

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE FARMÁCIA

MARIANA ARRAES SALOMÃO

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E INTERNALIZAÇÃO CELULAR *IN VITRO*  
DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO MELATONINA EM  
CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME U87MG**

GOIÂNIA - GO  
2020

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR  
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE  
GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC nº 1204/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo dos Trabalhos de Conclusão dos Cursos de Graduação disponibilizado no RI/UFG é de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o(s) autor(a)(es)(as) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

**1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG):**

Nome(s) completo(s) do(a)(s) autor(a)(es)(as): Mariana Arraes Salomão

Título do trabalho: Avaliação da citotoxicidade e internalização celular *in vitro* de nanopartículas poliméricas contendo melatonina em células de glioblastoma multiforme U87MG

**2. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM  NÃO<sup>1</sup>

Independente da concordância com a disponibilização eletrônica, é imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF do TCCG.

Mariana Arraes Salomão

Assinatura(s) do(a)(s) autor(a)(es)(as)

Ciente e de acordo:

Edilson Ribeiro de O. Jr.

Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 06 / 01 / 2021

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(à)(s) autor(a)(es)(as) e ao(à) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo do TCCG. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro.

<sup>2</sup> As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento. Imagens coladas não serão aceitas.

MARIANA ARRAES SALOMÃO

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E INTERNALIZAÇÃO CELULAR *IN VITRO*  
DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO MELATONINA EM  
CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME U87MG**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Coordenação do Curso de  
Farmácia da Universidade Federal de Goiás,  
como requisito parcial à obtenção do título de  
Bacharel em Farmácia.

Orientador: Ms. Edilson R. de Oliveira Júnior

GOIÂNIA-GO

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Salomão, Mariana Arraes

Avaliação da citotoxicidade e internalização celular in vitro de nanopartículas poliméricas contendo melatonina em células de glioblastoma multiforme U87MG [manuscrito] / Mariana Arraes Salomão. - 2020.

30 f.: il.

Orientador: Prof. Edilson Ribeiro de Oliveira Júnior.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Farmácia, Goiânia, 2020.

Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, lista de figuras.

1. Citometria de fluxo. 2. Microscopia de fluorescência. 3. MTT. 4. Tumor cerebral. I. Oliveira Júnior, Edilson Ribeiro de , orient. II. Título.

CDU 615.1

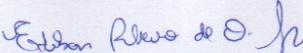
Mariana Arraes Salomão

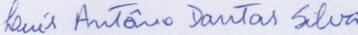
Avaliação da citotoxicidade e internalização celular *in vitro* de nanopartículas poliméricas contendo melatonina em células de glioblastoma multiforme U87MG

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para a obtenção de grau de Bacharel em Farmácia à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás

Data da aprovação: 09/12/2020

Membros da Banca:

  
Edilson Ribeiro de Oliveira Júnior  
Orientador  
Mestre  
Universidade Federal de Goiás

  
Luís Antônio Dantas Silva  
Prof. Doutor  
Universidade Federal de Goiás

  
Artur Christian Garcia da Silva  
Mestre  
Universidade Federal de Goiás

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente à Deus, por ter me conduzido até aqui. Foram cinco anos de trabalho árduo, de aprendizado e muito amadurecimento. Confesso que em vários momentos me questioneei se estava seguindo o caminho certo, reconheço minhas fragilidades. Ser frágil é permitir me quebrar, e como a arte oriental me reconstruir, me tornar mais valiosa.*

*Mas para que esse processo se tornasse viável, contei com peças fundamentais: meus pais Moacyr Augusto da Silva Salomão e Geovana Miranda Arraes, meus irmãos Camila Arraes Salomão e Augusto Salomão e minha madrastra Valéria Pinto de Carvalho, obrigada pelo amor incondicional, pelo apoio e suporte para que eu siga meus sonhos. Sem vocês nada disso seria possível.*

*Aos meus amigos e ao meu namorado Hiago Ferreira, pelo carinho, pela paciência e por sempre torcerem por mim. Lara, Laís, Vitória, Ana Clara Batista, Amanda, Luísa e Thalita, crescer ao lado de vocês foi um privilégio, vocês são especiais. Ana Clara Stival, Marcos Antônio, Danielly, Mandy, Bárbara, Izabella, Victória e Hugo, durante esses anos de graduação vocês tornaram os meus dias mais alegres e a jornada mais leve!*

*Aos queridos amigos do ToxIn, Artur, Thaís Rosa, Lara, Ana, Tatyane e professora Marize, pelo carinho, pelos ensinamentos e pelo suporte. Os cafés e bolos com vocês são sempre especiais e cheios de alegria!*

*Ao grupo querido do FarmaTec, por todo o carinho que me receberam. Agradeço especialmente à Marcilia Pavam que me acolheu e me mostrou a beleza do mundo da pesquisa. Aos queridos amigos: Tácio, Kamilla, Emílio, Lilian, Luís Antônio (Zé) e professora Danielle. Os ensinamentos de vocês me acompanham diariamente e fazem parte de quem sou hoje.*

*À Fernanda Bellato, por me acolher como parte do grupo antes mesmo de ser. Os cafés e almoços são momentos únicos e mais alegres com você.*

*À professora Eliana Martins, agradeço pela oportunidade de fazer parte de um grupo de pesquisa incrível e único. Muito obrigada por acreditar no meu trabalho e dedicação. Tenho uma profunda admiração pela senhora.*

*Ao Edilson Ribeiro, por ter acreditado em mim e por ter enxergado um potencial que pra mim era desconhecido. Sou muito grata por todo o carinho, pelo cuidado e tempo disposto a mim.*

*Para muitos o trabalho de conclusão de curso é o fechar das portas, a finalização de um ciclo. Para mim, graças a vocês, ele é uma faixa de boas vindas para o mercado, boas vindas para a vida.*

## RESUMO

O glioblastoma multiforme é um tumor cerebral primário, agressivo, de mau prognóstico, responsável por cerca de 4% das mortes relacionadas ao câncer. Atualmente, o tratamento consiste na remoção cirúrgica do tumor, seguida de radioterapia e quimioterapia. Diversos estudos na literatura têm demonstrado a atividade antitumoral da melatonina para o tratamento do glioblastoma. Além disso, o uso de nanopartículas, como carreadores de fármacos, pode ser uma estratégia promissora capaz de aumentar o direcionamento de fármacos para o sistema nervoso central. Este estudo teve como objetivo avaliar a citotoxicidade e a internalização celular *in vitro* de nanopartículas poliméricas contendo melatonina em células de glioblastoma multiforme U87MG. A citotoxicidade da formulação foi avaliada pelo ensaio de MTT. A avaliação da internalização celular foi observada qualitativamente por microscopia de fluorescência e quantitativamente por citometria de fluxo. Os resultados demonstraram que a MLT apresenta atividade citotóxica seletiva para células U87MG, quando encapsulada nas nanopartículas poliméricas, o que pode ser justificado pela facilitada internalização celular das nanopartículas e pela liberação de MLT ao longo do tempo. Portanto, concluiu-se que a nanoencapsulação foi crucial para a atividade citotóxica seletiva da MLT na U87MG, sendo assim uma estratégia promissora para o tratamento de GBM.

Palavras-chave: citometria de fluxo; microscopia de fluorescência; MTT; tumor cerebral.

## ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is a malignant primary brain tumor, with bad prognosis profile. Moreover, GBM is responsible for about 4% of cancer-related deaths. Currently, the treatment of GBM consists on surgical removal of the tumor followed by radiotherapy and chemotherapy. It has been reported in the literature the antitumor activity of melatonin (MLT) for the treatment of GBM. In addition, the use of nanoparticles, as drug carries, have improved the targeting of drugs to the central nervous system. This study aimed to evaluate the *in vitro* cytotoxicity and cellular uptake of melatonin-loaded polymeric nanoparticles in human GBM cell line (U87MG). The cytotoxicity of formulation was evaluated by the MTT assay. The cellular uptake of nanoparticles was observed by fluorescence microscopy and flow cytometry. The results noticed that MLT demonstrated a selective cytotoxic activity against U87MG cells when encapsulated in the particles. These results may be justified by the facilitated cellular internalization of the nanoparticles and the release of MLT over time. In conclusion, the nanoencapsulation was crucial for the selective cytotoxic activity of MLT in U87MG, representing a promising strategy for the treatment of GBM.

Keywords: brain tumor; flow cytometry; fluorescence microscopy; MTT assay.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Representação da estrutura química planar da melatonina.....	16
<b>Figura 2.</b> Citotoxicidade da MLT livre, Branco-NP e MLT-NP em células U87MG e MRC-5 avaliada pelo ensaio de MTT após incubação por 48 h. Os dados estão representados pela média $\pm$ SD (n=3). a) $p < 0.005$ vs U87MG MLT-NP; b) $p < 0.05$ vs MRC-5 MLT-NP; c) $p < 0.05$ vs U87MG Branco-NP vs MRC-5 Branco-NP; d) $p < 0.05$ U87MG MLT-NP vs MRC-5 MLT-NP .....	22
<b>Figura 3.</b> Internalização de Cou6-NP em células U87MG e MRC-5 observada em microscópio de fluorescência após 1h de incubação a 37 °C. Os núcleos celulares foram marcados com Hoechst (azul). A fluorescência verde indica a presença de Cou6-NP no citoplasma celular .....	23
<b>Figura 4.</b> Internalização celular de Cou6-NP em células U87MG pelo tempo de incubação. Os dados estão representados pela média $\pm$ SD. * $p < 0,05$ vs 15 e 30 min .....	23

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**BHE** – Barreira hematoencefálica

**Branco-NP** – Nanopartícula branca

**Cou6** – Coumarin-6

**Cou6-NP** – Nanopartícula contendo Coumarin-6

**DMEM** – Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**FDA** – Food and Drug Administration

**GBM** – Glioblastoma multiforme

**IC50** – 50% da concentração inibitória máxima

**MLT** – Melatonina

**MLT-NP** – Nanopartícula contendo melatonina

**MRC-5** – Linhagem celular de fibroblasto pulmonar

**MTT** – Ensaio colorimétrico para avaliar a atividade metabólica celular

**OMS** – Organização mundial da saúde

**PBS** – Tampão fosfato-salino

**PCL** – Poli(E-caprolactona)

**ROS** – Espécie reativa de oxigênio

**SFB** – Soro fetal bovino

**SNC** – Sistema nervoso central

**TNF** – Fator de necrose tumoral

**U87MG** – Linhagem celular de glioblastoma multiforme humano

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
<b>2.1 Glioblastoma Multiforme Humano</b> .....	14
<b>2.2 Melatonina</b> .....	16
<b>2.3 Nanopartículas poliméricas</b> .....	17
<b>3. OBJETIVO</b> .....	18
<b>3.1 Geral</b> .....	18
<b>3.2 Específico</b> .....	19
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	19
<b>4.1 Cultivo Celular</b> .....	19
<b>4.2 Preparo das Nanopartículas</b> .....	19
<b>4.3 Avaliação da Citotoxicidade <i>in vitro</i></b> .....	20
<b>4.4 Avaliação Qualitativa da Internalização Celular</b> .....	20
<b>4.5 Avaliação Quantitativa da Internalização Celular</b> .....	20
<b>4.6 Análises Estatísticas</b> .....	21
<b>5. RESULTADOS</b> .....	21
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	24
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	25
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	25
<b>ANEXO A – Artigo publicado com os resultados deste trabalho</b> .....	30

## 1. INTRODUÇÃO

Os tumores cerebrais normalmente são secundários, provenientes da metástase de outros tipos de câncer. Os tumores primários não ocorrem com tanta frequência como os secundários, e dificilmente irão se espalhar para outros órgãos, porém são os mais agressivos e de difícil tratamento (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). Os gliomas abrangem o maior número de tipos de tumores primários do sistema nervoso central (SNC), e são genericamente denominados como tumores de origem nas células da glia, e podem se diferenciar em astrocitomas, oligodendrogliomas e ependiomas (AMERICAN BRAIN TUMOR ASSOCIATION, 2018).

Glioblastoma ou glioblastoma multiforme (GBM) é considerado um tipo de astrocitoma grau IV. Esse tumor é o mais comum e agressivo dentre os gliomas, correspondendo a cerca de 50% de todos os gliomas e 16% de todos os casos de tumor cerebral primário, mais incidente em adultos e idosos (MARQUES; SANTOS, 2019; TAMIMI; JUWEID, 2017). O GBM afeta a vida dos pacientes tanto de forma física quanto psicológica e neurológica, visto que este tipo de tumor acomete estruturas cerebrais, desenvolvendo sintomas como cefaleia, convulsões, vômitos, aumento da pressão intracraniana, perda sensorial e/ou motora, ataques epiléticos e problemas de memória (BEHIN et. al. 2003).

O glioblastoma trata-se de um tumor de mau prognóstico e com taxa de sobrevida em torno de 15 meses (PERRY; WESSELING, 2016; TAMIMI; JUWEID, 2017). Atualmente, o tratamento de GBM consiste em remoção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, e estas opções dependem do quadro clínico geral do paciente (MARQUES; SANTOS, 2019; NORIYUKI et. al., 2014). Novos tratamentos são um grande desafio para a ciência, uma vez que a barreira hematoencefálica (BHE) restringe o acesso de fármacos ao SNC (BASTIANCICH et. al., 2016; PATEL; SOUTO; SINGH, 2013).

O tratamento pós-cirúrgico de GBM é baseado na quimioterapia combinada com radioterapia, que deve ser iniciada em até seis semanas após a ressecção do tumor. O fármaco padrão para o tratamento do GBM é o temozolomida por via oral (MARQUES; SANTOS, 2019). Porém a temozolamida pode provocar trombocitopenia, linfopenia e neutropenia, o que pode agravar o quadro clínico do paciente, além de ser uma medicação de alto custo, o que dificulta o acesso e adesão ao tratamento.

Ademais, o tratamento atual não é capaz de melhorar o prognóstico dos pacientes (FRIEDMAN; KERBY; CALVERT, 2000; MARQUES; SANTOS, 2019).

A melatonina (MLT) (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio produzido pela glândula pineal, que atua na regulação do ciclo circadiano. A MLT apresenta importante atividade antioxidante e tem sido amplamente estudada para tratamento de doenças como câncer, diabetes, doença de Alzheimer e distúrbios imunológicos (LISSONI, 2007; TAMURA, et. al., 2009). Alguns estudos indicam que a MLT possui ação oncostática, estimula a proliferação de células do sistema imune e também é capaz de induzir a apoptose em células tumorais (SRINIVASAN, et. al., 2008; XIN, et. al., 2015).

Na busca de novos tratamentos para o GBM, estudos têm demonstrado que a MLT inibe a proliferação das células de glioma, bem como o seu crescimento tumoral *in vivo*. Além disso, ela prejudica fortemente a auto-renovação das células tronco glioblastomais e sua capacidade de iniciar a formação do tumor (MARTÍN, 2014; CHEN et al., 2016). Neste contexto, a MLT possui um potencial papel em prevenir a invasão e a migração das células de GBM, através da inibição da expressão de metaloproteinase 2, fator de crescimento endotelial vascular, e da proteína HIF-1 (WANG et al., 2012; ZHANG et al., 2013).

Uma alternativa para aumentar o aporte de fármacos no SNC é a encapsulação dessas substâncias em nanopartículas, visto que, dependendo da estrutura e tamanho, esses sistemas são capazes de permear a BHE, possibilitando assim, um tratamento menos invasivo, com maior concentração do fármaco no local alvo e mais eficiente (STEINIGER et. al., 2004; URBANSKA et. al., 2015).

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Glioblastoma Multiforme Humano**

O câncer do SNC pode se originar tanto no cérebro quanto na medula espinhal, e cerca de 88% desse tipo de câncer acontece no cérebro (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2020). Os tumores cerebrais normalmente são secundários, provenientes da metástase de tumores originados em outros órgãos. Raramente origina-se um tumor primário no cérebro, mas quando acontece, são tumores mais agressivos, de difícil tratamento, baixo prognóstico e dificilmente irão espalhar para outros órgãos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016; AMERICAN BRAIN TUMOR ASSOCIATION, 2018). Estes tumores são de difícil diferenciação, uma vez que todos

possuem sintomas similares, como cefaleia, vômitos, alterações neurológicas, convulsões, ataques epiléticos e problemas de memória e atividade mental (BEHIN, 2003; GRANT, 2020).

O GBM é um tumor cerebral primário, com origem nas células da glia, do tipo astrocitoma de grau IV, no qual os astrocitomas são classificados pelo grau de agressividade numa escala de I a IV. Este tipo de tumor corresponde a cerca de 50% dos casos e é o mais agressivo dentre os gliomas, apresentando uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 15 meses (PERRY; WESSELING, 2016). A maior parte dos casos ocorre em pessoas idosas, mas há registros de crianças com GBM (LÜTGENDORF-CAUCIG, 2020).

O desenvolvimento do GBM ainda é muito discutido, uma vez que sua aparição pode ser influenciada por fatores genéticos ou por fatores externos, como exposição à radiação ionizante, algumas infecções virais e imunodeficiências (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2018). Há na literatura, estudos que investigam comportamentos que podem estar relacionados com o surgimento de gliomas, como o uso constante do celular, hábitos alimentares e atividade física, tabagismo e álcool, entretanto, não há ainda dados conclusivos que provem alguma relação com o surgimento de tumores cerebrais (LÜTGENDORF-CAUCIG, 2020; WLODARCZYK, 2020).

O principal tratamento para GBM consiste em ressecção cirúrgica seguida de quimioterapia combinada com radioterapia, a depender do quadro clínico do paciente (MARQUES; SANTOS, 2019). A ressecção cirúrgica é realizada na maioria dos casos e visa retirar todo o tumor ou a maior parte possível, a fim de diminuir a pressão intracraniana, para estabelecer um diagnóstico histológico e preservar as estruturas neurológicas. Apesar de ser segura, a cirurgia é muito complexa, uma vez que a localização do tumor pode dificultar o procedimento e/ou afetar as funções psicomotoras do paciente (LAWS, 2003; AMERICAN BRAIN TUMOR ASSOCIATION, 2017).

A combinação entre quimioterapia e radioterapia deve acontecer em até seis semanas após a remoção cirúrgica. A maioria dos quimioterápicos são citotóxicos e, atualmente, existem dois medicamentos aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) para tratamento de GBM, que são a temozolamida e a carmustina, porém, estes medicamentos não melhoram o prognóstico do paciente, podendo ainda causar trombocitopenia, linfopenia e neutropenia, o que pode agravar

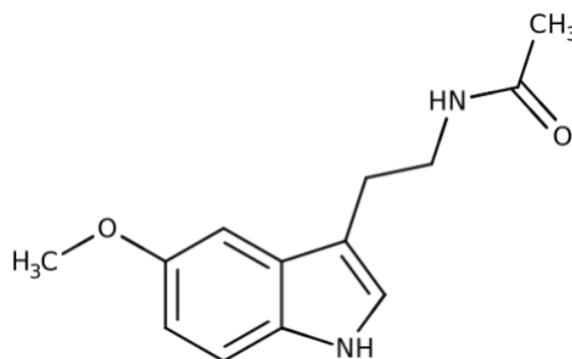
o quadro (FRIEDMAN; KERBY; CALVERT, 2000; AMERICAN BRAIN TUMOR ASSOCIATION, 2017; MARQUES; SANTOS, 2019).

O desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de GBM é um grande desafio devido a passagem dificultada pela BHE, que é a estrutura de vascularização do cérebro, que possui permeabilidade seletiva e é responsável por manter a homeostase do local, impedindo a passagem de patógenos e substâncias indesejadas. As junções intercelulares extremamente estreitas impedem a passagem da maioria dos fármacos existentes, o que dificulta o tratamento de diversas doenças do SNC e também o desenvolvimento de novos fármacos (DENEMAN; PRAT, 2015; CHAMBERS; HUANG, 2019).

## 2.2 Melatonina

A MLT (N-acetil-5-metoxitriptamina) (Figura 1) é um hormônio sintetizado pela glândula pineal a partir do L-triptofano, e sua síntese diminui ao longo dos anos. A MLT possui diversas funções, a principal delas é a regulação do ciclo circadiano e dos ritmos biológicos, funcionando como um “relógio interno”. Sua secreção acontece exclusivamente durante a noite e depois de secretada, a MLT é distribuída para vários tecidos do corpo e não é estocada (NETO; CASTRO, 2008; LUO, 2020).

**Figura 1.** Representação da estrutura química planar da melatonina.



(Adaptado de Drugbank)

A MLT é capaz de atravessar a BHE com facilidade, e é utilizada na prática clínica há muitos anos, por ser segura, para melhorar a qualidade do sono, tratamento de *jetleg* e por sua ação antioxidante (FERREIRA, 2010). Além do mais, a MLT exerce

um papel importante na modulação da resposta imune, possui ação anti-inflamatória e antitumoral/oncostática (NETO; CASTRO. 2008).

O primeiro estudo investigando a ação antitumoral da melatonina foi realizado em 1981, no qual foi induzido câncer de mama em ratas e elas foram divididas em grupos que receberiam ou não MLT. Após 90 dias, 50% das ratas que não receberam MLT apresentaram desenvolvimento do câncer de mama, enquanto que nenhuma rata que recebeu MLT desenvolveu câncer (TAMARKIN, 1981).

Desde o estudo publicado por Tamarkin et. al. 1981, novos estudos acerca da ação antitumoral da MLT surgiram e hoje se tem conhecimento de alguns mecanismos. Alguns estudos demonstraram a atividade antimitótica da MLT *in vitro*, e também constataram uma atividade oncostática. Além disso, a MLT é capaz de inibir a expressão de genes relacionados ao crescimento tumoral (NETO; SCALDAFERRI, 2005). Outro aspecto da ação antitumoral da MLT é a sua capacidade de aumentar a produção de espécie reativa de oxigênio (ERO's) em células tumorais, devido a sua influência sobre a expressão de genes da cadeia respiratória (MARTÍN, 2014; MORETTI, 2020).

A MLT tem sido relatada com atividade antitumoral para vários tipos de tumor, entre eles o GBM. Há relatos na literatura de que a MLT é capaz de reduzir significativamente a proliferação de células tumorais de GBM e também é capaz de induzir uma redução da auto-renovação das células-tronco glioblastomais (MARTÍN, 2014; CHEN, 2016). Além do mais, a MLT possui um potencial papel em prevenir a invasão e a migração das células de GBM, através da inibição da expressão de metaloproteinase 2, fator de crescimento endotelial vascular, e da proteína HIF-1 (WANG et al., 2012; ZHANG et al., 2013).

Outras formas de utilização de MLT no tratamento de GBM também têm sido estudadas, como em conjunto com quimioterápicos. Em estudos realizados foi demonstrado que a MLT pode atuar em sinergia com quimioterápicos, podendo provocar uma redução nos efeitos colaterais destes fármacos e aumentar a qualidade de vida do paciente (MORETTI, 2020).

### **2.3 Nanopartículas poliméricas**

As nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais com tamanho entre 10 e 1000 nm, e por seu tamanho, conseguem interagir com as células do organismo, tanto por moléculas da superfície celular, quanto por moléculas intracelulares (APARICIO-

BLANCO, 2016). Além de permitir maior interação com as células, o tamanho dos nanosistemas permite a utilização de diversas vias de administração, como a parenteral, oral, oftálmica e também a via *nose-to-brain*. Por isso esses sistemas vêm sendo desenvolvidos com foco terapêutico e diagnóstico (SCHAFFAZICK, 2003; MURA; COUVREUR, 2012; DE OLIVEIRA JÚNIOR, 2019).

Os nanosistemas apresentam características que conferem mais vantagens se comparados aos sistemas tradicionais de tratamento. Além do tamanho nanométrico, que facilita a interação com as células e diferentes vias de administração, os nanosistemas permitem a encapsulação da combinação de duas ou mais substâncias e a liberação controlada de fármacos, o que pode aumentar a eficácia, aumentar o tempo de ação, diminuir a toxicidade, a frequência e os efeitos colaterais (PATEL, 2012; APARICIO-BLANCO, 2016; STEVANOVIC, 2017; LI; LIU; ZHANG, 2020).

As nanopartículas poliméricas são feitas a partir de polímeros não-tóxicos, biodegradáveis e biocompatíveis, e podem ser divididas em nanocápsulas ou nanoesferas e sua principal diferença é a presença ou não de óleo. As nanocápsulas são estruturas compostas por uma parede polimérica e um núcleo oleoso, podendo conter fármacos adsorvidos na parede polimérica ou dissolvidos no núcleo oleoso. Por outro lado, as nanoesferas não possuem óleo em sua composição e são formados apenas por uma matriz polimérica (SCHAFFAZICK, 2003; PATEL, 2012; STEVANOVIC, 2017).

Embora as nanopartículas sejam amplamente desenvolvidas para o tratamento de doenças do SNC e apresentem maior facilidade de passagem pela BHE que os sistemas tradicionais, a BHE ainda é um obstáculo para a entrega de fármacos no cérebro (APARICIO-BLANCO, 2016). Diante disso, o desenvolvimento de nanopartículas para a via *nose-to-brain* tem crescido, aumentando as possibilidades de tratamento para doenças do SNC, como o glioblastoma, (DE OLIVEIRA JUNIOR, 2019; ULLAH, 2020; UPADHAYA, 2020).

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1 Geral**

Este trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade e internalização celular de nanopartículas poliméricas contendo melatonina (MLT-NP) em células de glioblastoma (U87MG).

### 3.2 Específico

- Avaliar *in vitro* a toxicidade celular da MLT encapsulada em nanopartículas poliméricas em células de GBM da linhagem U87MG e fibroblasto pulmonar da linhagem MRC-5;

- Verificar *in vitro* o perfil de internalização celular de nanopartículas poliméricas contendo melatonina em células da linhagem U87MG e MRC-5.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Cultivo Celular

As células U87MG (linhagem celular de glioblastoma humano) e as células MRC-5 (fibroblasto pulmonar humano) foram obtidas no Banco de Células do Rio de Janeiro. As células U87MG foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) com 10% de soro fetal bovino (SFB) (v/v), penicilina (100 U/mL) estreptomicina (100 µg/mL), 1% de aminoácidos não essenciais (v/v) e 1 mM de piruvato de sódio. As células MRC-5 foram cultivadas em meio de cultura DMEM com alta concentração de glicose com 10% de SFB (v/v), penicilina (100 U/mL) estreptomicina (100 µg/mL), 1% de aminoácidos não essenciais (v/v) e 1 mM de piruvato de sódio. Ambas as linhagens foram cultivadas em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>.

### 4.2 Preparo das Nanopartículas

As nanopartículas de poli(E-caprolactona) contendo melatonina (MLT-NP) foram previamente preparadas pelo método de nanoprecipitação (DE OLIVEIRA JUNIOR, et al. 2019). Em suma, 100 mg de PCL foram dissolvidos em 30 mL de acetona, enquanto 10 mg de MLT foram dispersas em 160 mg de Captex® e 80 mg de Span 80 e em seguida, a solução foi adicionada à fase orgânica. A mistura foi vertida em 50 mL de fase aquosa contendo 80 mg de Tween 80 e foi então incubada sob agitação magnética por 30 min. Finalmente, o solvente orgânico foi removido em rotaevaporação por 45 min.

As nanopartículas brancas (Branco-NP) foram preparadas seguindo o mesmo protocolo, sem a adição de MLT. As nanopartículas contendo Coumarin-6 (Cou6-NP) foram obtidas pela dissolução de 1 mg do corante na fase orgânica durante os estágios iniciais da formulação.

### **4.3 Avaliação da Citotoxicidade *in vitro***

A citotoxicidade da MLT-NP foi determinada para a duas linhagens celulares, uma tumoral (U87MG) e uma não-tumoral (MRC-5), através do ensaio de MTT. As células U87MG e MRC-5 foram cultivadas em placas de 96 poços com  $10^4$  células/por poço. As células foram expostas à MLT livre, MLT-NP e Branco-NP em diferentes concentrações (6,2 – 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), por 48 h. Após a incubação, 100  $\mu\text{L}$  de solução de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultivo) foram adicionados a cada poço seguido de incubação por 3 h a 37 °C. Então, o meio foi removido e 100  $\mu\text{L}$  de DMSO foram adicionados para dissolver os cristais de formazan. A solução foi incubada por 20 min sob agitação a 20 rpm. A intensidade de absorbância foi mensurada a 570 nm utilizando um leitor de placas no espectrofotômetro (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific, USA). Os estudos de citotoxicidade foram realizados em triplicata. O perfil citotóxico da MLT-NP foi determinado a partir da comparação da absorbância das células tratadas e das células não tratadas.

### **4.4 Avaliação Qualitativa da Internalização Celular**

As células U87MG e MRC-5 foram cultivadas em placas de 35mm com  $2 \times 10^5$  células/mL por poço. As células foram tratadas com Cou6-NP (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 1 h a 37 °C, foram lavadas três vezes com tampão PBS gelado e então foram fixadas com paraformaldeído 4% (v/v). As placas foram agitadas por 20 min a 10 rpm. O núcleo foi marcado com Hoescht e a internalização celular das nanopartículas foi observada em microscópio de fluorescência (DMI 400B, Leica Microsystems, USA).

### **4.5 Avaliação Quantitativa da Internalização Celular**

As células U87MG foram cultivadas em placas de 12 poços com  $1,5 \times 10^5$  células/mL por poço e em seguida foram incubadas com Cou6-NP (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) diluída em meio DMEM (1:50) por diferentes tempos (15 – 120 min). Após o período de incubação, o meio foi retirado e as células foram lavadas com 1mL de tampão PBS, sendo desagregadas da placa utilizando 200  $\mu\text{L}$  de tripsina por poço, que posteriormente foi inativada com 200  $\mu\text{L}$  de SFB e 1 mL de PBS. As suspensões foram transferidas para tubos de citometria, e as células foram lavadas duas vezes com 2 mL de PBS, a 1000 rpm por 5 min. Após a última lavagem, as células foram re-suspensas em 200  $\mu\text{L}$  do mesmo tampão, e em seguida a internalização celular foi avaliada em citômetro de fluxo (BD FACSCANTO II, BD Biosciences, NJ, USA).

#### **4.6 Análises Estatísticas**

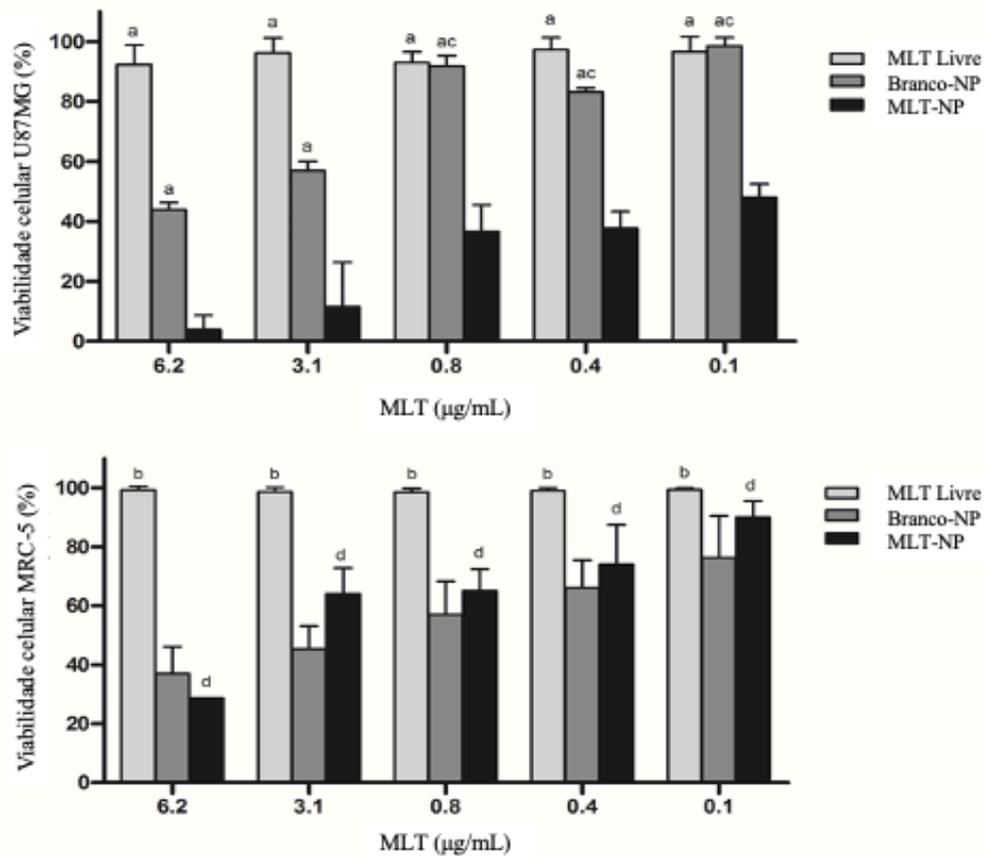
Os dados obtidos foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão comparados estatisticamente utilizando o método de análise de variâncias (two-way ANOVA), com  $p < 0,05$ .

### **5. RESULTADOS**

O perfil citotóxico da MLT-NP foi determinado pelo ensaio de MTT, que é um teste colorimétrico para avaliar a viabilidade celular. As células U87MG e MRC-5 foram tratadas com MLT livre, MLT-NP e Blank-NP como grupo controle. A porcentagem de células viáveis foi calculada, após 48h de exposição, em comparação à viabilidade das células não tratadas (Fig.1). A formulação Blank-NP mostrou resultado semelhante em ambas as linhagens celulares, reduzindo a viabilidade celular em concentrações mais altas. A MLT livre não demonstrou redução na viabilidade celular em nenhuma das linhagens. Por outro lado, foi observada diminuição significativa da viabilidade em células de glioblastoma U87MG quando expostas à MLT-NP, comparada com a viabilidade das células saudáveis MRC-5 ( $p < 0,05$ ).

A formulação apresentou efeito citotóxico em células U87MG mesmo para a menor concentração de MLT-NP ( $0,1 \mu\text{g/mL}$ ), reduzindo a viabilidade celular em aproximadamente 50%. Além disso, a MLT-NP reduziu em 2500 vezes o IC50 da MLT, considerando o valor de IC50 encontrado para MLT livre nas células U87MG ( $250 \mu\text{g/mL}$ ) após 48 h de incubação.

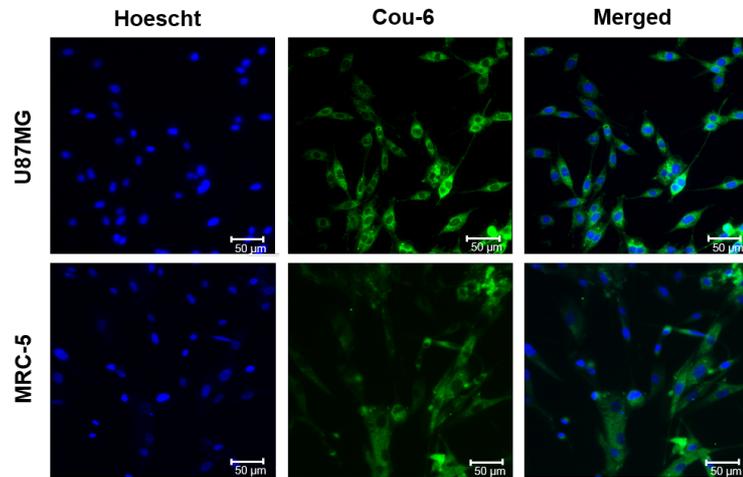
**Figura 2.** Citotoxicidade da MLT livre, Branco-NP e MLT-NP em células U87MG e MRC-5 avaliada pelo ensaio de MTT após incubação por 48 h. Os dados estão representados pela média  $\pm$  SD (n=3). a)  $p < 0.005$  vs U87MG MLT-NP; b)  $p < 0.05$  vs MRC-5 MLT-NP; c)  $p < 0.05$  vs U87MG Branco-NP vs MRC-5 Branco-NP; d)  $p < 0.05$  U87MG MLT-NP vs MRC-5 MLT-NP.



(Fonte: De Oliveira Junior et. al., 2019).

A internalização celular das nanopartículas foi avaliada qualitativamente por microscopia de fluorescência, após a incubação de células U87MG e MRC-5 com Cou6-NP por 1h. As imagens demonstraram que a Cou6-NP está difusa no citoplasma de ambas as células, emitindo fluorescência verde (Fig. 3).

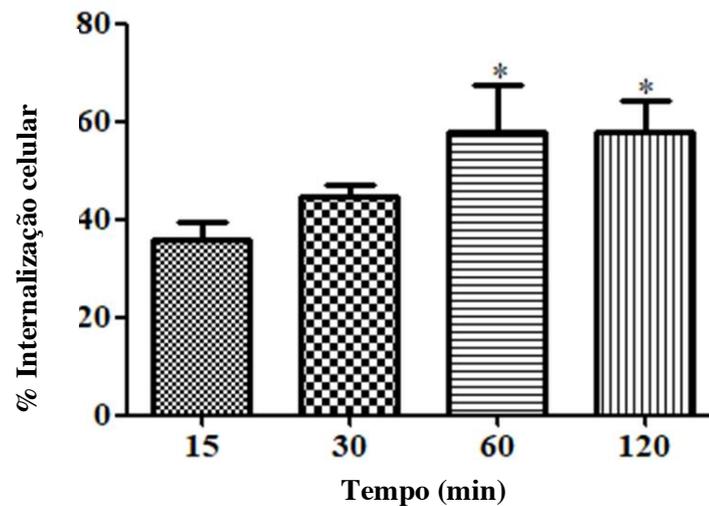
**Figura 3.** Internalização de Cou6-NP em células U87MG e MRC-5 observada em microscópio de fluorescência após 1h de incubação a 37 °C. Os núcleos celulares foram marcados com Hoechst (azul). A fluorescência verde indica a presença de Cou6-NP no citoplasma celular.



(Fonte: De Oliveira Junior et. al., 2019).

Já a análise quantitativa foi realizada por citometria de fluxo, após incubação das células U87MG com Cou6-NP por diferentes tempos (15-120 min) (Fig. 3) Os resultados demonstraram que a internalização da formulação pela U87MG é tempo-dependente. Após 60 min, não foi observado aumento significativo da porcentagem de internalização celular.

**Figura 4.** Internalização celular de Cou6-NP em células U87MG pelo tempo de incubação. Os dados estão representados pela média  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$  vs 15 e 30 min.



## 6. DISCUSSÃO

Os estudos de citotoxicidade *in vitro* demonstraram que a MLT-NP diminuiu a viabilidade de células U87MG de forma seletiva, quando comparado com a citotoxicidade observada em células da linhagem MRC-5. Sabe-se que a MLT pode inibir a expressão de miRNA-155 em células de GBM, impedindo assim o seu crescimento celular (GU et. al. 2017). A MLT também diminui a expressão da proteína inibidora de apoptose Bcl-2, induzindo o aumento da sensibilidade das células de glioma ao ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (MARTÍN et. al., 2010).

Estudos indicaram que a MLT pode provocar um aumento na produção de espécie reativa de oxigênio (ERO's) em células tumorais, provocando assim uma diminuição na viabilidade celular, enquanto que em células saudáveis a MLT provoca uma diminuição de ROS e aumento na viabilidade celular, o que explica a baixa citotoxicidade da formulação em células MRC-5 em relação a U87MG (LANOIX; GUÉRIN; VAILLANCOURT, 2012; FRANCO et. al. 2018).

Além disso, os resultados demonstraram que a MLT apresentou atividade antitumoral apenas quando encapsulada nas nanopartículas poliméricas. Sendo assim, a nanoencapsulação aumentou a atividade citotóxica da MLT em células tumorais, em concentrações menores do que as descritas na literatura (CHEN et. al., 2016; MARTÍN et. al., 2013, 2014; YADAV et. al., 2017). Esses resultados podem ser atribuídos à alta internalização celular das partículas e a liberação controlada da MLT ao longo do tempo (DE OLIVEIRA JUNIOR, 2019).

A diminuição da viabilidade celular causada pelas maiores concentrações de Blank-NP pode ser explicado pela relação entre o número de nanopartículas e o número de células. O maior número de partículas pode influenciar negativamente a viabilidade celular (MENDES et. al., 2015).

Diferentes mecanismos podem explicar a internalização celular das nanopartículas, entretanto, sabe-se que a internalização de nanopartículas poliméricas nas células ocorre por endocitose, ou seja, é um processo ativo no qual as características físico-químicas das nanopartículas influenciam no mecanismo de transporte (DUAN; LI, 2013). Há na literatura, que a internalização de nanopartículas em células U87MG pode acontecer por pinocitose envolvendo integrinas, como a integrina  $\alpha_v\beta_3$  por ser superexpressa em células dessa linhagem (DE LA ROSA, 2020).

Os estudos de internalização celular *in vitro* demonstraram que a formulação foi captada rapidamente pelas células. Em especial, o perfil tempo-dependente de

internalização da U87MG pode justificar os efeitos antitumorais da formulação. Após 1 h de incubação, não foi observado aumento significativo da porcentagem de partículas internalizadas pela U87MG, o que pode ser explicado pelo número de nanopartículas ser muito superior ao número de células e pelas condições do experimento (GU et. al., 2017).

## 7. CONCLUSÃO

A nanoencapsulação da melatonina promoveu citotoxicidade seletiva para células U87MG quando comparado com as células MRC-5, devido à facilitada internalização celular e liberação do fármaco ao longo do tempo. Assim a MLT-NP surge como uma abordagem promissora para o tratamento do GBM. Estudos posteriores devem ser realizados para elucidar o mecanismo de endocitose envolvido na internalização celular destas nanopartículas nas células de GBM, bem como a eficácia do tratamento *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- AMERICAN BRIAN TUMOR ASSOCIATION. Glioblastoma and malignant astrocytomas. Chicago, 2017. 24p.
- AMERICAN BRAIN TUMOR ASSOCIATION. About brain tumors: a primer for patients and caregivers. Chicago, 2018. 84 p.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Types of brain and spinal cord tumors in adults. Jan. 2016.
- APARICIO-BLANCO, J.; MARTÍN-SABROSO, C.; TORRES-SUÁREZ, A. I. In vitro screening of nanomedicines through the blood brain barrier: a critical review. **Biomaterials.**, v. 103, p. 229-255, 2016.
- BASTIANCICH, C. et. al. Anticancer drug-loaded hydrogels as drug delivery systems for the local treatment of glioblastoma. **J. Control Release**, v. 243, p. 29-42, 2016.
- BEHIN, A. et. al. Primary brain tumours in adults. **Lancet**, v. 361, p. 323-331, 2003.
- CHAMBERS, D.; HUANG, C. Blood-Brain Barrier. In: CHAMBERS, D; HUANG, C.; MATTHEWS, G. Basic Physiology for Anaesthetists. 2<sup>a</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2019, cap. 47, p. 200-201.

CHEN, X. et. al. Melatonin inhibits tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells via the AKT-EZH2-STAT3 signaling axis. **J. Pineal Res.**, v. 61, n. 2, p. 208-217, 2016.

DE LA ROSA, J. M. R. Microfluidic-assisted preparation of RGD-decorated nanoparticles: exploring integrin-facilitated uptake in cancer cell lines. **Sci. Rep.**, v. 10, n. 1, 14505, 2020.

DE OLIVEIRA JUNIOR, E. R. et al. Increased Nose-to-Brain Delivery of Melatonin Mediated by Polycaprolactone Nanoparticles for the Treatment of Glioblastoma. **Pharm. Research.**, v. 36, p. 131, 2019.

DANEMAN, R.; PRAT, A. The blood-brain barrier. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** v. 7, n. 1, 2015.

DUAN, X.; LI, Y. Physicochemical characteristics of nanoparticles affect circulation, biodistribution, cellular internalization, and trafficking. **Small**, v. 9, n. 9-10, p. 1521-1532, 2013.

FRANCO, D. et. al. Mitochondria transcription factor a: a putative target for the effect of melatonin on U87MG malignant glioma cell line. **Molecules**, v. 23, n. 5, E1129, 2018.

FRIEDMAN, H. S.; KERBY, T.; CALVERT, H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. **Clin. Cancer Res.**, v. 6, p. 2585-2597, 2000.

GRANT, R. et. al. Interventions to reduce the time to diagnosis of brain tumours (Review). **Cochrane Database Syst. Rev.**, v. 2020, n. 9, 2020.

GU, J. et. al. Melatonin inhibits proliferation and invasion via repression of Mirna-155 in glioma cells. **Biomed. Pharmacother.**, v. 93, p. 969-975, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Câncer do sistema nervoso central – Versão para profissionais da saúde, 2018. Disponível em: [<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-sistema-nervoso-central/profissional-de-saude>]. Acesso em: 14 out. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Câncer do sistema nervoso central, 2020. Disponível em: [<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-sistema-nervoso-central>]. Acesso em: 14 out. 2020.

LANOIX, D. GUÉRIN, P. VAILLANCOURT, C. Placental melatonin production and melatonin receptor expression are altered in preeclampsia: new insights into the role of this hormone in pregnancy. **J. Pineal Res.**, v. 53, n. 4, p. 417-425, 2012.

LAWS, E. R. et al. Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project. **J Neurosurg**, v. 99, n.3, p. 467-473, 2003.

LI, K.; LIU, C. J.; ZHANG, X. Z. Multifunctional peptides for tumor therapy. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, S0169-409X(20)30146-0, 2020.

LISSONI, P. Biochemotherapy with standard chemotherapies plus the pineal hormone melatonin in the treatment of advanced soli. **Pathol. Biol.**, v. 55, n.3-4, p.201-204, 2007.

LUO, F. et. al. Melatonin and autophagy in aging-related neurodegenerative diseases. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, n. 1, 2020.

LÜTGENDORF-CAUCIG, C. et. al. Guiding treatment choices for elderly patients with glioblastoma by a comprehensive geriatric assessment. **Curr. Oncol. Rep.**, v. 22, n. 9:93, 2020.

MARQUES, D. F.; SANTOS, M. Gliomas de alto grau. In: SANTOS, M. et. al. Diretrizes Oncológicas 2. 1ª ed. São Paulo: Doctor Press Ed. Científica, 2019. cap. 2, p. 35-44.

MARTÍN, V. et. al. Melatonin sensitizes human malignant glioma cells against TRAIL-induced cell death. **Cancer Lett.**, v. 287, p. 216-223, 2010.

MARTÍN, V. et. al. Melatonin-induced methylation of the ABCG2/BCRP promoter as a novel mechanism to overcome multidrug resistance in brain tumour stem cells. **Br. J. Cancer**, v. 108, n. 10, p. 2005-2012, 2013.

MARTÍN, V. et. al. Involvement of autophagy in melatonin-induced cytotoxicity in glioma-initiating cells. **J. Pineal Res.**, v. 57, n. 3, p. 308-316, 2014.

MENDES, L. P. et. al. Biodegradable nanoparticles designed for drug delivery: the number of nanoparticles impacts on cytotoxicity. **Toxicol. In Vitro**, v. 29, n. 6, p. 1268-1274, 2015.

MORETTI, E. et. al. Melatonin's Antineoplastic Potential Against Glioblastoma. **Cells**, v. 9, n. 3, 2020.

- MURA, S.; COUVREUR, P. Nanotheranostics for personalized medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 64, n. 13, p. 1394-1416, 2012.
- NETO, J. A. S.; SCALDAFERRI, P. M. Melatonina e câncer – revisão da literatura. **Rev. Bras. Canc.**, v. 51, n. 1, p. 49-58, 2005.
- NETO, J. A. S.; CASTRO, B. F. Melatonina, ritmos biológicos e sono – uma revisão da literatura. **Rev. Bras. Neurol.**, v. 44, n. 1, p. 5 – 11, 2008.
- NORIYUKI, O. et. al. Current advances in radiotherapy for newly diagnosed glioblastoma multiforme. **J. Neurol. Neurophysiol.** v. 5, n. 1, p. 1-6, 2014.
- PATEL, T. et. al. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to the Central Nervous System. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 64, n. 7, p. 701-705, 2012.
- PATEL, M.; SOUTO, E. B.; SINGH, K. K. Advances in brain drug targeting and delivery: limitations and challenges of solid lipid nanoparticles. **Expert Opin Drug Deliv.**, v. 10, n. 7, p. 889-905, 2013.
- PERRY, A.; WESSELING, P. Histologic classification of gliomas. **Handb. Clin. Neurol.** v. 134, n. 3, p. 71-92, 2016.
- SCHAFFAZICK, S. R. et. al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim. Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.
- SRINIVASAN, V. et. al. Therapeutic actions of melatonin in câncer: possible mechanisms. **Integr. Cancer Ther.**, v. 7, n. 3, p. 189-203, 2008.
- STEINIGER, S. C. J. et. al. Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles. **Int. J. Cancer**, v. 109, n. 5, p. 759-767, 2004.
- TAMARKIN, L. et. al. Melatonin inhibition and pinealectomy enhancement of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in the rat. **Cancer Res.**, v. 41, n. 11, p. 4432-4436, 1981.
- TAMIMI, A. F.; JUWIED, M. Epidemiology and Outcome of Glioblastoma. In: DE VLEESCHOUVER, S. Glioblastoma. 1st ed. Brisbane: Codon Publications, 2017. cap. 8, p. 143-153.

TAMURA, H. et. al. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertil. Steril.**, v. 92, n. 1, p. 328-343, 2009.

ULLAH, I. et. al. Nose-to-brain delivery of cancer-targeting paclitaxel-loaded nanoparticles potentiates antitumor effects in malignant glioblastoma. **Mol. Pharm.**, v. 17, n. 4, p. 1193-1204, 2020.

UPADHAYA, P. G.; PULAKKAT, S. PATRAVALE, V. B. Nose-to-brain delivery: exploring newer domains for glioblastoma multiforme management. **Drug Deliv. and Transl. Res.**, v. 10, p. 1044-1056, 2020.

URBANSKA, K. et. al. The effect of silver nanoparticles (AgNPs) on proliferation and apoptosis of in ovo cultured glioblastoma multiforme (GBM) cells. **Nanoscale Res. Lett.**, v. 10:98, p.1-12, 2015.

WANG, J. et al. Melatonin suppresses migration and invasion via inhibition of oxidative stress pathway in glioma cells. **J. Pineal Res.**, v. 53, n. 2, p. 180–187, 2012.

WLODARCZYK, A. et. al. Gaps and Doubts in Search to Recognize Glioblastoma Cellular Origin and Tumor Initiating Cells. **J. Oncol.**, v. 2020, id. 6783627, 15 p., 2020.

XIN, Z. et. al. Melatonin as a treatment for gastrointestinal cancer: a review. **J. Pineal Res.**, v. 58, n. 4, p. 375-387, 2015.

YADAV, S. K. et. al. Nanomelatonin triggers superior anticancer functionality in a human malignant glioblastoma cell line. **Nanotechnology**, v. 28, n. 36, 365102, 2017.

ZHANG, Y. et al. Melatonin antagonizes hypoxia-mediated glioblastoma cell migration and invasion via inhibition of HIF-1 $\alpha$ . **J. Pineal Res.**, v. 55, n. 2, p. 121–130, 2013.

## ANEXO A – Artigo publicado com os resultados deste trabalho

Drug Delivery and Translational Research (2020) 10:1688–1699  
<https://doi.org/10.1007/s13346-020-00816-2>

ORIGINAL ARTICLE



### Nose-to-brain drug delivery mediated by polymeric nanoparticles: influence of PEG surface coating

Edilson Ribeiro de Oliveira Junior<sup>1</sup> · Lílian Cristina Rosa Santos<sup>1</sup> · Mariana Arraes Salomão<sup>1</sup> · Thais Leite Nascimento<sup>1</sup> · Gerlon de Almeida Ribeiro Oliveira<sup>2</sup> · Luciano Morais Lião<sup>2</sup> · Eliana Martins Lima<sup>1</sup>

Published online: 1 July 2020  
 © Controlled Release Society 2020

#### Abstract

Intranasal administration of mucus-penetrating nanoparticles is an emerging trend to increase drug delivery to the brain. In order to overcome rapid nasal mucociliary clearance, low epithelial permeation, and local enzymatic degradation, we investigated the influence of PEGylation on nose-to-brain delivery of polycaprolactone (PCL) nanoparticles (PCL-NPs) encapsulating bexarotene, a potential neuroprotective compound. PEGylation with 1, 3, 5, and 10% PCL-PEG did not affect particle diameter or morphology. Upon incubation with artificial nasal mucus, only 5 and 10% of PCL-PEG coating were able to ensure NP stability and homogeneity in mucus. Rapid mucus-penetrating ability was observed for 98.8% of PCL-PEG<sub>5%</sub> NPs and for 99.5% of PCL-PEG<sub>10%</sub> NPs. Conversely, the motion of non-modified PCL-NPs was markedly slower. Fluorescence microscopy showed that the presence of PEG on NP surface did not reduce their uptake by RMPI 2650 cells. Fluorescence tomography images evidenced higher translocation into the brain for PCL-PEG<sub>5%</sub> NPs. Bexarotene loaded into PCL-PEG<sub>5%</sub> NPs resulted in area under the curve in the brain (AUC<sub>brain</sub>) 3 and 2-fold higher than that for the drug dispersion and for non-PEGylated NPs ( $p < 0.05$ ), indicating that approximately 4% of the dose was directly delivered to the brain. Combined, these results indicate that PEGylation of PCL-NPs with PCL-PEG<sub>5%</sub> is able to reduce NP interactions with the mucus, leading to a more efficient drug delivery to the brain following intranasal administration.

**Keywords** Mucus penetration · Polycaprolactone · Fluorescence tomography · Bexarotene · PEGylation · Nose-to-brain delivery

#### Introduction

The design and development of new drug therapies to treat neurological diseases is a hard task [1]. The blood-brain barrier (BBB) is a discerning membrane that regulates the entry of molecules into the central nervous system (CNS), avoiding the permeation of toxic or harmful substances from the systemic circulation into the brain [2]. This protection is very important for the CNS homeostasis; however, it also contributes to poor accumulation of drugs in the cerebral tissue [3]. Consequently, many compounds have been discarded during

clinical studies when administered orally or systemically, since only sub-therapeutic concentrations reach the brain [4].

In an attempt to overcome the aforementioned drawbacks, intranasal administration has been investigated as a promising approach to improve drug distribution in the CNS [5]. The nose-to-brain drug delivery enables an alternative and direct access from the nasal cavity to the cerebral tissue, bypassing BBB restrictions [6, 7]. The mechanisms involved in this pathway include the absorption of molecules and particles by olfactory neuroepithelium and trigeminal neurons [8, 9]. Nose-to-brain delivery offers important advantages, such as increased brain bioavailability, easy and non-invasive administration, and better patient compliance [10]. Moreover, this route demonstrated a fast onset, reduction of pre-systemic metabolism, and avoidance of nonspecific side effects [5, 11].

Nevertheless, the rapid nasal mucociliary clearance, the low epithelial permeation, and the expressive enzymatic degradation may reduce the transport of drugs through this route [12, 13]. In order to overcome these issues, nose-to-brain delivery mediated by nanocarriers has demonstrated to be a successful strategy to

✉ Eliana Martins Lima  
 emllima@ufg.br

<sup>1</sup> FamaTec - Centro de PD&I de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás – UFG, 5ª Avenida c/Rua 240 s/n, Praça Universitária, Goiânia, GO 74605-170, Brazil

<sup>2</sup> LabRMN, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil