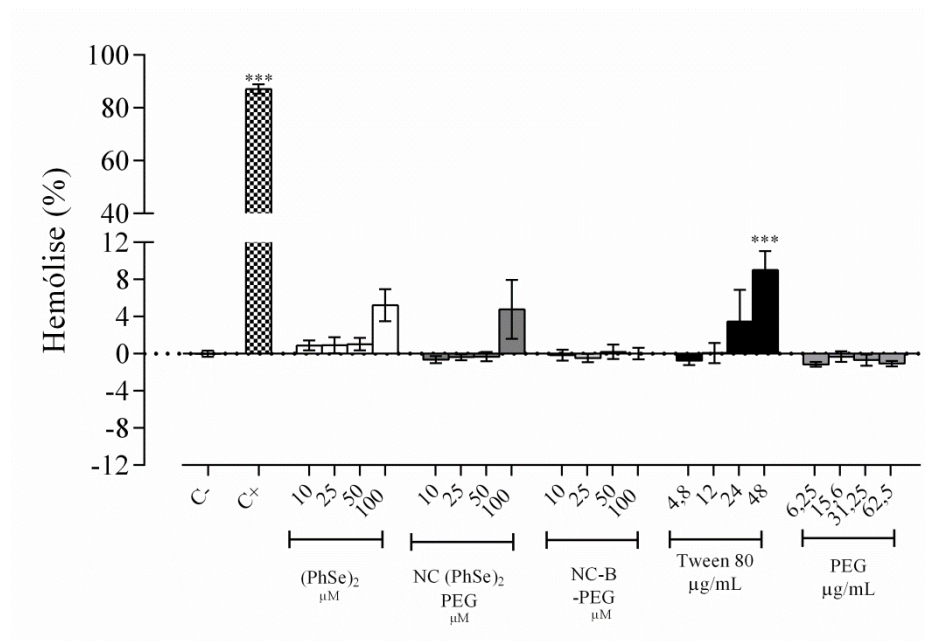
O estudo de viabilidade celular e atividade antitumoral *in vitro* foi realizado em linhagem de células de glioma de ratos (C6) e astrócitos de ratos. As linhagens celulares foram previamente cultivadas e incubadas com diferentes concentrações de $(\text{PhSe})_2$, livre e nanoencapsulado, e NC-B-PEG (10-100 μM) por 48 horas a 37° C. Após o tratamento, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a preparação, as NCs apresentaram-se macroscopicamente homogêneas, com aspecto leitoso e coloração amarela característica do $(\text{PhSe})_2$. O pH das formulações foi de $6,5 \pm 0,7$ sendo compatível com os materiais empregados no preparo. As análises de tamanho mostraram partículas com dimensões nanométricas (293 ± 42 nm) e um índice de polidispersão inferior a 0,25, indicando uma distribuição granulométrica estreita. O potencial zeta apresentou valores negativos ($-9,74 \pm 3,80$ mV), característico de NCs desenvolvidas com PCL e polissorbato 80. O teor de ativo foi próximo ao teórico (5 mg/mL) e a eficiência de encapsulamento próxima a 100%.

A figura 1 demonstra os resultados do teste de hemólise onde é possível observar que o $(\text{PhSe})_2$, livre ou nanoencapsulado, não demonstrou atividade hemolítica em nenhuma das concentrações testadas, assim como as formulação placebo, indicando uma compatibilidade do composto e dos nanossistemas com as células sanguíneas.

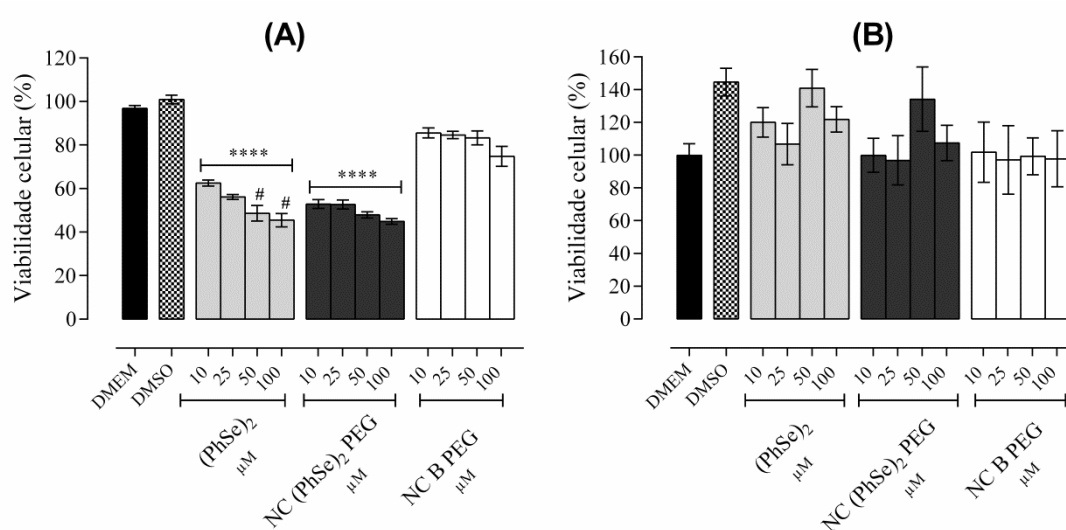
Figura 1 – Resultado obtido para o teste de hemólise *in vitro*.



Fonte: do autor, 2018.

A avaliação da viabilidade celular e atividade antitumoral *in vitro* demonstrou que (PhSe)₂, tanto na sua forma livre quanto nanoencapsulada, foi capaz de reduzir a viabilidade de células C6 nas diferentes concentrações testadas. Diferente disso, a viabilidade celular foi mantida em linhagem de astrócitos, indicando um efeito citotóxico seletivo sobre células tumorais sem prejuízo de células saudáveis (figura 2).

Figura 2 – Viabilidade celular de células de glioma (C6) (A) e astrócitos (B) tratados com (PhSe)₂ livre, nanoencapsulado e nanocápsulas placebo.



Fonte: o autor, 2018.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As NCs contendo (PhSe)₂ foram desenvolvidas e caracterizadas com sucesso. Estes sistemas demonstraram um efeito antitumoral *in vitro* frente a células C6, levando a redução da viabilidade celular, sem prejuízo para células saudáveis. A formulação desenvolvida mostrou ser compatível com células sanguíneas, podendo vir a configurar um tratamento por via intravenosa na terapia do glioma, sendo que futuros ensaios *in vivo* poderão confirmar esta hipótese.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, N. B. V., et al. Effect of organic forms of selenium on delta-aminolevulinate dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 149(2): 243-253, 1998.
- FERREIRA, L. M., et al. Pentamidine-Loaded Poly(epsilon-Caprolactone) Nanoparticles Show Low Acute Lung Toxicity In Vivo. **Latin American Journal of Pharmacy**, 34(5): 1039-1042, 2015.
- FERREIRA, L. M., et al. Diphenyl diselenide loaded poly(ε-caprolactone) nanocapsules with selective antimelanoma activity: Development and cytotoxic evaluation. **Materials Science & Engineering C**, 91, 1-9, 2018.
- FRANK, L. A., et al. Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. **WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology**, 7(5), 623-639, 2015.
- GIORDANI, C. F. A., et al. Diphenyl Diselenide-Loaded Nanocapsules: Preparation and Biological Distribution. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 172(2): 755-766, 2014.
- LOUIS, D. N., et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, 131(6): 803-820, 2016.
- NOGUEIRA, C. W. AND J. B. T. ROCHA. Diphenyl Diselenide a Janus-Faced Molecule. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 21(11): 2055-2071, 2010.
- PRIGOL, M., et al. Physicochemical and Biochemical Profiling of Diphenyl Diselenide. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 169(3): 885-893, 2013.