ARTHUR FILIPINI RODRIGUES BIANCO

Desenvolvimento de nanocarreadores para entrega combinada de cisplatina e dexametasona para o tratamento de glioblastoma multiforme

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) Carolina Demarchi Munhoz

São Paulo

2019

RESUMO

BIANCO, AFR. **Desenvolvimento de nanocarreadores para entrega combinada de cisplatina e dexametasona para o tratamento de glioblastoma multiforme.** 2019. 71 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O câncer é uma doença complexa, com alta incidência e mortalidade. Dentre eles, o glioblastoma multiforme (GB) é um tipo de câncer cerebral de rápido crescimento, que apresenta um dos piores prognósticos, pois, mesmo com remoção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, os pacientes possuem baixa expectativa de vida. Entre os quimioterápicos padrão-ouro usados no tratamento de GB, temos a temozolomida e a cisplatina, as quais apresentam muitos efeitos adversos. Além da quimioterapia, os glicocorticoides sintéticos, como a dexametasona, são utilizados como tratamento adjuvante para diminuir o edema cerebral, mas também apresenta diversos efeitos colaterais. Este estudo teve como objetivo desenvolver um nanocarreador para entrega combinada de cisplatina e dexametasona, a fim de aumentar a citotoxicidade celular e diminuir a concentração dos medicamentos e, assim, minimizar seus efeitos adversos. Desenvolvemos nanoemulsões (NE) contendo poloxamer 188, com a finalidade de auxiliar o transporte através da barreira hematoencefálica, dentro dos parâmetros desejados, como tamanho menor que 200 nm e PDI menor que 0,25. Observou-se uma redução no diâmetro com a incorporação dos fármacos, sendo observado tamanhos inferiores a 100 nm. Nanocarredores selecionados mostraram-se estáveis por 60 dias, e não reduziram de forma significativa ($p < 0,93$) a viabilidade de células imortalizadas C6 em cultura, quando utilizados em concentrações até 4 mg/mL por 24-96 h. O tratamento com nanocarreadores contendo 1 e 7,5 μM de cisplatina e dexametasona respectivamente, por 96 h, diminuiu a viabilidade da linhagem celular e a IC50 em mais de 8 vezes do que a combinação dos fármacos em solução. Portanto, as NE contendo a adição dos fármacos cisplatina e dexametasona apresentaram maior citotoxicidade em nosso modelo de cultura celular, e nossos resultados são muito promissores e apontam para uma ferramenta terapêutica potencialmente nova para o tratamento da GB.

Palavras-chave: Câncer. Glioblastoma multiforme. Cisplatina. Dexametasona. Nanoemulsões.

ABSTRACT

BIANCO, AFR. **Development of nanocarriers for combined delivery of cisplatin and dexamethasone for the treatment of glioblastoma multiforme.** 2019. 71 p. Dissertation (Master in Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Cancer is a complex disease, with high incidence and mortality. Among them, glioblastoma multiforme (GB) is a fast-growing brain cancer which presents one of the worst prognoses, since, even with surgical removal, radiotherapy and chemotherapy, patients have a low life expectancy. Among the gold standard chemotherapeutics used in the GB treatment, there are temozolomide and cisplatin, which have many adverse effects. In addition to the chemotherapy, synthetic glucocorticoids, such as dexamethasone, are used as adjuvant treatments to reduce brain edema, but it has several side effects, as well. This study aimed to develop a nanocarrier for the combined delivery of cisplatin and dexamethasone in order to increase cellular cytotoxicity and decrease the concentration of the drugs and thus minimize their side effects. We developed unloaded nanoemulsions (NE) containing poloxamer 188, with the purpose of improve translocation through the blood-brain barrier, within the desired parameters, such as size less than 200 nm and PDI less than 0.25. A reduction in diameter was observed with the incorporation of the drugs, with sizes smaller than 100 nm being observed. Selected nanocarriers were stable for 60 days and did not significantly reduce ($p < 0.93$) the viability of immortalized C6 cells in culture when used in concentrations up to 4 mg / mL for 24-96 h. Treatment with nanocarriers containing 1 and 7.5 μM of cisplatin and dexamethasone for 96 h reduced cell viability and IC50 by more than 8-fold than the combination of drugs in solution. Therefore, NEs containing the combination of cisplatin and dexamethasone showed greater cytotoxicity in our cell culture model, and our results are very promising and point to a potentially new therapeutic tool for treating GB.

Keywords: Cancer. Glioblastoma multiforme. Cisplatin. Dexamethasone. Nanoemulsions.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 14 milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer a cada ano, em sua maioria em países em desenvolvimento, de tal forma que o câncer é considerado umas das maiores causas de mortalidade com aproximadamente 9,6 milhões de mortes em 2018, superando outras doenças como HIV/AIDS, tuberculose e malária combinadas (WHO, 2019).

Câncer é um termo geral que descreve centenas de doenças, o qual pode ser definido de maneira simples como o crescimento anormal das células onde, por mutações, elas deixam de controlar seu processo de divisão, ou seja, proliferam agressivamente sem considerar limites de crescimento normais do tecido original ou do órgão, além de poder invadir outros tecidos. Em geral, o câncer atinge um tamanho mínimo de 1 cm ou é composto por ao menos de 1 milhão de células, antes de ser detectado, sendo chamado de “massa” tumoral. Há exceções como os linfomas e leucemias, que muitas vezes não formam tumores sólidos (RAY; JABLONS, 2009; ROY; SAIKIA, 2016).

O conceito de tumor vem sendo aprimorado e atualmente, entende-se que a massa tumoral seja um complexo de tecidos compostos de tipos celulares múltiplos e distintos que interagem de maneira heterotípica uns com outros. O microambiente tumoral também é importante para o crescimento e desenvolvimento do tumor. Este microambiente é composto pelas células cancerosas células endoteliais, pericitos, células do sistema imunológico tanto inato (incluindo macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células *natural killers* etc.) quanto adaptativo (como linfócitos T e B), fibroblastos associados ao câncer, assim como células tronco e progenitoras do estroma tumoral (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

De um modo geral, as células cancerígenas continuarão a se multiplicar a menos que haja alguma intervenção cirúrgica, tratamento farmacológico ou radioterapia. Todavia, há alguns casos onde as células tumorais regridem sozinhas, como em alguns melanomas ou certos tipos de câncer de rim (ROY; SAIKIA, 2016).

As mutações, que promovem as principais características do câncer, tais como

alta proliferação, mecanismos de evitar a apoptose, entre outras, podem ser de diversas origens, como pela herança genética na linhagem germinativa, causadas por fatores ambientais como radiação, substâncias químicas, ou infecções virais, ou podem surgir de forma espontânea. Além disso o estilo de vida, alimentação e a microbiota estão associados ao surgimento desta doença (ALBERTS et al., 2002; SCHWABE; JOBIN, 2013).

As células humanas possuem diversas maneiras de proteger o nosso organismo de células com mutações que podem potencialmente contribuir para o desenvolvimento de cânceres. Dentre elas, ressaltam-se: 1) alterações em diversos tipos de genes que podem contribuir para a tumorigênese. Estes podem ser classificados como oncogenes (como *MET* e *RET*), genes supressores de tumores (como *TP53* e *PTEN*) e genes de estabilidade genômica (como *BRCA1* e *BRCA2*) (VOGELSTEIN; KINZLER, 2004); 2) alterações epigenéticas como o aumento da metilação do DNA que resulta no silenciamento anormal de genes, além do posicionamento do nucleossomo que pode manter as células tumorais em constate estado de autorrenovação (AHUJA; SHARMA; BAYLIN, 2016); e 3) alterações transcricionais e pós transcricionais que podem influenciar na tradução, onde a função dos microRNAs e RNAs não codificantes estão em grande evidência, seja como um possível alvo terapêutico, como biomarcador ou até mesmo como uma ferramenta para prever prognósticos (ANASTASIADOU; JACOB; SLACK, 2018; GARZON; MARCUCCI; CROCE, 2010; KIM, 2017).

Além do controle genético, múltiplas vias de sinalização celular estão envolvidas no processo do desenvolvimento tumoral de diversos tipos de cânceres, tais como o da polipose adenomatosa familiar do cólon (*APC*), do oncogene associado ao glioma (*GLI*), do fator de transcrição induzível por hipóxia (HIF)-1, da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e dos receptores tirosina quinases (RTKs), dentre outros, o que pode delimitar qual terapia antitumoral será escolhida (HUNTER, 2000; VOGELSTEIN; KINZLER, 2004).

Ampliando então estes conceitos, Hanahan e Weinberg revisaram e propuseram as principais características do câncer, a saber: “autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais de inibição do crescimento (anticrescimento), evasão da morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada e invasão de tecido e metástase”

(HANAHAN; WEINBERG, 2000) – e, mais recentemente – “o desregulamento da energia celular, a maneira de evitar a destruição pelo sistema imune, a instabilidade genômica e mutações, assim como a inflamação promovida pelos tumores” (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Desta forma sabe-se que o câncer possui a habilidade de sustentar a proliferação celular crônica por meio da 1) autoprodução de ligantes de fatores de crescimento celular; 2) sinalização para o estroma estimulando as células normais a produzirem fatores de crescimento para as células tumorais; 3) alteração de receptores e/ou ativação de vias de sinalização de maneira independente dos fatores de crescimento, ou ainda 4) interrupção das vias de retroalimentação negativa que iria interromper a sinalização. Uma vez que os fatores de crescimento se ligam a receptores de superfície celular, usualmente contendo domínios intracelulares de tirosina-quinase, irão induzir o ciclo, crescimento, sobrevivência e metabolismo energético das células. Neste contexto, as mutações mais comuns são nas vias da MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos) e PI3K (BHOWMICK; NEILSON; MOSES, 2004; CHENG et al., 2008; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Ademais, quando se fala sobre a patologia do câncer, a via de p53 é muito importante. Esta proteína citoplasmática é codificada pelo gene *TP53* e tem como sua principal função a regulação do ciclo celular. Sua importância se dá pois esta via é ativada principalmente por danos ao DNA (ácido desoxirribonucleico), que culmina em reparo do DNA, apoptose, senescência, inibição de angiogênese e metástase, ou interrupção do ciclo celular (HARRIS; LEVINE, 2005; VAZQUEZ et al., 2008); além do fato que esta via encontra-se alterada na grande maioria dos cânceres, o que contribui no agravamento destas doenças (OZAKI; NAKAGAWARA, 2011).

Não obstante, os tumores também possuem a capacidade de evadir os supressores de crescimento. Muitos deles apresentam modificações em vias como a do gene supressor tumoral do retinoblastoma (*RB*) e p53, o que permite então sua proliferação contínua (GOODRICH, 2006; VAZQUEZ et al., 2008).

Os tumores adquiriram também a capacidade de resistir à morte celular, por meio da perda da função de supressão tumoral do *TP53*, do aumento de fatores anti-apoptóticos da família BCL2 como *BCL2* e *BCL2L1* (bcl-xL), ou de fatores de sobrevivência (como IGF 1/2); também por diminuir fatores pró-apoptóticos *BAX*, bim

(*BCL2L11*), puma (*BBC3*) (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011), ou ainda por interromper a via de morte induzida pelos ligantes extrínsecos como no caso de CD95 (Fas/APO-1) e seu ligante, CD95L (PETER et al., 2015).

A angiogênese tumoral é importante para aumentar aporte sanguíneo e, consequentemente, a nutrição e crescimento do tumor; desta maneira, as células tumorais fazem uso de estratégias para aumentar esta atividade, aumentando os ativadores ou diminuindo fatores inibidores de angiogênese. Desta forma, no câncer, usualmente estão aumentados os membros da família de fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF), como *VEGFA*, fator de crescimento básico de fibroblasto (bFGF / *FGF2*), angiogenina, fator de transformação do crescimento (TGF)-α, TGF-β, ou fatores liberados por células imunes como o fator de necrose tumoral (TNF)-α e interleucinas; e estão diminuídos os fatores inibidores de angiogênese, como angiostatina, endostatina, interferon, fator plaquetário IV, trombospondina, fragmento de prolactina de 16 kDa e inibidor de tecido de metaloproteinase-1, -2 e -3 (NISHIDA et al., 2006).

Ao que tange a vascularização tumoral, é importante ressaltar também o efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (do inglês *Enhanced Permeability and Retention*, ou EPR), que consiste em uma elevada permeabilidade vascular e pouca drenagem linfática, o que muitas vezes é utilizado como padrão ouro para o sistema de entrega de diversos agentes nanoterapêuticos nos tumores sólidos (MAEDA et al., 2000).

Para manter sua replicação constante, as células tumorais mantem altos níveis metabólicos, muitas vezes reprogramando seu metabolismo como no conhecido “efeito de Warburg” ou também conhecido como glicólise aeróbica, que consiste em transformar a glicose em lactato mesmo na presença de oxigênio. Embora o lactato forneça menos energia que o oxigênio, a glicólise aeróbica é um processo mais rápido que a glicólise usual. (DEBERARDINIS; CHANDEL, 2016; VANDER HEIDEN; DEBERARDINIS, 2017).

O aumento de lactato também contribui para uma das principais características dos tumores sólidos, que é o pH (potencial de hidrogênio) ácido do microambiente extracelular tumoral. O lactato pode funcionar como um mediador inflamatório intrínseco que aumenta a produção de interleucina (IL)-17A por células T e

macrófagos, resultando na promoção da inflamação crônica em microambientes tumorais. O lactato pode também inibir a ativação das células dendríticas. Além disso, transportadores de Na^+/H^+, co-transportador H^+-lactato e a bomba de prótons H^+-ATPase contribuem para esta característica. Este pH extracelular ácido não apenas ativa enzimas lisossômicas, como também induz a expressão de certos genes de fatores pró-metastáticos por meio de uma cascata de sinalização intracelular. Devido esta característica, muitas nanopartículas sensíveis ao pH, tumor-dirigidas, tem sido desenvolvidas, apresentando melhor eficácia e menos efeitos adversos (KATO et al., 2013; NA; YOU, 2002; SHENOY et al., 2005).

Dentre os processos de carcinogênese, um ponto importante para o prognóstico do paciente é a metástase, que seria a capacidade do câncer em invadir outros tecidos. O estadiamento patológico da metástase é descrito primeiramente pelo tamanho e a invasão local de um tumor primário, depois metástase para os gânglios linfáticos e, por último, metástases distais. A metástase é um processo extremamente complexo, envolto de mecanismos genéticos e/ou epigenéticos, mas altamente ineficiente, já que apenas uma pequena fração de células tumorais são realmente capazes de metastatizar completamente (RAY; JABLONS, 2009). O processo de metástase pode ser dividido em: invasão local, intravasamento nos vasos sanguíneos e linfáticos circundantes, extravasamento (em outros tecidos), micrometástase (formação de pequenos nódulos de células cancerígenas) e colonização (HANAHAN; WEINBERG, 2011; RAY; JABLONS, 2009).

O processo de metástase depende de diversos fatores, tais como a perda de E-caderina, que é muito importante para a aderência célula-célula, assim como da P-caderina, além do aumento da N-caderina mesenquimal, que está possivelmente envolvida no processo de migração celular e invasividade. A superexpressão de repressores da E-caderina, como Snail, Slug, Zeb1, ocorre no processo de metástase e há evidências que eles possam induzir a N-caderina (BERX; VAN ROY, 2009).

Desta forma, visando o processo de metástase, é importante ressaltar a transição epitélio mesenquimal (EMT, do inglês *epithelial-mesenchymal transition*) que, sucintamente, é um processo biológico normal que está alterado em diversos tipos de tumores. A EMT permite que uma célula com fenótipo epitelial assuma um fenótipo mesenquimal, que consistirá no aumento da capacidade migratória, invasividade, além de resistência à apoptose elevada. O processo de EMT acontece

de forma natural, ou seja, não patológica, em casos como durante a implantação, embriogênese, desenvolvimento de órgãos e regeneração tecidual. Todavia, no câncer, esta diferenciação pode ocorrer devido a alterações genéticas que permitirão às células adquirirem o fenótipo mesenquimal e consequentemente, à disseminação metastática, o que implica em um tipo maligno de tumor e maus prognósticos (KALLURI; WEINBERG, 2009).

1.2 Glioblastomas

Conforme já exposto, o câncer consegue de diversas formas desenvolver e manter a sua patogenicidade; e muitos são os tipos de cânceres. Os mais comuns são câncer de mama, pulmão e brônquios, próstata, cólon, melanomas, corpo uterino e linfomas (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017; INCA, 2016), todavia, os tumores cerebrais carregam maus prognósticos, sendo o pior deles os glioblastomas (STUPP et al., 2010).

Segundo a estimativa 2016/2017 do INCA,

> o número de casos novos de câncer do Sistema Nervoso Central (SNC) estimado para o Brasil em 2016 foi de 5.440 casos em homens e de 4.830 em mulheres. O câncer do sistema nervoso central em homens é o oitavo mais frequente nas regiões Nordeste e Sul. Ocupa a 10ª posição na região Norte e na região Centro-Oeste. Na região Sudeste é o 11º mais frequente. Para as mulheres é o sexto mais frequente na região Sul, e oitavo mais frequente na região Centro-Oeste. Na região Norte ocupa a 10ª posição. Enquanto nas regiões Sudeste e Nordeste é o 11º (INCA, 2016).

Dentre os cânceres do SNC, estão os gliomas, que compreendem os glioblastomas (GB), os astrocitomas anaplásicos, os oligoastrocitomas anaplásicos mistos e os oligodendrogliomas anaplásicos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), os gliomas são classificados como baixo grau (I / II) e alto grau (III / IV). Os glioblastomas, também chamados de glioblastomas multiforme (grau IV) são os mais comuns (de 60 à 70%) e agressivos dentre os tumores cerebrais primários em adultos, caracterizados pelo crescimento rápido, alta invasão, alta taxa de recorrência pós-remoção cirúrgica e resistência à radio e quimioterapia (LOUIS et al., 2007; STUPP et al., 2010; WEN; KESARI, 2008). Devido à localização no cérebro, sua agressividade e baixo tempo de sobrevivência, o GB é considerado uma das formas mais letais de câncer (ARVOLD et al., 2014).

Os sintomas mais frequentes dos gliomas em geral, principalmente nas fases mais avançadas da doença são: sonolência e/ou perda progressiva de consciência, disfagia (dificuldade de deglutição), déficit neurológico focal progressivo, convulsões, incontinência urinária, déficit cognitivo progressivo (perda de memória, mudanças de personalidade, apatia e problemas no funcionamento e no entendimento executivo), cefaleia, confusão/agitamento e dor corporal. Outros sintomas também podem aparecer como fadiga, náusea e vômitos, dispneia, constipação, e sintomas de ansiedade e/ou depressão (SIZOO et al., 2010).

A incidência dos GB varia de 3 a 5 por 100.000 em média, sendo crescente conforme a idade, de 0,15 por 100.000 em crianças até 15,03 por 100.000 em pacientes com idade entre 75-84 anos. As taxas de sobrevivência diminuem conforme a idade, sendo que apenas 5% dos pacientes diagnosticados com GB sobrevivem após 5 anos do diagnóstico, mas esta taxa diminui para 2% em pacientes com 65 anos ou mais (STUPP et al., 2010; WIRSCHING; GALANIS; WELLER, 2016).

Agravando ainda mais este quadro, o GB possui diversos mecanismos bioquímicos, genéticos e epigenéticos de promover a EMT, contribuindo decisivamente para um mau prognóstico desta doença (IWADATE, 2016).

Pouco se sabe sobre os fatores de risco envolvidos em GB além da idade, todavia, sabe-se que homens são mais afetados que as mulheres, assim como brancos são mais afetados que negros. A irradiação ionizante do cérebro é o único fator de risco exógeno reconhecido para o desenvolvimento do GB, porém há evidências, ainda que poucas, que o citomegalovírus (WIRSCHING; GALANIS; WELLER, 2016) e o uso de celulares (HARDELL et al., 2007) podem aumentar o risco de desenvolvimento de gliomas.

O projeto “The Cancer Genome Atlas” (TCGA) propôs 4 subtipos de GB separados por diferentes tipos de anormalidades genéticas e pelas características clínicas dos pacientes, denominados pró-neural, neural, clássico e mesenquimal (VERHAAK et al., 2010).

Assim como os demais tumores, o GB é um tumor heterogêneo, composto por diferentes células com diferentes mutações. Muitas são as alterações genéticas encontradas, tais como: 1) desregulação da sinalização do fator de crescimento por amplificação e ativação mutacional de genes de RTK, seja por ativação do receptor

do fator de crescimento epidérmico (EGFR; 40-50%), do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas α (PDGFRA; cerca de 15%), ou do receptor do fator de crescimento de hepatócitos (HGFR, cerca de 5%); 2) ativação da via da PI3K, ou ainda 3) a inativação de supressores tumorais como p53 e RB. Estudos realizados pelo projeto TCGA revelaram alterações significantes, incluindo deleções homozigóticas nos genes da neurofibromatose tipo 1 (*NF1*) e *Parkin* RBR E3 *ubiquitin protein ligase* (PARK2 / *PRKN*) e amplificações no gene da RAC-gama serina / treonina proteína quinase (*AKT3*). Revelou-se também perda de heterozigosidade, com a região mais significativa sendo 17p contendo *TP53*. Encontrou-se também alterações da via RB (*RB1*, *CDK4* e *CDKN2A*), e da via PI3K (*PIK3CA*, *PIK3R1*, *PTEN* e *IRS1*). Outros estudos encontraram mutações nos genes *EGFR*, aparecendo ampliado em até 95% dos pacientes; isocitrato desidrogenase-1 (*IDH1*), principalmente em pacientes jovens com GB, o que foi associado a um bom prognóstico (EDER; KALMAN, 2014; SZERLIP et al., 2012).

Outra classificação para os GB foi proposta, principalmente com o advento das novas técnicas de imuno-histoquímica e marcadores genéticos, sendo então identificados como glioblastoma primário e secundário. As principais características dos GB primários são aumento de *EGFR*, mutação em *PTEN* e perda completa do cromossomo 10; já nos GB secundários, as principais características são perda de 19q e mutações em TP53 e perda de 19q e mutação em IDH1, sendo este último o principal marcador que diferencia os GB. Os GB primários possuem origem astrocítica, enquanto os GB secundários provem de um astrocitoma difuso de baixo grau ou de um astrocitoma anaplásico (OHGAKI; KLEIHUES, 2013).

A maioria das progênies de células iniciadoras de glioma apresentam características de astrócitos, mas foi observada a diferenciação em células endoteliais funcionais e pericíticas, portanto é considerado a heterogeneidade das células progenitoras e formadoras dos GB. Uma subpopulação de células de GB denominada “iniciadoras do glioma” (também chamadas de células tronco-semelhantes de glioma) compartilha várias características com células tronco e progenitoras neurais (NSPC), incluindo a localização em nichos perivasculares e hipóxicos. As células iniciadoras do glioma parecem participar ativamente no crescimento, angiogênese, invasão e resistência à radio e quimioterapias (WIRSCHING; GALANIS; WELLER, 2016).

Os astrócitos possuem diversas funções no sistema nervoso central (SNC), como sinaptogênese, neurotransmissão, regulação trófica e formação de barreira hematoencefálica, inclusive os transportadores de glutamato GLT1 (*SLC1A2*) e GLAST (*SLC1A3*), envolvidos na modulação das neurotransmissões e impedindo a excitotoxicidade, são utilizados como marcadores para diferenciar os dois tipos de astrócitos, pois em adultos há expressão de GLT1 no córtex, áreas de matéria cinzenta do hipocampo e medula espinhal, enquanto GLAST é expresso no cerebelo, giro dentado do hipocampo e medula espinhal. (CHABOUB; DENEEN, 2013).

Além dos receptores glutamatérgicos, os astrócitos também possuem receptores GABAérgicos, adrenérgicos, purinérgicos, serotoninérgicos, muscarínicos e peptidérgicos (PORTER; MCCARTHY, 1997). Receptores glicocorticoides (GR) também foram encontrados elevados nas células periféricas de GB (ELLEMANN et al., 1988), o que pode explicar o potencial citotóxico de glicocorticoides sintéticos, tais como a dexametasona, para o tratamento desta neoplasia (KAUP et al., 2001; ZIBERA et al., 1992).

Usualmente o diagnóstico dos GB é feito por imagem por meio de ressonância magnética. Seu tratamento se dá por remoção cirúrgica / biopsia, seguido de rádio e quimioterapia, e terapia com altas doses de corticosteroides para diminuir o edema cerebral, o qual caracteriza um importante sintoma nestes pacientes (STUPP et al., 2010; WIRSCHING; GALANIS; WELLER, 2016). Contudo o GB ainda é considerado incurável por muitos autores (ALDAPE, K., ZADEH, G., MANSOURI, 2015).

Mesmo assim, novas formas de diagnósticos para gliomas e GB estão sendo estudadas e aprimoradas, sejam por marcadores epigenéticos ou moléculas circulantes, como o DNA tumoral circulante (ctDNA) e microRNAs (miRNAs) que são considerados relativamente estáveis no plasma e soro (BEST et al., 2015).

1.3. Tratamento de GB: dificuldades e alternativas farmacológicas

Dentre os antineoplásicos mais utilizados para o tratamento de GB estão a cisplatina e a temozolomida, fármacos com baixa toxicidade seletiva para o paciente e efeitos colaterais bastante severos (WANG et al., 2017). Além disso, como já mencionado, o aumento na expressão de GR nas células periféricas de GB (ELLEMANN et al., 1988), indica o potencial citotóxico de glicocorticoides sintéticos,

tais como a dexametasona, para o tratamento desta neoplasia (KAUP et al., 2001; ZIBERA et al., 1992).

A terapia antitumoral, seja por quimioterapia ou radioterapia, pode induzir à morte por necrose, o que por sua vez induzirá a inflamação local, contribuindo para a regeneração do tecido lesionado. Esta inflamação possui um resultado ambíguo, pois por um lado pode promover o crescimento tumoral, assim como a necrose que acompanha o crescimento rápido do tumor, provavelmente pela liberação de fatores pró-inflamatórios que podem contribuir para angiogênese, proliferação das células tumorais e invasividade. Por outro lado esta inflamação pode melhorar a resposta imune antitumoral (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

Quanto a terapia antitumoral, novas abordagens têm sido introduzidas nos protocolos padrões de tratamento e os conceitos como a de medicina personalizada e medicina de precisão têm ganhado bastante atenção. A medicina personalizada visa uma abordagem mais individualizada do paciente, verificando suas alterações genéticas, por exemplo. Já a medicina de precisão visa atender subpopulações distintas a fim de melhorar sua terapia ao considerar hábitos alimentares, estilo de vida, entre outros exemplos (KIM, 2017; SCHORK, 2015; WEIL, 2018).

Idealmente, além de apresentar efeitos adversos menos pronunciados, os agentes antineoplásicos devem superar as barreiras fisiológicas como a barreira hematoencefálica (BHE) (WEIDLE; NIEWOHNER; TIEFENTHALER, 2015). A BHE é uma barreira que impede o influxo da maioria dos compostos do sangue ao cérebro, permitindo um controle homeostático estável do SNC, que é essencial para a atividade cerebral normal. É composta por células endoteliais, terminações de astrócitos e pericitos. Possui junções ocludentes presentes nas células endoteliais, composta por claudinas, ocludinas e moléculas de adesão juncional, além de proteínas citoplasmáticas acessórias, que seletivamente impede o transporte da maioria de substâncias do sangue para o SNC. As células endoteliais também são envoltas por uma matriz extracelular especializada e por uma membrana basal composta por colágeno tipo IV, fibronectina, laminina, tenascina e proteoglicanos, além de sistemas de transportes.

Para transpor a BHE, uma molécula deve apresentar requisitos como lipofilicidade – muitas vezes relacionado ao coeficiente de partição octanol / água –

que facilitará sua difusão passiva e massa molecular inferior a 500 Da. Ainda que em algumas doenças ou quadros clínicos ocorra maior permeabilidade da BHE, como em casos de infecção por HIV (vírus da imunodeficiência humana), encefalopatia séptica, ou até na presença de tumores cerebrais, a baixa permeabilidade em geral da BHE é uma dificuldade para o tratamento de doenças no SNC (BALLABH; BRAUN; NEDERGAARD, 2004; LAQUINTANA et al., 2009; SERLIN et al., 2015; WEIDLE; NIEWOHNER; TIEFENTHALER, 2015).

1.3.1. Cisplatina

A cisplatina é um composto de platina com geometria planar quadrada, com fórmula molecular $Pt(NH_3)_2Cl_2$ e massa molecular de aproximadamente 300 g/mol; também chamada de cis-diaminodicloroplatina (II). Possui baixa solubilidade em água e é um agente antineoplásico citotóxico utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer. Foi primeiramente sintetizada por M. Peyrone em 1844 e sua estrutura química foi determinada por Alfred Werner em 1893; todavia foi na década de 1960 que Barnett Rosenberg e colaboradores perceberam o potencial de compostos de platina na inibição de divisão celular em bactérias *Escherichia coli*, levantando a hipótese que este composto poderia ser utilizado na quimioterapia antitumoral. Em 1978 o primeiro composto de platina foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para fins de tratamento antineoplásico (DASARI; TCHOUNWOU, 2015).

A estrutura molecular da cisplatina é formada por um átomo de platina central, rodeado por dois átomos de cloro e dois grupos de amônia em uma configuração *cis* (figura 1). Os outros compostos de platina se assemelham por possuir o núcleo de platina rodeado por grupamentos na posição *cis* (BARABAS et al., 2008).

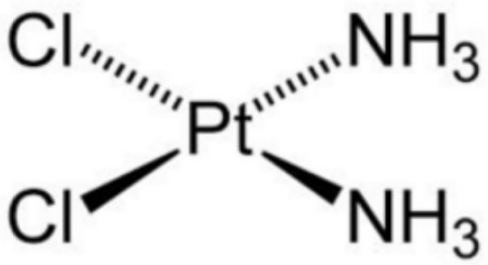

Figura 1. **Estrutura química da cisplatina.** (adaptado de DASARI; TCHOUNWOU, 2015).

Embora a cisplatina apresente alta taxa de ligação às proteínas plasmáticas, (aproximadamente 90%), na célula, ela costuma ser encontrada no citosol e não ligada a proteínas. Inicialmente distribuída para todos os tecidos, mas na primeira hora, tende a se acumular no rim, fígado, músculo e pele. Apresenta tempo de meia vida plasmática de 20 a 30 minutos, *clearence* de 15 a 16 L/h/m^2 e volume de distribuição aparente entre 11 e 12 L/m^2. Os complexos entre a albumina e a platina da cisplatina não se dissociam de forma significativa, e por isso, após 6 horas de perfusão intravenosa de cisplatina em pacientes com função renal normal, o composto é lentamente eliminado com uma meia-vida mínima de três dias ou mais, sendo encontrados níveis de platina plasmáticos até 12 dias depois da administração. É eliminada preferencialmente pela urina na sua forma primária ou o seu produto hidrolisado citotóxico, o íon cis-diaminoaquacloroplatina (II) (complexo monohidratado, figura 2) (ANDERSSON et al., 1996; BARABAS et al., 2008; BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, 2010), possui o pKa em torno de 6 e logP -2 (ANDERSSON et al., 1994; BERNERS-PRICE et al., 1992; WILSON; LIPPARD, 2012).

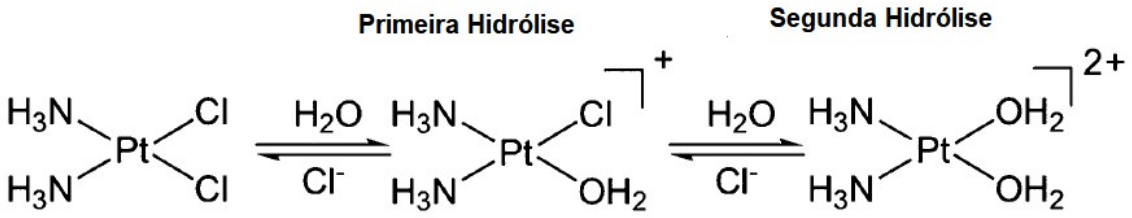

Figura 2. Hidrólise da cisplatina (adaptado de LAU; ENSING, 2010).

Embora amplamente utilizada, a cisplatina apresenta diversos efeitos adversos sistêmicos, principalmente a nefrotoxicidade, além de hipocalemia, hipomagnesemia, toxicidade gastrintestinal, mielossupressão, cardiotoxicidade, ototoxicidade, neurotoxicidade e síndrome da secreção inapropriada de hormônio antidiurético (SIADH). A nefrotoxicidade da cisplatina é dose- e tempo-dependente e é aumentada pelo uso concomitante de outros agentes nefrotóxicos e/ou vômitos induzidos pela cisplatina, que por sua vez, fazem com que o paciente perca ainda mais líquidos. A área mais afetada do rim é o túbulo proximal, o qual sofre necrose e apoptose devido a administração de cisplatina (BARABAS et al., 2008; DASARI; TCHOUNWOU, 2015), pois a concentração de cisplatina nas células epiteliais do túbulo proximal é cerca de

5 vezes maior que a concentração sérica (KUHLMANN; BURKHARDT; KÖHLER, 1997).

Assim que entra na célula, a cisplatina é ativada ao trocar seus átomos de cloro por moléculas de água (figura 2) pois o ambiente intracelular possui menor gradiente de cloro que o extracelular. Este produto hidrolisado é um potente eletrófilo que pode reagir com qualquer nucleófilo, o que inclui átomos doadores de nitrogênio no DNA e RNA, assim como grupos sulfidrila em proteínas e a glutationa, entre outros. Primeiramente este produto se liga ao DNA, preferencialmente às bases púricas (adenina e guanina) ao ligar-se ao centro reativo N7 (figura 3.A), bloqueando a divisão celular, a transcrição e outras funções nucleares, resultando em morte por apoptose. A conformação *cis* da cisplatina permite ligações cruzadas 1,2 ou 1,3-intrafita entre resíduos de guanina com a cisplatina (figura 3.B), sendo esta a principal característica nas mudanças do DNA. Todavia a cisplatina pode se ligar a dois sítios na mesma cadeia de DNA, mas em fitas distintas (interfita) (BARABAS et al., 2008; BOULIKAS; VOUGIOUKA, 2003; DASARI; TCHOUNWOU, 2015).

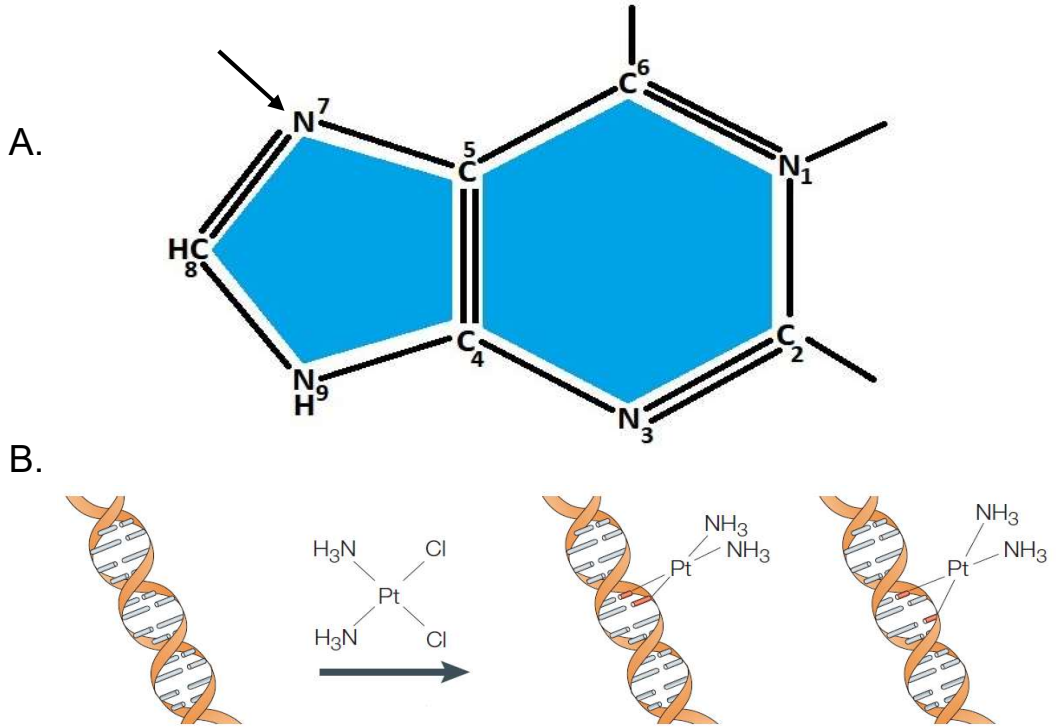

Figura 3. **Formação dos adutos de cisplatina. A.** Estrutura química geral das purinas, onde o centro reativo N7 está evidenciado com a seta. **B**. Ligação intrafita da cisplatina ao DNA (adaptado de (WANG; LIPPARD, 2005).

Uma vez ligada ao DNA, a cisplatina impede o ciclo celular principalmente na fase G2/M, via p53, ao ativar as quinases ATM (proteína Ataxia Telangiectasia Mutada) e ATR (proteína relacionada a ATM e Rad3), que irão fosforilar e ativar a p53.

A p53 ativada, por sua vez induzirá a apoptose mitocondrial dependente da família Bcl-2 (SHARMA et al., 2018; SIDDIK, 2003).

Resumidamente, o dano ao DNA estimula a via intrínseca da apoptose, resultando na liberação do citocromo-c da mitocôndria, ativando a caspase iniciadora 9, que por sua vez ativará a caspase executora 3, que culminará em uma cascata de eventos, tais como: ativação de endonucleases que resultará em degradação do DNA cromossomal, ativação de proteases e consequente degradação das proteínas nucleares e do citoesqueleto, condensação da cromatina e citoplasma, fragmentação nuclear e por fim, formação dos corpos apoptóticos (ELMORE, 2007).

A cisplatina também induz a formação de espécies reativas de oxigênio que desencadeiam a morte celular além do dano do DNA. A mitocôndria é o alvo principal para o estresse oxidativo induzido por cisplatina, resultando em perda do grupo sulfidrila da proteína mitocondrial, inibição da absorção de cálcio e redução do potencial da membrana mitocondrial, além do o esgotamento da glutationa antioxidante, sendo assim capaz de mudar o equilíbrio redox celular (BOULIKAS; VOUGIOUKA, 2003; DASARI; TCHOUNWOU, 2015; DUGBARTEY; PEPPONE; DE GRAAF, 2016).

1.3.2 Dexametasona e glicocorticoides

A terapia combinada com glicocorticoides (GC) para o tratamento de edemas associados a tumores cerebrais tem sido utilizada há décadas (DIETRICH et al., 2011).

Os GC são hormônios esteroides polifuncionais produzidos e liberados pelo córtex da glândula suprarrenal e desempenham vastos efeitos fisiológicos essenciais para a vida, como efeitos metabólicos, anti-inflamatórios, crescimento esquelético, função cardiovascular, reprodução e cognição. O controle endógeno dos GC é feito pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA, do inglês *hypothalamic-pituitary-adrenal*). Seu uso clínico é principalmente baseado em suas propriedades imunossupressoras e anti-inflamatórias (BECKER, 2013; OAKLEY; CIDLOWSKI, 2013).

Uma das principais características da inflamação é o aumento da vascularização, que por sua vez culminará em alguns dos sinais mais proeminentes da inflamação como rubor, edema e calor (BECKER, 2013).

Neste contexto, GC sintéticos têm sido utilizados, desde a década de 1950, no tratamento anti-inflamatório e no controle de edemas, principalmente nos casos de tumores cerebrais. Dentre eles, podemos mencionar a dexametasona, que foi primeiramente sintetizada em 1958 e, até o momento, continua sendo o fármaco de escolha para tumores cerebrais, principalmente pelo baixo índice de retenção de sódio e água em comparação aos outros corticosteroides (DIETRICH et al., 2011).

Apesar do grande uso dos GC sintéticos na clínica – como no tratamento de doenças como asma, alergia, artrite reumatoide e até para leucemias, linfomas e mielomas – seu uso é limitado em decorrência de seus diversos efeitos adversos, tais como "osteoporose, atrofia da pele, diabetes, obesidade abdominal, glaucoma, retardo de crescimento em crianças e hipertensão" (OAKLEY; CIDLOWSKI, 2013).

Os GC difundem-se através da membrana plasmática e se ligam a receptores de glicocorticoides (GR, do inglês *glucocorticoid receptor*) citosólicos, os quais são expressos em quase todas as células do corpo. Após a ligação e formação de um complexo com o receptor, o complexo GC-GR sofre dimerização e é transportado para o núcleo, onde se liga aos sítios GRE (do inglês *glucocorticoid-responsive elements*) na região promotora dos genes alvos, cuja transcrição poderá ser aumentada ou inibida, dependendo dos fatores locais (OAKLEY; CIDLOWSKI, 2013; RHEN; CIDLOWSKI, 2005).

Além de sua ação GRE-dependente, os GC, ao se ligarem aos GR, podem modular a atividade de outros fatores de transcrição, alterando a expressão de genes que não apresentam sítios GRE em suas sequências. Por exemplo, o complexo GC-GR no núcleo pode interagir com os fatores de transcrição pró-inflamatórios AP1 (do inglês *activator protein 1*) e NF-κB (do inglês *nuclear factor Kappa B)*, de forma a antagonizar suas atividades, pois o GR se liga diretamente à subunidade Jun do AP1e à subunidade p65 do NF-κB, interferindo assim na atividade transcricional de ambos. Esta forma é considerada o mecanismo primário pelos quais os GC regulam a inflamação (OAKLEY; CIDLOWSKI, 2013).

Além disso os GC podem inibir a produção de prostaglandinas – essencial para o processo inflamatório – de várias maneiras: ao induzir e ativar a anexina I, induzir a fosfatase 1 da via das MAPK e pela repressão da transcrição da ciclooxigenase 2. Anexina I é uma proteína anti-inflamatória que interage e inibe a fosfolipase $A_2\alpha$

citosólica, desta forma bloqueia a liberação de ácido araquidônico e sua posterior conversão em eicosanoides (como prostaglandinas, prostaciclinas tromboxanos e leucotrienos). A fosfatase 1 é uma inibidora das vias de sinalização da quinase N-terminal c-Jun (JNK) e p38 da MAPK, que podem contribuir para a expressão de mediadores inflamatórios. Por fim, outra maneira de inibir a inflamação pelos GC, está na diminuição de RNAm de genes de proteínas inflamatórias, tais como a ciclooxigenase 2 e o VEGF (CLARK; LASA, 2003; RHEN; CIDLOWSKI, 2005).

Além das propriedades anti-inflamatórias citadas acima, os GC, em altas doses, podem induzir morte celular, por autofagia ou apoptose, seja por desfosforilar a enzima Akt, da via da PI3K, pela indução de fatores pró-apoptóticos como Bax e Bim, ou redução de fatores anti-apoptóticos como bcl-2 e bcl-xl (LAANE et al., 2009; RHEN; CIDLOWSKI, 2005; WU et al., 2013).

A dexametasona pertence à classe dos anti-inflamatórios esteroidais ou também chamados de glicocorticoides ou corticosteroides, é um análogo sintético do cortisol, que possui fórmula molecular $C_{22}H_{29}FO_5$, massa molecular em torno de 392 g/mol, é considerada de 25 a 30 vezes (aproximadamente) mais potente que o cortisol, sendo comercializado na forma de pós, comprimidos, soluções, pomadas, cremes, aerossóis orais e intranasais. Possui a habilidade de penetrar o SNC e não possui as propriedades de retenção de sal de outros hormônios adrenais relacionados. Possui volume de distribuição aparente de 2 L/Kg; meia-vida de 1,88 a 2,23 horas; pKa de 12,42; logP entre 1,68 e 1,93; excreção em larga escala pelos rins, mas também ocorre na bile em menor proporção (PUBCHEM; ANVISA).

Apesar da terapia com temozolomida ou cisplatina combinada aos GCs, da remoção cirúrgica e radioterapia serem o padrão ouro para a terapia antineoplásica no tratamento de GB, os casos de falhas terapêuticas, recidiva elevada e mau prognóstico são muito relatados. Portanto, a otimização terapêutica com os objetivos de diminuir os efeitos adversos e melhorar a entrega dos fármacos é mandatória e a utilização de nanocarreadores como ferramentas farmacológicas devem ser considerada nesse cenário (CHAREST et al., 2012; DOBELBOWER et al., 2011; EBLAN; WANG, 2013; HUANG et al., 2008; WELLER et al., 2013).

1.4 Nanotecnologia e nanoemulsões

A nanotecnologia visa fabricar, manipular, caracterizar e assim aplicar estruturas que ao menos uma de suas dimensões encontra-se em escala nanométrica, ou seja, um milionésimo de milímetro, as quais apresentam propriedades únicas que muitas vezes não são encontradas na escala macro. (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007).

O prefixo “nano” deriva da palavra grega designada para anão. Atribui-se ao físico Richard Feynman a introdução da ideia de manipulação da matéria na nanoescala em 1959, em sua palestra intitulada “There’s plenty of room at the bottom”. Mas o termo “nanotecnologia” só foi cunhado em 1974 pelo pesquisador Norio Taniguchi, da Universidade de Tóquio, para se referir a engenharia de materiais na faixa nanométrica (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007).

Desde então, diversos eventos se sucederam no campo da nanotecnologia e uma das subáreas criadas foi a da nanomedicina, que envolve a utilização de nanoestruturas para monitorar e reparar sistemas biológicos em nível molecular (YANG, 2010).

O sistema de entrega de fármacos para os diferentes compartimentos do corpo humano enfrenta diversas dificuldades, assim como inflamação inespecífica, efeitos adversos aumentados, uma baixa liberação controlada dos fármacos e baixa especificidade nos sistemas de administração. Uma solução para este problema é uma entrega eficiente e específica, dentre eles, estão inseridas as nanopartículas, a fim de promover transportadores personalizados. Além disso, as nanopartículas podem aumentar a potência e diminuir os efeitos indesejados e outros efeitos adversos dos medicamentos; como no caso do tratamento do câncer, as nanopartículas podem ser capazes de aumentar o acúmulo e a liberação controlada de agentes farmacologicamente ativos no microambiente tumoral, melhorar a eficácia terapêutica e diminuir a intensidade dos efeitos adversos nos tecidos saudáveis. Podem também, potencialmente, aumentar a proteção dos fármacos, evitando sua degradação, imunogenicidade inespecífica e pode levar a um EPR elevado (JURJ et al., 2017).

Desta forma foram criados nanocarreadores como lipossomos, dendrímeros, *quantum dots*, micelas poliméricas, nanopartícula de óxido de ferro etc., a fim de diagnóstico ou tratamento das mais diversas doenças (YANG, 2010). Na área

farmacológica, as nanopartículas são utilizadas para encapsular e/ou carrear os fármacos e, devido seu tamanho, são capazes de atravessar barreiras biológicas ou facilitar o transporte através delas e promover direcionamento ao tecido alvo (VIEIRA; GAMARRA, 2016).

A partir disso, na farmacologia, tenta-se cada vez mais melhorar o sistema de entrega das nanopartículas nos seus alvos biológicos e, consequentemente, a entrega dos fármacos. Um desafio dos maiores desafios do campo é promover a transposição da BHE (OLIVIER, 2005).

Dentro deste contexto, uma abordagem promissora no tratamento de câncer estão as nanoemulsões (NE)s, que são nanocarreadores multifuncionais capazes de aumentar o potencial de liberação dos agentes citotóxicos, portanto, melhorando o tratamento do câncer, aumentando o tempo e a qualidade de vida do paciente (PANDEY et al., 2018). NE pode ser definida como uma dispersão de líquidos imiscíveis, no qual gotículas em nanoescala de um líquido estão dispersas em outro, e são estabilizadas por agentes tensoativos. As nanoemulsões, assim como as emulsões em grande escala, podem ser óleo em água (O/A), ou água em óleo (A/O). No caso de NE O/A (figura 4), o núcleo lipofílico apolar pode ser constituído por substâncias apolares como mono-, di- ou triglicerói s (GANTA et al., 2014).

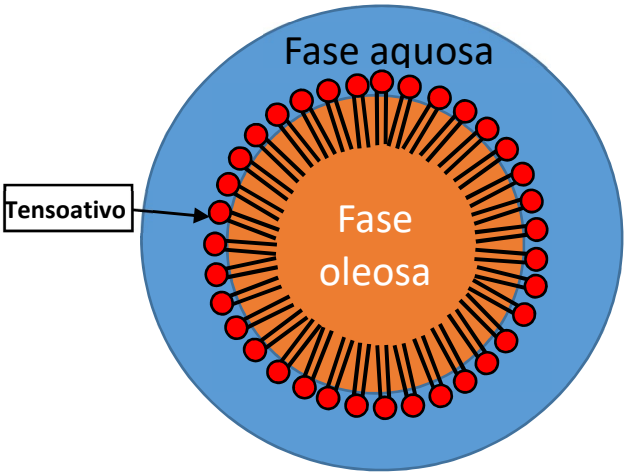

Figura 4. Nanoemulsão. Esquema exemplificando o arranjo interno de um sistema de nanoemulsão óleo em água (O/A).

Muitos são os atributos que podem ser conferidos às NEs, tais como tamanhos variados, cargas de superfície, estabilidade a longo prazo, circulação sanguínea prolongada, habilidade de se ligar a alvos específicos. Modificações podem ser

realizadas para superar barreiras anatômicas e fisiológicas, ou simplesmente servir como veículo para a entrega de fármacos para sítios específicos. NEs são utilizadas geralmente para carrear fármacos de propriedades físico-químicas diversas, incluindo compostos lipofílicos, tais como a dexametasona, anfotericina B, ou até as vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), de modo que melhore a solubilidade e biodisponibilidade, além de promover proteção contra a degradação enzimática e hidrólise. Quanto ao seu tamanho, idealmente, nanocarreadores devem ser maiores que 10 nm para evitar a rápida filtração renal e menores que 100 nm, para dificultar o reconhecimento por células fagocitárias mononucleares. Já em relação especificadamente às NEs, o tamanho deve ser menor que 200 nm, ter carga próxima à neutralidade ou, preferencialmente aniônicas, pois estudos evidenciam que essa característica evita a depuração e assim, aumenta o tempo de circulação. A superfície das NEs são usualmente recobertas com polímeros hidrofílicos como PEG (polietilenoglicol), poloxamers ou poloxaminas, a fim de aumentar o tempo de circulação ao evitar adsorção de proteínas plasmáticas e reconhecimento das células fagocitárias mononucleares (BHASKAR et al., 2010; GANTA et al., 2014).

Além de recobrir com polímeros, podemos usar de metodologias para criar nanopartículas sítio-dirigidas, com componentes que reconheçam um órgão, tecido, célula ou até uma organela intracelular. No caso de câncer, é usualmente utilizado componentes, para ter como alvo transferrina, VEGF ou seu receptor VEGFR e EGFR que estão geralmente superexpressos (HSIEH et al., 2012; MULIK et al., 2010; SHI et al., 2015).

Outro ponto importante de se considerar no processo de delineamento e fabricação das NEs são os tensoativos, os quais irão estabilizar a interface óleo e água da emulsão. Ganta e colaboradores (2014) propões 3 propriedades: “rápida adsorção da interface óleo/água; reduzida tensão interfacial e estabilizar a superfície da NE por interações estéricas ou eletrostáticas”.

A estabilidade estérica é utilizada em diversos tipos de carreadores e nanocarreadores, onde componentes, tais como polímeros ou tensoativos, inseridos ou adsorvidos nas superfícies de partículas, impedirão a aproximação das partículas para assim evitar a agregação, resultando em uma dispersão estável (ARAKI; WADA; KUGA, 2001; HARUN et al., 2018).

Desta forma, nossa hipótese é que por meio de uma NE contendo poloxamer 188 (P188), nós possamos melhorar a entrega de cisplatina e dexametasona às células tumorais, pois o P188 parece auxiliar a passagem pela BHE e endocitose das NE (WAGNER et al., 2012) e assim, diminuir a concentração destes fármacos e seus efeitos adversos subsequentes.

6. CONCLUSÕES

As NE desenvolvidas e caracterizadas estão dentro dos parâmetros esperados para o tratamento de GB, pois apresentam uma dispersão homogênea, com tamanho médio menor que 200 nm e não apresentam citotoxicidade significante dentro da concentração estudada.

A concentração mínima eficaz de dexametasona e cisplatina para incorporação das NEs foram definidas e incorporadas aos nanocarreadores, observando que há diminuição da viabilidade celular e da IC50 com a combinação dos fármacos quando comparados aos fármacos isolados.

As NE contendo a combinação dos fármacos cisplatina e dexametasona apresentaram uma maior citotoxicidade em nossos modelos de cultura celular, pois com as mesmas condições experimentais, foram capazes de diminuir a viabilidade celular *in vitro* e a IC50 da combinação dos fármacos.

7. REFERÊNCIAS

AHMAD, E. et al. Evidence of nose-to-brain delivery of nanoemulsions: Cargoes but not vehicles. **Nanoscale**, v. 9, n. 3, p. 1174–1183, 2017.

AHUJA, N.; SHARMA, A. R.; BAYLIN, S. B. Epigenetic Therapeutics: A New Weapon in the War Against Cancer. **Annual Review of Medicine**, v. 67, n. 1, p. 73–89, 2016.

ALBERTS, B. et al. Molecular Biology of the Cell, 4th edition. In: **Garland Science**. [s.l: s.n.]. p. The Mitochondrion.

ALDAPE, K., ZADEH, G., MANSOURI, S. ET AL. A. N. (2015) 129: 829. DOI:10. 1007/S0040.-015-1432-1. Glioblastoma : pathology , molecular mechanisms and markers. **Acta Neuropathologica**, v. 129, n. 6, p. 829–848, 2015.

ANASTASIADOU, E.; JACOB, L. S.; SLACK, F. J. **Non-coding RNA networks in cancerNature Reviews Cancer**, 2018.

ANDERSSON, A. et al. Determination of the acid dissociation constant for cis-diammineaquachloroplatinum(II) ion. A hydrolysis product of cisplatin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, n. 6, p. 859–862, 1994.

ANDERSSON, A. et al. Pharmacokinetics of cisplatin and its monohydrated complex

in humans. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 8, p. 824–827, 1996.

ARAKI, J.; WADA, M.; KUGA, S. Steric stabilization of a cellulose microcrystal suspension by poly(ethylene glycol) grafting. **Langmuir**, v. 17, n. 1, p. 21–27, 2001.

ARVOLD, N. D. et al. Targeting adaptive glioblastoma: An overview of proliferation and invasion. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 9, n. 12, p. 1407–1420, 2014.

BAIĊC, J. et al. glucocorticoids and oxidative stress. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 18, n. 2, p. 115–127, 2007.

BAILLY-MAITRE, B. et al. Dexamethasone inhibits spontaneous apoptosis in primary cultures of human and rat hepatocytes via Bcl-2 and Bcl-xL induction. **Cell Death & Differentiation**, v. 8, n. 3, p. 279–288, 2001.

BALLABH, P.; BRAUN, A.; NEDERGAARD, M. The blood-brain barrier: An overview: Structure, regulation, and clinical implications. **Neurobiology of Disease**, v. 16, n. 1, p. 1–13, 2004.

BARABAS, K. et al. Cisplatin: A review of toxicities and therapeutic applications. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 6, n. 1, p. 1–18, 2008.

BAVARESCO, L. et al. Dexamethasone inhibits proliferation and stimulates ecto-5′-nucleotidase/CD73 activity in C6 rat glioma cell line. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 84, n. 1, p. 1–8, 2007.

BECKER, D. E. Basic and clinical pharmacology of glucocorticosteroids. **Anesthesia progress**, v. 60, n. 1, p. 25–32, 2013.

BERNERS-PRICE, S. J. et al. Hydrolysis products of cisplatin: pK a determinations via[1H, 15N] NMR spectroscopy. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 10, p. 789, 1992.

BERX, G.; VAN ROY, F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 6, 2009.

BEST, M. G. et al. Liquid biopsies in patients with diffuse glioma. **Acta Neuropathologica**, v. 129, n. 6, p. 849–865, 2015.

BHARDWAJ, U.; BURGESS, D. J. Physicochemical properties of extruded and non-extruded liposomes containing the hydrophobic drug dexamethasone. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 388, n. 1–2, p. 181–189, 2010.

BHASKAR, S. et al. Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: Perspectives on tracking and neuroimaging. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 7, n. 3, p. 1–25, 2010.

BHOWMICK, N. A.; NEILSON, E. G.; MOSES, H. L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 332–337, 2004.

BOULIKAS, T.; VOUGIOUKA, M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review). **Oncology reports**, v. 10, n. 6, p. 1663–1682, 2003.

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY. **Platinol (cisplatin for injection, USP)**. [s.l: s.n.].

CARVALHO, V. F. M. et al. Co-encapsulation of paclitaxel and C6 ceramide in tributyrin-containing nanocarriers improve co-localization in the skin and potentiate cytotoxic effects in 2D and 3D models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, n. May, p. 131–143, 2017.

CASTILHO-FERNANDES, A. et al. Photodynamic process induced by chloro-aluminum phthalocyanine nanoemulsion in glioblastoma. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 19, p. 221–228, 2017.

CHABOUB, L. S.; DENEEN, B. Developmental origins of astrocyte heterogeneity: The final frontier of CNS development**. Developmental Neuroscience**, 2013.

CHAREST, G. et al. Glioblastoma treatment: Bypassing the toxicity of platinum compounds by using liposomal formulation and increasing treatment efficiency with concomitant radiotherapy. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 84, n. 1, p. 244–249, 2012.

CHENG, N. et al. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. **Molecular cancer research : MCR**, v. 6, n. 10, p. 1521–33, 2008.

CLARK, A. R.; LASA, M. Crosstalk between glucocorticoids and mitogen-activated protein kinase signalling pathways. **Curr Opin Pharmacol**, v. 3, n. 4, p. 404–411, 2003.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy : molecular mechanisms of action. **Eur J Pharmacol**, v. 5, n. 0, p. 364–378, 2015.

DEBERARDINIS, R. J.; CHANDEL, N. S. Fundamentals of cancer metabolism. **Science Advances**, v. 2, n. 5, p. e1600200, 2016.

DECLÈVES, X. et al. Molecular and functional MDR1-PGP and MRPS expression in human glioblastoma multiforme cell lines. **International Journal of Cancer**, v. 98, n. 2, p. 173–180, 2002.

DIETRICH, J. et al. Corticosteroids in brain cancer patients : benefits and pitfalls. **Expert Rev Clin Pharmaco**, v. 4, n. 2, p. 233–242, 2011.

DOBELBOWER, M. C. et al. Patterns of failure for glioblastoma multiforme following concurrent radiation and temozolomide. **Journal of Medical Imaging and Radiation Oncology**, v. 55, n. 1, p. 77–81, 2011.

DONG, H. et al. Promising galactose-decorated biodegradable poloxamer 188-plga diblock copolymer nanoparticles of resibufogenin for enhancing liver cancer therapy. **Drug Delivery**, v. 24, n. 1, p. 1302–1316, 2017.

DOU, H. et al. Doxorubicin-loaded dextran-based nano-carriers for Highly Efficient Inhibition of Lymphoma Cell Growth and Synchronous Reduction of Cardiac Toxicity. **Dovepress**, v. 13, p. 5673–5683, 2018.

DUGBARTEY, G. J.; PEPPONE, L. J.; DE GRAAF, I. A. M. An integrative view of cisplatin-induced renal and cardiac toxicities: Molecular mechanisms, current treatment challenges and potential protective measures**. Toxicology**, 2016.

EBLAN, M. J.; WANG, A. Z. Improving chemoradiotherapy with nanoparticle

therapeutics. **Translational cancer research**, v. 2, n. 4, p. 320–329, 2013.

EDER, K.; KALMAN, B. Molecular Heterogeneity of Glioblastoma and its Clinical Relevance. **Pathology and Oncology Research**, v. 20, n. 4, p. 777–787, 2014.

ELLEMANN, K. et al. Glucocorticoid receptors in glioblastoma multiforme: A new approach to antineoplastic glucocorticoid therapy. **Acta Neurochirurgica**, v. 93, n. 1–2, p. 6–9, 1988.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

ERLANDSSON, B. Stability-indicating changes in poloxamers: The degradation of ethylene oxide-propylene oxide block copolymers at 25 and 40 °C. **Polymer Degradation and Stability**, v. 78, n. 3, p. 571–575, 2002.

FAN, Y. et al. Endocytosis of Corn Oil-Caseinate Emulsions In Vitro: Impacts of Droplet Sizes. **Nanomaterials**, v. 7, n. 11, p. 349, 2017.

FAVIER, I.; PLA, D.; GÓMEZ, M. Metal-based nanoparticles dispersed in glycerol: An efficient approach for catalysis. **Catalysis Today**, 2017.

FISCHER, S. J. et al. Cisplatin and dimethyl sulfoxide react to form an adducted compound with reduced cytotoxicity and neurotoxicity. **NeuroToxicology**, v. 29, n. 3, p. 444–452, 2008.

FLAHERTY, R. L. et al. Glucocorticoids induce production of reactive oxygen species/reactive nitrogen species and DNA damage through an iNOS mediated pathway in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 19, n. 1, p. 35, 2017.

GAIKWAD, V. L.; BHATIA, M. S. Polymers influencing transportability profile of drug. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 4, p. 327–335, 2013.

GANTA, S. et al. Nanoemulsions in Translational Research—Opportunities and Challenges in Targeted Cancer Therapy. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 3, p. 694–708, 2014.

GARZON, R.; MARCUCCI, G.; CROCE, C. M. **T**argeting microRNAs in cancer: Rationale, strategies and challenges**. Nature Reviews Drug Discovery**, 2010.

GASCOYNE, D. M.; KYPTA, R. M.; VIVANCO, M. D. M. Glucocorticoids inhibit apoptosis during fibrosarcoma development by transcriptionally activating Bcl-xL. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 20, p. 18022–18029, 2003.

GAUDANA, R. et al. Development and characterization of nanoparticulate formulation of a water soluble prodrug of dexamethasone by HIP complexation. **Journal of Microencapsulation**, 2011.

GOODRICH, D. W. The retinoblastoma tumor-suppressor gene, the exception that proves the rule. **Oncogene**, 2006.

GORMAN, A. M. et al. Dexamethasone pre-treatment interferes with apoptotic death in glioma cells. **Neuroscience**, v. 96, n. 2, p. 417–425, 2000.

GRASSO, R. J.; JOHNSON, C. E. Dose-response relationships between glucocorticoids and growth inhibition in rat glioma monolayer cultures. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. **Society for Experimental**

Biology and Medicine (New York, N.Y.), v. 154, n. 2, p. 238–241, 1977.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. **Immunity, Inflammation, and CancerCell**, 2010.

GROBBEN, B.; DE DEYN, P. P.; SLEGERS, H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion**. Cell and Tissue Research**, 2002.

GROOTHUIS, D. R. The blood-brain and blood-tumor barriers: A review of strategies for increasing drug delivery. **Neuro-Oncology**, v. 2, n. 1, p. 45–59, 2000.

GRYPARIS, E. C. et al. Effect of conditions of preparation on the size and encapsulation properties of PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin. **Drug Delivery**, 2007.

HALL, M. D. et al. Say no to DMSO: Dimethylsulfoxide inactivates cisplatin, carboplatin, and other platinum complexes. **Cancer Research**, v. 74, n. 14, p. 3913–3922, 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HARDELL, L. et al. Long-term use of cellular phones and brain tumours: Increased risk associated with use for ≥10 years. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 64, n. 9, p. 626–632, 2007.

HARRIS, S. L.; LEVINE, A. J. The p53 pathway: Positive and negative feedback loops. **Oncogene**, v. 24, n. 17, p. 2899–2908, 2005.

HARUN, S. N. et al. Development of nanoemulsion for efficient brain parenteral delivery of cefuroxime: Designs, characterizations, and pharmacokinetics. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 2571–2584, 2018.

HSIEH, W.-J. et al. In vivo tumor targeting and imaging with anti-vascular endothelial growth factor antibody-conjugated dextran-coated iron oxide nanoparticles. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 2833–42, 2012.

HUANG, F. et al. When temozolomide alone fails: Adding procarbazine in salvage therapy of glioma. **Canadian Journal of Neurological Sciences**, v. 35, n. 2, p. 192–197, 2008.

HUNTER, T. **Signaling - 2000 and beyondCell**, 2000.

HWANG, T. L. et al. Permeation enhancer-containing water-in-oil nanoemulsions as carriers for intravesical cisplatin delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 10, p. 2314–2323, 2009.

IWADATE, Y. Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression**. Oncology Letters**, 2016.

JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 123–127, 2015.

JURJ, A. et al. The new era of nanotechnology, an alternative to change cancer treatment. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 27, n. 11, p. 2871–2890, 2017.

KADAKIA, E.; SHAH, L.; AMIJI, M. M. Mathematical Modeling and Experimental Validation of Nanoemulsion-Based Drug Transport across Cellular Barriers. **Pharmaceutical Research**, v. 34, n. 7, p. 1416–1427, 2017.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition**.** **Journal of Clinical Investigation**, 2009.

KARIM, R. et al. Nanocarriers for the treatment of glioblastoma multiforme: Current state-of-the-art. **Journal of Controlled Release**, 2016.

KATO, Y. et al. Acidic extracellular microenvironment and cancer. **Cancer Cell International**, 2013.

KAUP, B. et al. Time-dependent inhibition of glioblastoma cell proliferation by dexamethasone. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 51, n. 2, p. 105–110, 2001.

KHALIN, I. et al. Brain-derived neurotrophic factor delivered to the brain using poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles improves neurological and cognitive outcome in mice with traumatic brain injury. **Drug Delivery**, v. 23, n. 9, p. 3520–3528, 2016.

KIM, I. J. Cancer genetics and genomics for personalized medicine. In: **Cancer Genetics and Genomics for Personalized Medicine**. [s.l: s.n.]. p. 1–286.

KONG, M.; PARK, H. J. Stability investigation of hyaluronic acid based nanoemulsion and its potential as transdermal carrier. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 3, p. 1303–1310, 2011.

KORDI, S. et al. A comparison of the inhibitory effect of nano-encapsulated helenalin and free helenalin on telomerase gene expression in the breast cancer cell line, by real-time PCR. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 695–703, 2016.

KUHLMANN, M. K.; BURKHARDT, G.; KÖHLER, H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 12, n. 12, p. 2478–2480, 1997.

LAANE, E. et al. Cell death induced by dexamethasone in lymphoid leukemia is mediated through initiation of autophagy. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 7, p. 1018–1029, 2009.

LANCIOTTI, A. et al. MLC1 trafficking and membrane expression in astrocytes: Role of caveolin-1 and phosphorylation. **Neurobiology of Disease**, v. 37, n. 3, p. 581–595, 2010.

LAQUINTANA, V. et al. New strategies to deliver anticancer drugs to brain tumors. **Expert opinion on drug delivery**, v. 6, n. 10, p. 1017–32, 2009.

LAU, J. K. C.; ENSING, B. Hydrolysis of cisplatin - A first-principles metadynamics study. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, n. 35, p. 10348–10355, 2010.

LI, J. et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 2, p. 81–98, 2014.

LIU, F. et al. PH-responsive nanoemulsions for controlled drug release. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 3, p. 968–977, 2014.

LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97–109, 2007.

MAEDA, H. et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review**. Journal of Controlled Release**, 2000.

MAHMOOD, T.; AKHTAR, N.; MANICKAM, S. Interfacial film stabilized W/O/W nano multiple emulsions loaded with green tea and lotus extracts: Systematic characterization of physicochemical properties and shelf-storage stability. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 12, n. 20, p. 1–8, 2014.

MCLAIN, V. C. Safety assessment of poloxamers 101, 105, 108, 122, 123, 124, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 212, 215, 217, 231, 234, 235, 237, 238, 282, 284, 288, 331, 333, 334, 335, 338, 401, 402, 403, and 407, poloxamer 105 benzoate, and poloxamer 182 dibenzoate as useInternational**. Journal of Toxicology**, 2008.

MORITA, K. et al. Dexamethasone enhances serum deprivation-induced necrotic death of rat C6 glioma cells through activation of glucocorticoid receptors. **Brain Research**, v. 816, n. 2, p. 309–316, 1999.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MULIK, R. S. et al. Transferrin mediated solid lipid nanoparticles containing curcumin: Enhanced in vitro anticancer activity by induction of apoptosis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 398, n. 1–2, p. 190–203, 2010.

NA, K.; YOU, H. B. Self-assembled hydrogel nanoparticles responsive to tumor extracellular pH from pullulan derivative/sulfonamide conjugate: Characterization, aggregation, and adriamycin release in vitro. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 5, p. 681–688, 2002.

NISHIDA, N. et al. **Angiogenesis in cancerVascular Health and Risk Management**, 2006.

OAKLEY, R.; CIDLOWSKI, J. The Biology of the Glucocorticoid Receptor: New Signaling Mechanism in Health and Disease. **J allergy clin inmunol**, v. 132, n. 5, p. 1033–1044, 2013.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. The definition of primary and secondary glioblastoma. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 4, p. 764–772, 2013.

OLIVIER, J. C. **Drug transport to brain with targeted nanoparticlesNeuroRx**, 2005.

OZAKI, T.; NAKAGAWARA, A. **Role of p53 in cell death and human cancersCancers**, 2011.

PANDEY, M. et al. Perspectives of nanoemulsion strategies in the improvement of oral, parenteral and transdermal chemotherapy. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 276–279, 2018.

PETER, M. E. et al. **The role of CD95 and CD95 ligand in cancerCell Death and**

Differentiation, 2015.

PETRI, B. et al. Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: Revisiting the role of surfactants. **Journal of Controlled Release**, v. 117, n. 1, p. 51–58, 2007.

PORTER, J. T.; MCCARTHY, K. D. **Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivoProgress in Neurobiology**, 1997.

QU, J. et al. Nanostructured lipid carriers, solid lipid nanoparticles, and polymeric nanoparticles: which kind of drug delivery system is better for glioblastoma chemotherapy? **Drug Delivery**, v. 23, n. 9, p. 3408–3416, 2016.

RAY, M. R.; JABLONS, D. M. Hallmarks of metastasis. In: **Lung Cancer Metastasis: Novel Biological Mechanisms and Impact on Clinical Practice**. [s.l: s.n.]. p. 29–46.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1711–1723, 2005.

RISS, T. L. et al. Cell Viability Assays. **Assay Guidance Manual [Internet]**, v. 114, n. 8, p. 785–796, 2013.

ROY, P.; SAIKIA, B. Cancer and cure : A critical analysis. **Indian Journal of Cancer**, v. 53, n. 3, p. 441–442, 2016.

SABERI, A. H.; FANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Effect of glycerol on formation, stability, and properties of vitamin-E enriched nanoemulsions produced using spontaneous emulsification. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 411, p. 105–113, 2013.

SAHAY, G.; BATRAKOVA, E. V.; KABANOV, A. V. Different internalization pathways of polymeric micelles and unimers and their effects on vesicular transport. **Bioconjugate Chemistry**, v. 19, n. 10, p. 2023–2029, 2008.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 20–31, 2007.

SCHORK, N. J. Personalized medicine: Time for one-person trials. **Nature**, 2015.

SCHWABE, R. F.; JOBIN, C. The microbiome and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 11, p. 800–812, 2013.

SEEBALLUCK, F.; ASHFORD, M. B.; O'DRISCOLL, C. M. The effects of Pluronic® block copolymers and Cremophor® EL on intestinal lipoprotein processing and the potential link with P-glycoprotein in Caco-2 cells. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 7, p. 1085–1092, 2003.

SERLIN, Y. et al. Anatomy and Physiology of the Blood-Brain Barrier. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 38, p. 2–6, 2015.

SHARMA, K. et al. p53-independent Noxa induction by cisplatin is regulated by ATF3/ATF4 in head and neck squamous cell carcinoma cells. **Molecular Oncology**, n. 2018, 2018.

SHENOY, D. et al. Poly(ethylene oxide)-modified poly(β-amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor-targeted delivery of hydrophobic drugs: Part 2. In vivo distribution and tumor localization studies. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 12, p. 2107–2114, 2005.

SHI, Y. et al. Preparation and cellular targeting study of VEGF-conjugated PLGA nanoparticles. **Journal of Microencapsulation**, v. 32, n. 7, p. 699–704, 2015.

SIDDIK, Z. H. Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47 REV. ISS. 6, p. 7265–7279, 2003.

SIEGEL, R.; MILLER, K.; JEMAL, A. Cancer statistics , 2017 . **CA Cancer J Clin**, v. 67, n. 1, p. 7–30, 2017.

SIMION, V. et al. P-Selectin Targeted Dexamethasone-Loaded Lipid Nanoemulsions: A Novel Therapy to Reduce Vascular Inflammation. **Mediators of Inflammation**, 2016.

SIZOO, E. M. et al. Symptoms and problems in the end-of-life phase of high-grade glioma patients. **Neuro-Oncology**, v. 12, n. 11, p. 1162–1166, 2010.

ŚLIWKA, L. et al. The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–17, 2016.

STAGG, R. B. et al. DNA synthesis and cell proliferation in C6 glioma and primary glial cells exposed to a 836.55 MHz modulated radiofrequency field. **Bioelectromagnetics**, v. 18, n. 3, p. 230–6, 1997.

STEPANENKO, A. A.; DMITRENKO, V. V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. **Gene**, v. 574, n. 2, p. 193–203, 2015.

STOYE, I.; SCHRÖDER, K.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Transformation of a liposomal dispersion containing ibuprofen lysinate and phospholipids into mixed micelles - Physico-chemical characterization and influence on drug permeation through excised human stratum corneum. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 46, p. 191–200, 1998.

STUPP, R. et al. High-grade malignant glioma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 21, n. SUPPL. 5, p. 190–193, 2010.

SZERLIP, N. J. et al. Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 8, p. 3041–3046, 2012.

TAYEB, H. H.; SAINSBURY, F. Nanoemulsions in drug delivery: Formulation to medical application. **Nanomedicine**, v. 13, n. 19, p. 2507–2525, 2018.

TIAN, Y.; CHEN, L.; ZHANG, W. Influence of Ionic Surfactants on the Properties of Nanoemulsions Emulsified by Nonionic Surfactants Span 80/Tween 80. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 37, n. 10, p. 1511–1517, 2016.

TIRNAKSIZ, F.; KALSIN, O. A topical w/o/w multiple emulsions prepared with tetronic 908 as a hydrophilic surfactant: Formulation, characterization and release study.

Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, v. 8, n. 2, p. 299–315, 2005.

VANDER HEIDEN, M. G.; DEBERARDINIS, R. J. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 657–669, 2017.

VAZQUEZ, A. et al. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 12, p. 979–987, 2008.

VERHAAK, R. G. W. et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, v. 17, n. 1, p. 98–110, 2010.

VIEIRA, D. B.; GAMARRA, L. F. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. **Einstein (São Paulo)**, v. 14, n. 1, p. 99–103, 2016.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Cancer genes and the pathways they control. **Nature Medicine**, v. 10, n. 8, p. 789–799, 2004.

WAGNER, S. et al. Uptake mechanism of ApoE-modified nanoparticles on brain capillary endothelial cells as a blood-brain barrier model. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e32568, 2012.

WANG, D.; LIPPARD, S. J. **Cellular processing of platinum anticancer drugsNature Reviews Drug Discovery**, 2005.

WANG, Y. et al. Continuous dose-intense temozolomide and cisplatin in recurrent glioblastoma patients. **Medicine (United States)**, v. 96, n. 10, 2017.

WEIDLE, U. H.; NIEWOHNER, J.; TIEFENTHALER, G. The blood-brain barrier challenge for the treatment of brain cancer, secondary brain metastases, and neurological diseases. **Cancer Genomics and Proteomics**, v. 12, n. 4, p. 167–178, 2015.

WEIL, A. R. Precision medicine. **Health Affairs**, 2018.

WELLER, M. et al. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma--are we there yet? **Neuro Oncol**, v. 15, n. 1, p. 4–27, 2013.

WEN, P. Y.; KESARI, S. Malignant gliomas in Adults. **The New England journal of medicine**, v. 359, n. 5, p. 492–507, 2008.

WHO. **Guide To Cancer Early Diagnosis**. [s.l: s.n.].

WILSON, J. J.; LIPPARD, S. J. In vitro anticancer activity of cis-diammineplatinum(II) complexes with β-diketonate leaving group ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 5326–5336, 2012.

WIRSCHING, H.-G.; GALANIS, E.; WELLER, M. Glioblastoma. In: **Handbook of Clinical Neurology, Gliomas**. [s.l: s.n.]. v. 134p. 381–397.

WU, I. et al. Selective glucocorticoid receptor translational isoforms reveal glucocorticoid-induced apoptotic transcriptomes. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 1, 2013.

WU, M. et al. Vincristine and temozolomide combined chemotherapy for the treatment of glioma: a comparison of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for dual drugs delivery. **Drug Delivery**, v. 23, n. 8, p. 2720–2725, 2016.

XU, L. et al. Caveolin-1 is a checkpoint regulator in hypoxia-induced astrocyte apoptosis via Ras/Raf/ERK pathway. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 310, n. 11, p. 903–910, 2016.

YAN, F. et al. The effect of poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 170–178, 2010.

YANG, H. **Nanoparticle-mediated brain-specific drug delivery, imaging, and diagnosisPharmaceutical Research**, 2010.

YU, S. et al. Glucocorticoid regulation of astrocytic fate and function. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. 1–12, 2011.

YUN, J. H. et al. Caveolin-1 is involved in reactive oxygen species-induced SHP-2 activation in astrocytes. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 43, p. 660–668, 2011.

ZAHR, A. S.; DAVIS, C. A; PISHKO, M. V. Macrophage uptake of core-shell nanoparticles surface modified with poly(ethylene glycol). **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 22, n. 19, p. 8178–85, 2006.

ZHOU, J. et al. Novel delivery strategies for glioblastoma. **Cancer journal (Sudbury, Mass.)**, v. 18, n. 1, p. 89–99, 2012.

ZIBERA, C. et al. Proliferative effect of dexamethasone on a human glioblastoma cell line (HU 197) is mediated by glucocorticoid receptors. **Anticancer Research**, v. 12, n. 5, p. 1571–1574, 1992.

ZIRAK, M. B.; PEZESHKI, A. Effect of Surfactant Concentration on the Particle Size , Stability and Potential Zeta of Beta carotene Nano Lipid Carrier. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 9, p. 924–932, 2015.