UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Eficácia terapêutica de nanocápsulas de metotrexato em glioblastoma murino:
estudos *in vivo* e *in vitro***

Natalia Rubio Claret Pereira

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Sandra Helena Poliselli Farsky

**São Paulo
2015**

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Pereira, Natalia Rubio Claret
P436e Eficácia terapêutica de nanocápsulas de metotrexato em
glioblastoma murino : estudos *in vivo e in vitro* / Natalia
Rubio Claret Pereira. -- São Paulo, 2015.
81p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Farsky, Sandra Helena Poliselli

1. Toxicologia experimental 2. Inflamação : Quimioterapia
I. T. II. Farsky, Sandra Helena Poliselli, orientador.

615.90028 CDD

Natalia Rubio Claret Pereira

**Eficácia terapêutica de nanocápsulas de metotrexato em glioblastoma murino:
estudos *in vivo* e *in vitro***

Versão Corrigida

**Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre**

**Prof.^a Dr.^a Sandra Helena Poliselli Farsky
Orientadora/Presidente**

**Adriana Raffin Pohlmann
1º. Examinador**

**Ana Paula de Melo Loureiro
2º. Examinador**

**São Paulo
2015.**

**Aos meus pais,
Nilson e Rosane
Pelo amor, dedicação, apoio e incentivo.**

**Aos meus irmãos,
Gustavo e Laura
Pela amizade, amor, apoio e compreensão.**

**Ao meu grande amor,
Miguel Marques,
Pelo apoio, paciência, companheirismo e amor.**

AGRADECIMENTOS

Ao longo do mestrado, conheci muitas pessoas que me apoiaram e ensinaram muito, por isso tenho muito a agradecer.

Inicialmente a minha querida Orientadora Sandra Farsky, pela compreensão, apoio, carinho, conselhos e pela oportunidade de realizar meu trabalho em seu laboratório o qual tenho muito orgulho de participar.

A Dr. Adriana Raffin Pohlmann, do Instituto de Química - UFRGS, e Dr. Silvia Stanisçuaski Guterres, da Faculdade de Farmácia - UFRGS, e a aluna Catiúscia Oliveira da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela colaboração realizada com a produção e envio das formulações de nanocápsulas com metotrexato.

Aos pós-doutorandos, Stephen Rodrigues (obrigada pela co-orientação) e Rodrigo Loiola pelos ensinamentos, parcerias em experimentos e auxílios sempre disponibilizados.

Aos amigos e colegas de laboratório que sempre me socorriam entre um implante de glioma ou cultivo de células: Ana Lucia Shimada, Carina Takahama, Carine Drewes, Cintia Heluany, Eric Barioni, Leonard Devinci, Lorena Pantaleão, Paula Cunha e Wesley Cruz, mas principalmente a amiga Marina Spatti obrigada por sempre confiar em mim, pelo ombro amigo e por tornar mais leve as horas difíceis.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Toxicologia e Análises Toxicológicas.

A Bibliotecária de Referência e Informação Leila Aparecida Bonadio, pela ajuda na revisão das referências bibliográficas.

A Universidade de São Paulo e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de fazer parte deste programa de pós-graduação.

A CNPq pelo apoio e suporte financeiro em todos os momentos que se fizeram necessário.

RESUMO

PEREIRA, N.R.C. **Eficácia terapêutica de nanocápsulas de metotrexato em glioblastoma murino: estudos *in vivo* e *in vitro***. 2015. 65f. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O glioblastoma multiforme (GBM) é uma doença grave e sem tratamento eficaz, especialmente pelos agentes terapêuticos disponíveis causarem reações adversas importantes nas doses terapêuticas. O metotrexato (MTX) é um fármaco citotóxico utilizado para tratar diversas neoplasias, no entanto, sua utilização é limitada pela baixa biodisponibilidade e reações adversas. A nanotecnologia tem sido utilizada para aumentar a eficácia dos medicamentos antitumorais, com o intuito de direcioná-los para o sítio de ação e reduzir os efeitos adversos. Nesse sentido, realizamos ensaios com nanocápsulas lipídicas de MTX (LNC MTX) para avaliar os mecanismos de captação em linhagens celulares de glioblastoma e micróglia, além investigar a eficácia terapêutica da LNC MTX em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente, ensaios de microscopia de fluorescência, empregando bloqueadores farmacológicos específicos para transportes de membrana, mostraram que as LNC MTX marcadas com Rodamina B penetram em células tumorais GL261 por endocitose, dependente de caveolinas, e em células de micróglia da linhagem BV2 por fagocitose e macropinocitose. Os tratamentos com LNC MTX ou solução de MTX (em concentrações correspondentes) em células GL261 inibiram a proliferação; aumentaram a fragmentação de DNA, mas, somente as LNC induziram a morte celular por necrose e diminuíram o número de células na fase G1/G0 do ciclo celular. Na linhagem celular BV2, os tratamentos com LNC MTX ou solução de MTX inibiram a proliferação, reduziram a quantidade de células na fase G1/G0 do ciclo celular, aumentaram a fragmentação de DNA e induziram morte celular por apoptose e apoptose tardia. Os ensaios *in vivo* de microscopia intravital mostraram que a LNC MTX atravessa a barreira Hematoencefálica (BHE) de camundongos fêmea C57Bl/6 após administração intravenosa ou oral, sem danificar a sua estrutura. O tamanho do glioblastoma *in vivo* foi reduzido em animais tratados com LNC MTX por via oral em relação aos animais tratados com salina. Esta redução não foi detectada em animais tratados com solução de MTX. Em conjunto, os dados obtidos mostram que a LNC MTX penetram em células de glioma e da glia e causam toxicidade, atravessam a BHE *in vivo* e sugerem que a nanoencapsulação do MTX pode ser uma estratégia importante para o tratamento do glioblastoma. .

Palavras-chave: Glioblastoma Murino, Nanocápsulas, Metotrexato, Barreira Hematoencefálica.

Abstract

PEREIRA, N.R.C. **Therapeutic efficacy of methotrexate nanocapsules in murine glioblastoma: in vivo and in vitro studies**. 2015. 65f. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Glioblastoma multiforme (GBM) is a serious disease and no effective treatment is available, especially because the drugs cause significant adverse reactions in therapeutic doses. Methotrexate (MTX) is a cytotoxic drug used to treat many neoplasms, however, their use is limited by the low bioavailability and adverse reactions. Nanotechnology has been used to increase the effectiveness of antitumor drugs in order to direct them to the site of action and to reduce adverse effects. Accordingly, we carried out an experimental approach with MTX lipid nanocapsules (MTX LNC) to evaluate the uptake mechanisms in glioblastoma and microglia cell lines, and the therapeutic efficacy of MTX LNC *in vitro* and *in vivo* systems. Initially, fluorescence microscopy assays employing specific pharmacological blockers for membrane transport showed that the MTX LNC stained with Rhodamine B penetrated into GL261 tumor cells by caveolae-mediated endocytosis, and in BV2 microglia cells by phagocytosis and macropinocytosis. Treatment with MTX solution or MTX LNC (at corresponding concentrations) on GL261 cells inhibited the proliferation; increased DNA fragmentation, but only the LNC induced cell death by necrosis and decreased the number of cells in the G1/G0 phase of the cell cycle. In BV2 cells, treatment with MTX solution or MTX LNC inhibited proliferation, reduced number of cells in the G1/G0 phase of the cell cycle, increased DNA fragmentation and cell death, induced by apoptosis and late apoptosis. Intravital microscopy study showed that the MTX LNC across the Blood-Brain Barrier (BBB) of C57BL/6 female mice after intravenous or oral administrations, without damaging its structure. The area of glioblastoma *in vivo* was reduced in animals orally treated with MTX LNC comparing to saline treated mice. This reduction was not observed in animals treated with MTX solution. Together, the data herein obtained show that MTX LNC penetrate the cell membrane and cause cell toxicity on glioma and neurons lineage, cross the BBB and suggest that the nanoencapsulation of MTX can be an important strategy for the treatment of glioblastoma.

Keywords: Murine Glioblastoma, Nanocapsules, Methotrexate, Blood-Brain Barrier.

LISTA DE ABREVIATURAS:

AICAR	Enzima 5-aminoimidazol 4-carboxamida ribonucleotídeo
ANXA V	Anexina 5
Ase	Área de Superfície Específica
ATA	Ácido Tricloroacético
ATP	Trifosfato de adenosina
BHE	Barreira Hematoencefálica
CD31	Cluster de Diferenciação 31
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX-2	Ciclooxygenase-2
CS	Soro de Bezerro
CSF	Líquido Cérebro Espinhal Artificial
CXCR4	Receptor 4 da quimiocina C-X-C
D[3,4]	Diâmetro médio de esfera equivalente
D50	Diâmetro de 50% das partículas
D90	Diâmetro de 90% das partículas
DAPI	4'-6-diamidino-2-phenylindole
DCFH	2'-7'-diclorodihidrofluoresceína
DHFR	Di-hidrofolato Redutase
DL	Difração de Laser
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EE	Eficiência de Encapsulação
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Endotelial
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FITC	Isocianato de Fluoresceína
FPGS	Enzima Folilpoliglutamato Sintase
GBM	Glioblastoma Murino
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
GTPase	Guanosina Trifosfatase
HeLa	Linhagem celular obtida do câncer cervical de Henrietta Lacks
HBSS	Solução Fisiológica de Hanks Balanceada
HIF-1 α	<i>Hypoxia Inducible Factor 1 alfa</i>
IC50	Índice de Citotoxicidade de 50%

li	<i>Intensity inside</i>
lo	<i>Intensity outside</i>
I.P.	Intra Peritoneal
IP	Iodeto de Propídeo
IV	Intra Venoso
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
LNC	Nanocápsulas de Núcleo Lipídico
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
MCF7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
MTX	Metotrexato
NC	Nanocápsulas
NP	Número de Partícula
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Salina Fosfatada
PCL	Poli (ϵ -caprolactona)
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PDI	Índice de Polidispersão
R10	RPMI Contendo 10% de Soro Fetal Bovino
R10CS	RPMI Contendo 10% de Soro de Bezerro
RNAse-A	Ribonuclease A
Rod B	Rodamina B
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
SPAN	Polidispersão
TCC	Triglicerídeos dos ácidos Cáprico e Caprílico
Ti	Teste de crescimento com os tratamentos
Tz	Tempo Zero
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
Z-average	Diâmetro médio

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1: Captação das LNC^{PCL-Rod B}_{MTX} pelas células BV2.	25
Figura 2: Captação celular das LNC^{PCL-Rod B}_{MTX} pelas GL261.	26
Figura 3: Fotos da Microscopia de Fluorescência das GL261 na presença ou ausência dos bloqueios farmacológicos.	27
Figura 4: Captação celular das LNC PCL-RodB MTX pelas BV2.	28
Figura 5: Fotos da Microscopia de Fluorescência das BV2 na presença ou ausência dos bloqueios farmacológicos.	29
Figura 6. Efeito das suspensões de LNC MTX e da solução de MTX sobre a proliferação de GL261.	30
Figura 7: Efeito das suspensões de LNC MTX e da solução de MTX sobre a proliferação de BV2.	31
Figura 8. Efeito das suspensões de LNC MTX e da solução de MTX sobre o crescimento de células GL261	32
Figura 9: Efeito das suspensões de LNC MTX e da solução de MTX sobre o crescimento de células BV2.	33
Figura 10. Indução de morte em células GL261 pelas suspensões de LNC MTX e da solução de MTX	34
Figura 11: Indução de morte em células BV2 pelas suspensões de LNC MTX e da solução de MTX	35
Figura 12: Efeito dos tratamentos de suspensões de LNC MTX e da solução de MTX sobre o ciclo de celular da linhagem GL261.	37
Figura 13: Efeito dos tratamentos de suspensões de LNC MTX e da solução de MTX sobre o ciclo celular da linhagem BV2.	37
Figura 14: Efeito dos tratamentos de suspensões de LNC MTX e da solução de MTX sobre a Fragmentação do DNA em GL261.	38

Figura 15: Efeito dos tratamentos de suspensões de LNC MTX e da solução de MTX sobre a Fragmentação do DNA em células BV2.	38
Figura 16: Extravasamento de Rodamina para região perivascular após administração via IV de LNC^{PCL-Rod B}_{MTX}.	40
Figura 17: Fotos dos vasos piais e parênquima cerebral após injeção intravenosa de LNC^{PCL-Rod B}_{MTX}, obtidas por microscopia intravital.	40
Figura 18: Microscopia intravital da região perivascular após administração via oral de LNC^{PCL-Rod B}_{MTX}.	41
Figura 19: Fotos da Microscopia intravital em tratamento via oral.	41
Figura 20: Efeito das LNC sobre a integridade da BHE.	42
Figura 21: Efeito do tratamento de LNC MTX ou solução de MTX sobre a variação da Massa Corpórea em animais com Glioblastoma Murino.	44
Figura 22: Efeito do tratamento de LNC MTX ou solução de MTX sobre o consumo de ração animais Glioblastoma Murino.	44
Figura 23: Efeito do tratamento oral de LNC MTX ou solução de MTX sobre o tamanho do Glioblastoma.	45
Figura 24: Efeito do tratamento oral de LNC MTX ou solução de MTX sobre o tamanho do Glioblastoma.	45

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1: Composição qualitativa e quantitativa das Formulações:	15
Tabela 2: Caracterização físico-química das formulações:	16
Tabela 3: Efeito das suspensões de LNC MTX e da solução de MTX sobre a proliferação de GL261 ou BV2.	31
Tabela 4: Efeito do tratamento de LNC MTX ou solução de MTX sobre a evolução Ponderal dos Animais com Glioblastoma Murino	43

Sumário

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Glioblastoma Multiforme (GBM)	1
1.1.1 Modelo animal de glioblastoma	3
1.2 Micróglia	4
1.3 Nanotecnologia.....	5
1.4 Nanofármacos.....	6
1.4.1 Nanofármacos para o tratamento de doenças do SNC: BHE.....	9
1.5 Metotrexato (MTX)	10
2 OBJETIVOS	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Animais.....	14
3.2 Obtenção das formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo ou não metotrexato	14
3.3 Cultura de células GL261 e BV2	17
3.4 Mecanismo de captação das LNCPCL-Rod BMTX pelas células GL261 e BV2 em microscópio de fluorescência.	17
3.4.1 Tempo de captação das LNCPCL-Rod BMTX pelas células BV2	17
3.4.2 Mecanismos de Endocitose.....	18
3.5 Ensaio de proliferação celular	18
3.6 Curva de Crescimento celular	19
3.7 Teste de viabilidade com iodeto de propídeo e ANXA V	20
3.8 Determinação da fragmentação e ciclo celular	21
3.9 Passagem das LNC MTX através da BHE: Microscopia intravital de vasos piais ...	21
3.10 Integridade da barreira hematoencefálica.....	22
3.11 Implante de glioblastoma murino.....	23
3.11.1 Medida do volume tumoral	24
3.12 Análise estatística	24
4 RESULTADOS.....	25
4.1 Captação das LNC^{PCL-Rod B}_{MTX} pelas células BV2 e GL261	25
4.1.1 Tempo de captação das LNC MTX pelas células BV2.....	25
4.1.2 Mecanismos de captação das LNCPCL-Rod BMTX pelas células de linhagem GL261 e BV2.	26
4.2 Toxicidade da LNC MTX <i>in vitro</i>	30
4.2.1 Efeitos da LNC MTX e da solução de MTX sobre a proliferação celular.....	30
4.2.2 Efeitos da LNC MTX e da solução de MTX sobre a indução de morte celular	33

4.2.3 Efeitos da LNC MTX e da solução de MTX sobre a fragmentação de DNA e ciclo celular.....	36
4.3 Estudos <i>in vivo</i>	39
4.3.1 Passagem das LNC ^{PCL-Rod B} _{MTX} através da BHE após administração intravenosa e por via oral.	39
4.3.2 Efeito das LNC MTX sobre a Integridade da BHE	42
4.3.3 Eficácia do tratamento com LNC MTX no modelo de glioblastoma murino...	43
5 DISCUSSÃO	46
6 CONCLUSÕES	55
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 Glioblastoma Multiforme (GBM)

O câncer é uma das enfermidades que mais acomete a população mundial, sendo considerada a segunda causa de morte de natureza conhecida no Brasil, tendo sua incidência aumentada em 20% na última década (INCA, 2014).

O Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estimou que durante o ano de 2014 haveria 576 mil novos casos de câncer no Brasil. Dentre eles, o câncer do SNC corresponde a 8,6% dos novos casos em homens e 7,17% em mulheres. Os tumores do SNC originam-se do cérebro, nervos cranianos ou das meninges, e os gliomas são o tipo histológico mais frequente, representando cerca de 40 a 60% de todos os tumores primários do SNC (INCA, 2014).

A classificação dos gliomas, segundo a OMS, realizada em 2007 levou em conta os seguintes parâmetros: o tipo celular, o grau de malignidade e a localização. A classificação baseada no tipo celular foi feita a partir das características histológicas dos mesmos, de acordo com a semelhança fenotípica das células tumorais com os diferentes tipos de células gliais (astrócitos, oligodendrócitos e células ependimais) (BRAT, 2007). A classificação com base na malignidade tumoral classifica como de baixo grau de malignidade, um tumor de crescimento lento e passível de remoção cirúrgica, como de alto grau de malignidade, um tumor de alta agressividade e crescimento, raramente passível de ressecção cirúrgica e com alta taxa de recorrência (FULLER; SCHEITHAUER, 2007). E por final, a classificação com base na localização tumoral se refere à localização onde o tumor se desenvolve, baseado na estrutura membranosa que separa o cérebro do cerebelo (tentorium cerebelar). Assim, os gliomas podem ser definidos como supratentoriais, que se desenvolvem acima do tentorium, ou infratentoriais, que se desenvolvem abaixo do tentorium (LOUIS, 2007; NAKAZATO, 2008).

O GBM é uma neoplasia maligna que tem origem astrocitária, sendo o considerado o mais frequente entre os subtipos de gliomas. Os astrócitos são células da glia com função estrutural e de nutrição para os neurônios, além de realizar ações de detoxificação, fagocitose e imunes (BIGNAMI, 1991; MONTGOMERY, 1994). Ainda, o GBM é o tipo de astrocitoma de crescimento mais rápido e que se espalha rapidamente, invadindo o tecido cerebral normal. É uma das

formas mais devastadoras e letais de câncer humano, e o tempo médio de sobrevivência é, ainda, muito curto, mesmo em pacientes sob tratamento, chegando a 1 ano (MAHALEY *et al.*, 1980; OHGAK; KLEIHUES, 2007; REEVES; MARKS, 1979).

A incidência desta neoplasia na Europa e América do Norte é de três casos novos por 100.000 habitantes por ano (OSTROM *et al.*, 2014). Embora o GBM possa se manifestar em qualquer idade, acomete preferencialmente adultos com idade pico de incidência entre 45 e 70 anos (ALDAPE *et al.*, 2003).

Os GBM têm como características áreas de proliferação microvascular e necrose e, ainda, quando um tumor se desenvolve no cérebro, passa a ocupar espaço físico, exercendo pressão sobre as partes adjacentes. Ainda, o aumento da pressão intracraniana pode bloquear o fluxo do líquido cérebro espinhal ou resultar na ruptura da BHE, causando o acúmulo de exsudato rico em proteínas no espaço extravascular que leva ao edema cerebral (WEN, 1990). A liberação de fatores de crescimento, como o VEGF, além de promover a angiogênese na região tumoral, pode levar a alteração da permeabilidade da BHE. A Alteração da permeabilidade de vasos pode levar ao efeito EPR (do inglês Enhanced Permeability and Retention) que é causado pela permeabilidade aumentada nos vasos que circundam os tumores. Esta morfologia alterada do sistema vascular leva a hipervascularização, arquitetura vascular anormal, maior produção de fatores estimulantes de permeabilidade vascular, extravasamento para os tecidos tumorais e ausência de drenagem linfática (GREISH, 2010; SENGGER; VAN DE WATER; BROWN, 1993).

Os sinais e sintomas associados a um tumor cerebral dependem, principalmente, de sua localização, extensão e gravidade do edema cerebral. Os sinais e sintomas mais comuns são dor de cabeça; convulsões e déficits neurológicos focais como perda de memória, dificuldade de concentração, desorientação, perda de coordenação, de visão, fraqueza ou paralisia em uma área do corpo, dificuldade ao falar e em deglutir; náuseas, vômitos e fadiga extrema (BOIKOV *et al.*, 2014; WANG; JIANG, 2013).

Quando a neoplasia é diagnosticada, o tratamento mais adequado é prescrito de acordo com o tamanho, histologia, perfil molecular e estágio do tumor, avaliando-se o risco inerente aos procedimentos. De forma geral, se o tumor está localizado em uma área do cérebro onde possa ser removido com segurança, a primeira opção é a cirurgia. Após a cirurgia, os tratamentos radioterápicos e

quimioterápicos são utilizados como terapias adjuvantes, para prevenir a recorrência do tumor (KAUFMAN, 2008; LI, 2010).

A quimioterapia é o tratamento mais utilizado em casos onde a remoção cirúrgica não é recomendada, por não ser um método de tratamento invasivo, ou após procedimentos cirúrgicos, para eliminar células tumorais remanescentes. Contudo, a quimioterapia tem um impacto limitado na sobrevivência dos doentes, uma vez que BHE impõe limitações a terapias de doenças que atingem o SNC. A BHE separa o parênquima cerebral da circulação sanguínea, protegendo o SNC de agentes lesivos, bem como de agentes terapêuticos, portanto em muitos casos é necessária a administração de altas doses de quimioterápico para obter a concentração necessária no tumor cerebral, levando a toxicidade sistêmica, o que compromete a qualidade de vida do paciente (BÉDUNEAU; SAULNIER; BENOIT, 2007; DHANIKULA *et al*, 2007).

Pelos motivos levantados acima quanto a gravidade e dificuldade de tratamento do GBM, a necessidade de estudar novos fármacos anti-tumorais que tenham maior eficácia para este tipo de tumor, quer seja por direcionamento às células tumorais do SNC, ou por maior tempo de retenção no ambiente tumoral, permitirão a administração de doses menores dos quimioterápicos, aumentando a taxa de sobrevida com maior qualidade de vida ao paciente.

1.1.1 Modelo animal de glioblastoma

A compreensão da fisiopatologia do GBM e dos seus mecanismos genéticos de desenvolvimento tem avançado de forma a identificar vários alvos terapêuticos em potencial, tais como, inibidores de VEGF e antagonistas do EGFR (VAN MEIR *et al.*, 2010). Porém, estas terapias-alvo não têm demonstrado o sucesso esperado em ensaios clínicos (FURNARI *et al.*, 2007; KRAKSTAD; CHEKENYA, 2010; VAN MEIR *et al.*, 2010), o que evidencia a natureza complexa da doença.

A GL261 é uma linhagem celular de glioma imortalizada que desenvolve GBM em camundongos C57BL/6, sem a necessidade de um sistema imune deficiente para o seu crescimento. Como resultado, este modelo pode mimetizar, de forma mais precisa, a resposta humana ao GBM. Adicionalmente, a linhagem celular GL261 compartilha com o GBM humano vários marcadores importantes e mutações (DEANGELIS, 2001; FURNARI *et al.*, 2007; VAN MEIR *et al.*, 2010; WEN *et al.*,

1990), além de apresentarem características de crescimento e morfologia tumorais semelhantes às humanas, que são, principalmente, a difusibilidade infiltrante no tecido saudável e a alta prevalência de angiogênese (SHAPIRO; AUSMAN; RALL, 1970; ZAGZAG *et al.*, 2000). A linhagem celular GL261 possui expressão elevada do CXCR4, o que contribui para as propriedades invasivas e migratórias desse modelo (ZAGZAG *et al.*, 2008). Outros marcadores desse tumor são a GFAP, VEGF, PCNA e HIF-1 α (NEWCOMB; ZAGZAG, 2009; ZAGZAG *et al.*, 2003), os quais têm sido correlacionados ao aumento do crescimento da massa tumoral e diminuição na sobrevivência de pacientes com GBM (ZAGZAG *et al.*, 2006).

Por estas características, o modelo murino de glioblastoma induzido por células GL261 é altamente empregado em estudos científicos, e tem contribuído para elucidação da gênese da doença e para novos esquemas posológicos (AGUILAR-MORANTE *et al.*, 2010; CHAE *et al.*, 2014; ANDALOUSSI; HAN; LESNIAK, 2006; LETEN *et al.*, 2014; NEWCOMB *et al.*, 2004; ULASOV *et al.*, 2007; RAPPA *et al.*, 2008).

1.2 Micróglia

Micróglia são células que compõe a imunidade inata e são consideradas como macrófagos residentes distribuídas pelo cérebro humano. Essas células representam 10% de todas as células do SNC, com origem hematopoética a partir de células precursoras mieloides que adentram o SNC durante a embriogênese (CHAN; KOHSAKA; REZAIE, 2007).

As células da micróglia podem ser ativadas, como os macrófagos, em resposta a alguma lesão cerebral, como em doenças neurodegenerativas, acidente vascular cerebral e em tumores cerebrais, e ao serem ativadas passam por transformações morfológicas e funcionais, expressando marcadores de superfície semelhantes aos de macrófagos ativados (KREUTZBERG, 1996; STOLLG; JANDER, 1999). Ao serem ativadas, essas células começam a expressar mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, COX-2 e radicais livres, além de polarizarem para o fenótipo resolutivo durante a finalização da inflamação e restauração da homeostasia (CHHOR *et al.*, 2013; SOLITO, SASTRE, 2012)

Contudo, há estudos que mostram a plasticidade das micróglia na presença de glioma, adquirindo um fenótipo diferente, o qual é induzido pelas células tumorais. Ainda, sabe-se que em um glioma há em torno de 30% de células da micróglia ou macrófagos, infiltrados ou na margem do tumor. O meio ambiente condicionado pelo glioma altera o fenótipo da micróglia em uma forma ativada de maneira diferente do fenótipo inflamatório, pois a ativação associada ao glioma não desencadeia a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como $\text{TNF}\alpha$ ou IL-6, mas conduz a outras alterações da transcrição, como a regulação de metaloproteinases II, podendo assim até promover o crescimento do glioma (HANISCH; KETTENMANN, 2007)

Ensaio com células da micróglia, normalmente são realizados a partir de células primária de neonatos, no entanto uma linhagem celular imortalizada tem sido utilizada com o intuito de diminuir o uso de animais e facilitar a pesquisa em estudos biológicos de diferente natureza (HENN *et al*, 2009). A maioria dos ensaios de ativação e sinalização de micróglia realizados *in vitro* emprega, atualmente, células da linhagem BV2, imortalizadas derivadas de células da micróglia de neonatos. Esta linhagem é muito utilizada para substituir a linhagem primária de micróglia por secretar citocinas, induzir a sinalização de MAP-kinase, capacidade fagocítica e NADPH oxidase, gerando EROs que leva a danos neuronais causados pela micróglia (GAO *et al*, 2013)

1.3 Nanotecnologia

A nanotecnologia é a ciência relativa a qualquer material, dispositivo ou processo oriundo que dê origem ou utilize produtos nanométricos. É estabelecido pela *National Science Foundation* (2000) que produtos nanotecnológicos têm, em geral, tamanhos que variam de 0,1 a 300, como a manipulação de átomos que tem aproximadamente 0,1nm, ou nanopartículas poliméricas que têm características únicas de aproximadamente 300 nanômetros em função das interações intermoleculares entre o polímero. O grande interesse na tecnologia decorre de sua aplicabilidade em diferentes domínios da ciência, resultando em inovações em diversas áreas. Inúmeros produtos derivados da nanotecnologia se encontram no comércio, dentre os quais se destacam produtos médicos, como, implantes, dispositivos para diagnósticos ou válvulas cardíacas; componentes eletrônicos;

tintas à prova de riscos; tecidos que não amassam; cremes solares; entre outros (FORTUNATO, 2005).

A área de nanobiotecnologia vem se desenvolvendo no Brasil e nos últimos anos algumas redes em nanotecnologia foram criadas, visando a maior integração de pesquisadores. Os estudos sobre essa tecnologia, bem como o depósito de patentes, têm crescido significativamente em todo o mundo (ALVES, 2005). Dados do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, indicam que existem mais de 150 empresas que desenvolvem produtos ou prestam serviços a partir de conhecimentos em nanotecnologia (NANOINVESTIMENTOS, 2011).

Nas aplicações farmacêuticas há grande interesse para a seletividade de medicamentos para o sítio alvo de ação terapêutica. Dentre os nanocarreadores estudados na área farmacêutica, as NC têm figurado como uma das mais promissoras. As NC são sistemas vesiculares heterogêneos onde o fármaco encontra-se confinado em uma cavidade aquosa ou oleosa e/ou na membrana polimérica única, que envolve tal cavidade. Dentre os fármacos que podem ser nanoencapsulados, os anticancerígenos e antibióticos têm recebido bastante interesse em vista da distribuição mais seletiva dos mesmos e, assim, do aumento do seu índice terapêutico (FORTUNATO, 2005; SARTORI, 2008; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

1.4 Nanocarreadores de fármacos

Não somente as NC, mas as nanopartículas em geral, que são definidas como compostos que possuem uma de suas dimensões em escala nanométrica, surgiram como uma proposta promissora para a administração de fármacos, uma vez que podem melhorar a biodisponibilidade de grande número de princípios ativos, devido, pelo menos em parte, pela facilidade de incorporação de moléculas à sua estrutura e tamanho reduzido (STEPHENSON *et al.*, 2004). Ademais, o uso de nanocarreadores pode permitir especificidade às células alvo, causando menor toxicidade sistêmica, uma vez que associados a marcadores de superfícies celulares podem aumentar a seletividade das terapias farmacológicas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; WONG *et al.*, 2012). Assim, muitos esforços visam a exploração de propriedades desejáveis de nanopartículas para melhorar a saúde humana, mas os estudos que investigam as propriedades terapêuticas dos mesmos, bem como seus

potenciais efeitos indesejáveis, quando administrados para fins medicinais ou após exposição involuntária durante a fabricação ou processamento para aplicações industriais, ainda são fragmentários. As mesmas propriedades que tornam as nanopartículas tão atrativas para o desenvolvimento em nanomedicina e para processos industriais podem também se revelar prejudiciais quando causam toxicidade a células vitais (ELSAESSER; HOWARD, 2012).

O comportamento *in vivo* das NC está relacionado às suas características físico-químicas. Quanto menor a partícula, maior a área superficial, maior a resistência mecânica e a atividade catalítica, portanto, maior será seu efeito farmacológico ou até tóxico se em concentrações altas ou em sítios de ação não terapêutico (FISCHER; CHAN, 2007; RIVERA GIL *et al.*, 2010). Ainda, o perfil de liberação do fármaco é influenciado pela sua localização na nanoestrutura. Desta forma, podem ser observados comportamentos cinéticos diferentes para um fármaco dissolvido no núcleo oleoso de uma NC ou simplesmente retido ou adsorvido em sua parede polimérica (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Estas características tornam os estudos *in vivo* de cinética e dinâmica essenciais para o desenvolvimento de NC para finalidade terapêutica.

Algumas nanopartículas penetram membranas biológicas, apesar dos mecanismos de transporte ainda não serem totalmente elucidados. A literatura cita que os nanocarreadores podem alcançar o meio intracelular por diferentes mecanismos de endocitose, pelo qual partículas passam do meio extracelular para o meio intracelular através de vesículas formadas durante o processo de englobamento das mesmas (CUNHA *et al.*, 2010).

A endocitose é subdividida em duas categorias, fagocitose (captação de partículas grandes, com tamanhos maiores do que 20 μM) e a pinocitose (captação de fluídos e solutos) (DOHERTY; MCMAHON, 2009).

As células que captam partículas por fagocitose, são macrófagos, neutrófilos, monócitos, células dendríticas e micróglia (ADEREM; UNDERHILL, 1999; SANDGREN *et al.*, 2010; BROWN; NEHER, 2014). Este processo é responsável pela captação dependente do receptor de grandes partículas, tais como bactérias ou agentes reconhecidos como antígenos, como moléculas opsonizadas.

A pinocitose ocorre em todos os tipos de células e tem diversas formas, dependendo da função e origem. Portanto, são propostas várias classificações de pinocitose, baseadas nas proteínas envolvidas nas vias de captação, a saber: 1.

pinocitose dependente de clatrina: a clatrina é uma estrutura organizadora para as proteínas que fazem o direcionamento de receptores, formando uma rede de proteínas que reveste as vesículas endocíticas. Essa via é responsável pela captação de nutrientes, colesterol captado pelo receptor de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) ou o ferro carregado pela transferrina e captado pelo receptor de transferrina na célula; 2. pinocitose mediada por caveolina: cavéolas são vesículas celulares formadas por proteínas, dentre elas a caveolina. As caveolinas estão predominantemente localizadas nos tecidos muscular, adiposo em fibroblastos e células endoteliais e tem funções celulares como metabolismo de colesterol, crescimento celular e apoptose. As cavéolas são um subconjunto de microdomínios lipídicos e funcionam na membrana celular como uma plataforma onde proteínas se fixam e são transportadas dentro da dupla camada lipídica (SIMONS; IKONEN, 1997). As vesículas tem tamanho em torno de 60 a 80 nm e transportam moléculas que se ligam a superfície de caveolinas (SAHAY *et al.*, 2010); 3. macropinocitose: esta classificação de endocitose é iniciada pela ativação do receptor tirosino-quinase por fatores de crescimento ou por bactérias, células apoptóticas ou necróticas ou vírus. A ativação do receptor inicia uma cascata de sinalização que realiza a mudança nos microfilamentos de actina, responsáveis pela alteração morfológica da membrana e por internalizar o fluido formando grandes vacúolos, denominados macropinosomos (0,5 a 10 μm) (MERCER; HELENIUS, 2009). A macropinocitose ocorre em praticamente todas as células, com exceção de células endoteliais de microvasos cerebrais (SAHAY *et al.*, 2010).

Uma vez absorvidos, os nanofármacos alcançam a corrente sanguínea e podem sofrer degradações pelo sistema de defesa, mas essa interação com o sistema imune pode variar de acordo com as propriedades das nanopartículas (tamanho de partícula, forma, carga de superfície, etc.) e, ainda, com o tipo de célula de defesa em questão (FERRARI, 2005). Adicionalmente, a interação entre as células e alguns tipos de nanopartículas é influenciada pelas proteínas do plasma, que podem revestir as nanopartículas, permitindo que as mesmas circulem pela corrente sanguínea sem serem reconhecidas como um organismo estranho pelo sistema imunológico (KUNZMANN *et al.*, 2010).

Com base no descrito acima, a aplicação dos nanofármacos é uma estratégia relevante na terapêutica, no entanto, estudos mais criteriosos devem ser realizados para a aplicação segura destes agentes.

1.4.1 Abordagem nanotecnológica para o tratamento de doenças do SNC: BHE

Como já salientado anteriormente, o transporte de um fármaco no interstício é governado por propriedades fisiológicas e físicas (composição e estrutura de carga) do interstício e pelas propriedades físico-químicas próprias das moléculas (tamanho, configurações, carga e hidrofobicidade) (BRIGGER *et al.*, 2002).

No tumor, as alterações hemodinâmicas, caracterizadas pelo aumento da vascularização vasodilatação e aumento de permeabilidade vascular, facilitam tanto a migração de células sanguíneas, mas também o provimento de quimioterápicos, por um transporte conhecido como passivo (ALLAVENA *et al.*, 2008; MANTOVANI *et al.*, 2008). De fato, o mecanismo de acumulação de nanopartículas de por transporte passivo se baseia em difusão, sem gasto de energia e se inicia devido a interações entre as partículas com potencial Zeta com carga oposta a da membrana celular, sendo então imediatamente inseridas na célula (XU *et al.*, 2008).

A permeação pode também resultar de um reconhecimento específico das nanopartículas, direcionadas ao sítio ativo, que pode ser conseguido com o uso, por exemplo, de anticorpos acoplados às nanopartículas e direcionados a antígenos presentes exclusivamente ou em maior quantidade no tumor (BRIGGER *et al.*, 2002).

No entanto, no caso específico de tratamentos para doenças cerebrais, o mecanismo exato pelo qual as nanopartículas atravessam a BHE ainda não está completamente estabelecido; no entanto, inúmeros mecanismos são sugeridos para explicar o fato das substâncias veiculadas em nanocarreadores conseguirem atingir concentração terapêutica no cérebro. Dentre estes mecanismos, estão: a) aumento da retenção de substância ativa nos capilares sanguíneos do cérebro, associado ao aumento de transporte, estimulando a fluidificação da membrana da BHE; b) abertura das “tight junctions”; e c) endocitose seletiva pelas células que revestem os capilares sanguíneos do cérebro, seguida de liberação tecidual (BALBUS *et al.*, 2007; MISTRYA *et al.*, 2009).

Nesse sentido, o emprego de nanopartículas tem se mostrado bastante eficaz no tratamento de tumores no cérebro. De fato, FIGUEIRÓ e colaboradores (2013) demonstraram que nanocápsulas de núcleo lipídico carreando resveratrol, quando administrado por via intraperitoneal (I.P.), diminuíram significativamente o

crescimento de glioma quando comparado ao tratamento com o fármaco livre. Da mesma forma, BERNARDI e colaboradores (2013) observaram efeito antiproliferativo em células de glioma da linhagem C6 e U138-MG quando tratadas com nanocápsulas de núcleo lipídico contendo indometacina; e em outro estudo, os mesmos autores demonstraram que LNC contendo indometacina também foi eficaz no tratamento de glioblastoma induzido em ratos (BERNARDI *et al.*, 2009). Ademais, foi observado, em ensaio realizado por HEKMATARA e colaboradores (2009), efeito antitumoral pelo tratamento com nanopartículas de doxorubicina significativamente melhor do que a doxorubicina em solução. Neste caso, a nanopartícula de doxorubicina diminuiu o tamanho do glioma com menor proliferação das células tumorais, e reduziu a área necrótica. Ainda, resultado semelhante foi encontrado por ZANOTTO-FILHO e colaboradores (2013) com curcumin nanoencapsulado, que levou a redução de hemorragias intratumorais, necrose, infiltrados linfocíticos, sugerindo, então, a redução do glioma em relação ao fármaco livre ou ao grupo não tratado. Mais recentemente, dados do nosso grupo de pesquisa mostram que LNC contendo ester de indometacina é mais eficaz para o tratamento do GBM em camundongos que a solução de indometacina comercial, quando os animais foram tratados por via oral (Rodrigues *et al.*, submetido a publicação).

Em conjunto, os dados descritos acima sugerem que as LNC são estratégias promissoras para o tratamento de doenças cerebrais.

1.5 Metotrexato (MTX)

Como já salientado, a quimioterapia é uma das principais estratégias para o tratamento de diversos tipos de câncer, tendo sido usada com sucesso para prolongar a vida dos pacientes. No entanto, acompanhado dos seus efeitos benéficos, muitas reações adversas, invariavelmente, limitam a sua utilização (DIETRICH *et al.*, 2008).

Os agentes antineoplásicos intervêm no material genético, inibindo, limitando ou corrigindo as aberrações da reprodução celular. O ideal da quimioterapia antitumoral é a destruição total de uma neoplasia, ou seja, seu emprego como terapia radical, quando se obtém a destruição local das células cancerosas. Neste caso, é necessário aumentar a dose do fármaco para o limite máximo tolerado pelo indivíduo, ou iniciar o tratamento enquanto o número de células ainda for

suficientemente pequeno para permitir a destruição tumoral com doses de fármacos razoavelmente toleráveis (DELUCIA *et al.*, 2007).

O MTX, também chamado de ametofterina, é um fármaco citotóxico que vem sendo utilizado desde 1940 no tratamento de tumores sólidos, mas principalmente no tratamento de leucemia linfoblástica aguda, além de leucemia meníngea, meningite carcinomatosa, coriocarcinoma, tumores trofoblásticos em mulheres, osteosarcoma, linfomas de Burkitt e não-Hodgking, carcinomas de mama, pescoço, ovário e bexiga e, mais recentemente, como um agente imunossupressor em transplantes de órgãos e no tratamento de doenças autoimunes, como reumatismo e psoríase, além de ser utilizado também na terapia de asma severa (ALISSON, 2000; GOODMAN; GILMAN, 2001; RUBINO, 2001).

O MTX é transportado para o meio intracelular através de um transportador de folato reduzido, e é sujeito à formação de poliglutamatos intracelulares pela ação da FPGS. Neste processo, cerca de seis moléculas de glutamato são adicionadas para a formação de poliglutamatos de MTX. Estes poliglutamatos são hidrolisados pela enzima folilpoliglutamil hidrolase. A formação de poliglutamatos do MTX aumenta sua retenção intracelular e os metabólitos destes aumentam significativamente o tempo de retenção celular e a potência do fármaco como inibidor da enzima AICAR. Os tecidos com maior atividade metabólica e com maior crescimento celular são os mais afetados pelo fármaco (GENESTIER, 2000).

As principais reações de hipersensibilidade ao MTX incluem anafilaxia, urticária, vasculite cutânea, anemia hemolítica, citopenia e hepatite. Tais efeitos ocorrem devido à metabolização do fármaco no fígado e rim, e também à inespecificidade do MTX em relação às células alvo, pois este fármaco afeta principalmente as células de rápida proliferação, como as do trato gastrointestinal, testículos, mucosas, bexiga e linfócitos (GENESTIER *et al.*, 2000).

O MTX, devido ao seu índice terapêutico estreito e, portanto, alto potencial de toxicidade, deve ter administração e acompanhamento criteriosos, necessitando de avaliação tanto da eficácia, quanto da tolerância e toxicidade em decorrência de sua utilização terapêutica.

Um fármaco como o MTX, que interfere com múltiplos sistemas do organismo, terá presumivelmente muitos efeitos adversos, como, de fato, acontece, principalmente ao atingir altas concentrações plasmáticas, se tornando capaz de atravessar barreiras lipídicas, como a BHE. Ainda assim, entre 30 a 80% dos

doentes apresentam algum efeito adverso após tratamento com MTX em baixas doses. A probabilidade de abandono do tratamento ao fim do primeiro ano é de 30%, e a razão principal são os seus efeitos adversos (NEVES *et al.*, 2009).

Atualmente, a eficácia anti-inflamatória do MTX está amplamente documentada em tratamentos de artrite reumatoide, com baixo custo e perfil de segurança aceitável por ser administrados em baixas doses. Como quimioterápico (altas doses), a adesão ao tratamento é muito baixa por causa da grande variedade de efeitos adversos e baixa qualidade de vida durante o tratamento. Ainda, as concentrações plasmáticas durante o tratamento sofrem variações como interações com outros fármacos, desidratação do paciente, insuficiência renal ou hepática, obesidade e idade do paciente, dificultando a monitorização da dosagem (ATAÍDE, 2003; HALLWORTH; CAPPS, 1993).

Em vista das dificuldades encontradas para a eficácia terapêutica do MTX, um tratamento que o direcione ao local de ação, em menores doses do que em uma quimioterapia convencional, será muito relevante para a farmacoterapia anticarcinogênica e considerando a crescente prevalência de GBM, bem como a ausência de tratamentos eficientes devido, pelo menos em parte, a baixa taxa de permeabilidade da BHE para medicamentos, a investigação de novas formulações farmacêuticas que aumentem a entrega de antineoplásicos para o SNC é de suma importância para a eficácia do tratamento do GBM.

2 OBJETIVOS

Este trabalho visou avaliar a eficácia de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo MTX para o tratamento de modelo experimental glioblastoma murino, focando os mecanismos de permeação *in vitro*, causando efeito citotóxico em linhagens de célula tumoral GL261 e de micróglia BV2, bem como em ensaios *in vivo* e sua capacidade de atravessar a BHE sendo eficaz para o tratamento do GBM.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a realização dos experimentos, foram utilizadas camundongos C57BL/6 fêmeas, adultas (6 a 8 semanas), com peso entre 20-25 g.

Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Todos os animais foram mantidos em condições normais de temperatura e umidade até o início dos experimentos (22-24°C, 40-60% de umidade) e todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA; Protocolo: 402). Antes e durante os experimentos, os animais foram anestesiados por via I.P., com solução de quetamina e xilazina, nas doses de 80 mg/kg e 8 mg/kg, respectivamente.

3.2 Obtenção das formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo ou não metotrexato

As suspensões de LNC contendo MTX foram fornecidas pelo grupo de pesquisa das professoras Dr. Adriana Raffin Pohlmann, do Instituto de Química, e da Dr. Silvia Stanisçuaski Guterres, da Faculdade de Farmácia, ambas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, os resultados de produção e caracterização das formulações fazem parte da tese de doutorado e publicação da aluna Catiúscia Oliveira (OLIVEIRA *et al*, 2013).

Poli(ϵ -caprolactona) (PM = 14.000 KDa, α,ω -hidroxilada) (PCL) e Span 60 (monoesterato de sorbitano) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (TCC) e Tween 80 (polissorbato 80) da Delaware (Porto Alegre, RS, Brasil); e MTX, da empresa Pharma Nostra (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

As formulações foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado em condições previamente estabelecidas (VENTURINI *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Para isso, a fase orgânica de cada formulação foi preparada contendo polímero (PCL) (0,100 g), monoesterato de sorbitano (0,038 g)

e TCC (0,160 g), solubilizados em 27 mL de acetona, em agitação constante, a 40°C. A fase aquosa foi preparada separadamente, por meio da dispersão do polissorbato 80 (0,077 g) em água (53 mL). A fase orgânica foi vertida continuamente, através de um funil, na solução aquosa, sob agitação. Após 10 minutos de agitação, a mistura foi levada a evaporador rotatório, o solvente orgânico foi removido e a suspensão concentrada, sob pressão reduzida, para o volume final de 10 mL. Para a preparação das formulações contendo MTX (0,0025 g), este foi adicionado na fase orgânica das formulações. A formulação contendo polímero marcado com rodamina B ($\text{LNC}^{\text{PCL-Rod B}}_{\text{MTX}}$) foi preparada pela metodologia acima descrita, entretanto 0,007 g de PCL foram substituídas por PCL-Rod B. As formulações foram denominadas conforme a composição de polímero e fármaco presentes em cada formulação (**Tabela 1**). Os compostos sem MTX foram denominados $\text{LNC}^{\text{Branca}}$. Para os ensaios de toxicidade *in vitro*, o material utilizado foi previamente esterilizado e, para os ensaios *in vitro*, os tratamentos LNC MTX, $\text{LNC}^{\text{Branca}}$, Solução de MTX e Salina foram esterilizados com filtro de 0,22µm sob baixa pressão.

Tabela 1: Composição qualitativa e quantitativa das Formulações:

Nanocápsulas lipídicas (LNC) sem fármaco ($\text{LNC}^{\text{Branca}}$), LNC contendo metotrexato (LNC MTX) e LNC MTX marcada com rodamina ($\text{LNC}^{\text{PCL-Rod B}}_{\text{MTX}}$).

Componentes	$\text{LNC}^{\text{Branca}}$	LNC MTX	$\text{LNC}^{\text{PCL-Rod B}}_{\text{MTX}}$
PCL	0,100 g	0,100 g	0,093 g
PCL-Rod B	-	-	0,007 g
Monoestearato de sorbitano	0,038 g	0,038 g	0,038 g
TCC	0,160 g	0,160 g	0,160 g
Metotrexato	-	0,0025 g	0,0025 g
Acetona	27 mL	27 mL	27 mL
Polissorbato 80	0,077 g	0,077 g	0,077 g
Água MilliQ	53 mL	53 mL	53 mL
Volume final	10 mL	10 mL	10 mL

PCL: Poli(ϵ -caprolactona); PCL-Rod B: Poli(ϵ -caprolactona) marcada com Rodamina B; - ausência. Resultados obtidos do projeto de doutorado da aluna Catiúscia Oliveira PPGCF-UFRGS.

Tabela 2: Caracterização físico-química das formulações:

Nanocápsulas lipídicas (LNC) sem fármaco (LNC^{Branca}), LNC contendo metotrexato (LNC MTX) e LNC MTX marcada com rodamina (LNC^{PCL-Rod B_{MTX}}) por medida do pH, potencial zeta, difração de laser (DL), espectroscopia de correlação de fótons, rastreamento de partículas, teor e eficiência de encapsulação.

Análise	LNC^{Branca}	LNC MTX	LNC^{PCL-Rod B_{MTX}}
pH	5,85 $\pm$ 0,67	5,01 $\pm$ 0,43	5,03 $\pm$ 0,27
Potencial Zeta (mV)	- 10,8 $\pm$ 5,5	- 9,4 $\pm$ 2,1	- 8,9 $\pm$ 1,7
D[4,3] (nm)	201 $\pm$ 8	214 $\pm$ 18	236 $\pm$ 88
SPAN	1,8 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,2
Ase (m ² /g)	41,6 $\pm$ 1,7	40 $\pm$ 2,1	39,1 $\pm$ 13,4
Z-average (nm)	187 $\pm$ 7	192 $\pm$ 6	189 $\pm$ 8
PDI	0,1 $\pm$ 0	0,1 $\pm$ 0	0,1 $\pm$ 0
Diâmetro médio (nm)	190 $\pm$ 10	216 $\pm$ 6	209 $\pm$ 4
D50 (nm)	182 $\pm$ 10	206 $\pm$ 6	199 $\pm$ 4
D90 (nm)	263 $\pm$ 10	295 $\pm$ 11	294 $\pm$ 17
NP (partículas/mL)	5,34x10 ¹² $\pm$ 0,37x10 ¹²	4,90x10 ¹² $\pm$ 0,36x10 ¹²	5,06x10 ¹² $\pm$ 0,09x10 ¹²
Teor MTX (mg/mL)	-	0,251 $\pm$ 0,014	0,252 $\pm$ 0,008
EE (%)	-	46,65 $\pm$ 5,68	44,48 $\pm$ 6,38

D[4,3]: diâmetro médio de esfera equivalente; SPAN: polidispersão; Ase: área de superfície específica; Z-average: diâmetro médio; PDI: índice de polidispersão; D50: diâmetro de 50% de partículas; D90: diâmetro de 90% das partículas; NP: número de partículas; EE: eficiência de encapsulação. Resultados obtidos do projeto de doutorado da aluna Catiúscia Oliveira PPGCF-UFRGS.

Diluições dos tratamentos *in vitro*:

O volume de LNC MTX e Sol MTX adicionados ao poço foi de 0,1 e 1%, que correspondem a 550nM e 5500nM de MTX, e no tratamento com LNC^{Branca} foi adicionado volumes equivalentes ao tratamento com LNC MTX.

Dose e concentração do tratamento *in vivo*:

Para os tratamentos *in vivo* foram administrados 300 μ L de LNC MTX equivale a dose de 71,7mg/kg ou a concentração de 0,16 mM de MTX presente na formulação.

3.3 Cultura de células GL261 e BV2

A linhagens de células de glioma murino GL261 e de micróglia BV2 foram cultivadas em atmosfera úmida, a 37°C, contendo 5% de CO₂. As células GL261 foram mantidas em meio RPMI (RPMI 1640, Vitrocell, Campinas, SP), suplementado com SFB (Gibco®, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) a 10% (R10) e as células BV2 foram mantidas em meio RPMI com 10% de soro de bezerro (Calf-Serum, CS; SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, EUA) (R10 CS). As células foram coletadas por tripsinização (tripsina a 0,25%) e os experimentos realizados entre a 5ª e 6ª passagens, após descongelamento dos tubos.

3.4 Mecanismo de captação das LNCPCL-Rod BMTX pelas células GL261 e BV2 em microscópio de fluorescência.

3.4.1 Tempo de captação das LNCPCL-Rod BMTX pelas células BV2

As células BV2 (2000 células) foram semeadas em lamínulas estéreis (13 mm) e mantidas em meio RPMI contendo 10% de soro de bezerro (CS) até atingirem a confluência. A seguir, após adesão celular, as lamínulas foram lavadas com PBS (Tampão de Salina Fosfatada) (NaCl 8,18%; NaH₂PO₄.H₂O 0,35%; NaHPO₄.7H₂O 1,98% e H₂O destilada) e incubadas durante 1, 5, 20, 40 ou 60 minutos a 37°C com solução fisiológica de Hanks balanceada (HBSS) contendo LNC^{PCL-Rod B_{MTX}} (5500nM de MTX).

Para marcação do núcleo, as células foram incubadas por 5 minutos, à 37°C, com 5% de CO₂, com solução DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), a 3%.

Após as incubações, as células foram lavadas (PBS, 3 vezes), recobertas com HBSS (21° C), e as imagens das células aderidas à lamínula foram obtidas em microscópio de fluorescência, utilizando os filtros para Rodamina (Ex:540nm, Em: 640nm) e DAPI (Ex:360nm, Em: 460nm). As imagens foram analisadas utilizando o software Zen 2012 (versão 1.1.1.0, Carl-Zeiss, Göttingen, Alemanha) e a intensidade média de fluorescência vermelha foi quantificada por densidade óptica (unidades arbitrárias) para comparação da entrada de LNC^{PCL-Rod B_{MTX}} nas células. Os

resultados estão demonstrados em porcentagem, em comparação ao controle (células incubadas com HBSS).

3.4.2 Avaliação dos Mecanismos de Endocitose

Para avaliar os mecanismos envolvidos na endocitose das LNC MTX, o mesmo procedimento citado no item 3.4.1 foi repetido nas linhagens GL261 e BV2, seguido de incubação das células (60 minutos a 37° C) com HBSS, em diferentes poços contendo os bloqueios específicos: Sacarose 0,5M; Citocalasina D 10 mM; Ciclodextrina 5 mM; Amilorida 1mM e Azida sódica 15mM.

Em outra etapa, as células foram incubadas à temperatura de 4°C para avaliar a endocitose das LNC, pois nesta temperatura a atividade metabólica da célula é diminuída, assim como a permeabilidade da membrana celular (MAO, *et al*, 2005).

Em seguida, as células foram incubadas com HBSS contendo os bloqueios e LNC^{PCL-Rod B_{MTX}} (5500nM). Para marcação do núcleo, as células foram incubadas por 5 minutos, à 37°C, 5% de CO₂, com solução DAPI a 3%. Após as incubações, as células foram lavadas (PBS, 3 vezes), recobertas com HBSS (21° C) e imagens da fluorescência emitida foram obtidas utilizando microscópio de fluorescência. As imagens foram analisadas em software Zen 2012 (versão 1.1.1.0, Carl-Zeiss, Göttingen, Alemanha) e a densidade óptica foi determinada como unidade arbitrária. A captação da LNC^{PCL-Rod B_{MTX}} no grupo controle positivo foi considerada como máxima (100%) e os bloqueios calculados como porcentagem de captação em relação ao grupo controle.

3.5 Ensaio de proliferação celular

As células das linhagens GL261 e BV2 foram semeadas numa placa de 96 poços em 100µL de meio de cultura, R10 e R10 CS, respectivamente, a uma densidade de 5000 células por poço. Utilizou-se uma placa para o tempo zero (Tz), 3 placas para os tempos estudados (para ensaio de 48h).

Após o plaqueamento, as células foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 24h. Após 24h, a placa Tempo Zero (Tz) foi fixada pela adição de 20µL de Ácido

Tricloroacético (ATA) a 50% a 4° C (concentração final de 10%) e incubada por 60 minutos a 4°C.

Nas placas restantes, as células foram tratadas com uma diluição logarítmica (3×10^{-4} , 1×10^{-4} , 3×10^{-5} , 1×10^{-5} , 3×10^{-6} , 1×10^{-6} , 3×10^{-7} , 1×10^{-7} , 3×10^{-8} , 1×10^{-8}) equivalentes às concentrações (300; 100; 30; 10; 3; 1; 0,3; 0,1; 0,03; 0,03 µM) de LNC MTX ou Sol MTX e com LNC ^{Branca}, diluídos com meio R10 ou R10 CS. Para o tratamento LNC ^{Branca} utilizou-se volumes equivalentes às concentrações de MTX nas formulações. Foram incubadas por 48h, 72h ou 96h, a 37°C e 5% CO₂. Após o tempo de incubação, a placa foi fixada com ATA e incubada por 60 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado, a placa lavada 5 vezes com água da torneira e secadas a temperatura ambiente..

Após secas, adicionou 100µL de uma solução de sulforodamina B 0,4% diluída em ácido acético 0,1% em cada poço, e as placas foram incubadas por 10min, à temperatura ambiente. Após a coloração com sulforodamina B, a coloração inespecífica foi removida lavando as placas 5 vezes com uma solução de ácido acético 0,1% e estas foram secas a temperatura ambiente. A coloração foi solubilizada pela adição de 100µL de trizma base (100mM), e a absorbância medida num leitor de placa de ELISA a 515nm.

Usando as medidas da absorbância (tempo zero (Tz), controle (C) e os testes de crescimento com os tratamentos em diferentes concentrações (Ti)) a porcentagem de inibição do crescimento celular foi calculada:

$$[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100 \text{ para concentrações nas quais } Ti \geq Tz$$

$$[(Ti-Tz)/Tz] \times 100 \text{ para concentrações nas quais } Ti < Tz$$

O software GraphPad 4.0 foi utilizado para o cálculo do IC50, empregando o cálculo estatístico da curva de dose-resposta sigmoideal de cada tratamento, indicando a sensibilidade aos tratamentos, expressa na concentração de fármaco que causou a inibição do crescimento de 50% das células (IC50%).

3.6 Curva de Crescimento celular

Para avaliar o efeito das LNC MTX sobre a proliferação das células da linhagem GL261 e BV2, 5×10^2 células foram semeadas em placas de 24 poços. Após 24 horas, as células foram incubadas contendo LNC MTX (550nM ou 5500nM), solução de MTX (550nM ou 5500nM) ou com os respectivos meios de cultura (R10

ou R10 CS), para determinação da concentração inibitória eficaz. Diariamente, durante 4 dias seguidos, o meio de cultura foi descartado, as células foram destacadas da placa, utilizando tripsina (0,25%, por 5 minutos) e centrifugadas (600 g, por 10 minutos). O número de células viáveis foi contado em hemocítômetro e as células não viáveis foram excluídas pelo método de azul de Trypan.

3.7 Teste de viabilidade com iodeto de propídeo e ANXA V

Para avaliar os efeitos das LNC MTX sobre a viabilidade celular, as células da linhagem GL261 e BV2 (2×10^4) foram semeadas em placas 24 poços. Após adesão, as células foram incubadas por 48 horas com meio de cultura (R10 ou R10 CS), contendo os seguintes tratamentos: Controle (R10 ou R10 CS), LNC MTX 550nM, LNC MTX 5500nM, solução de MTX 550nM ou solução de MTX 5500nM (n=4, duplicata). Após o término dos tratamentos, as células foram destacadas com tripsina (a 0,25%, por 5 minutos), homogeneizadas, transferidas para tubos de citometria e centrifugadas (600 g; por 10 min; a 4°C). As células foram incubadas com 50µL de anticorpo anti-anexina V conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC; BD Biociences), e 10µL de iodeto de propídeo (IP) (Sigma-Aldrich), por 20 minutos, a 4°C. Em seguida, foi avaliada a intensidade de fluorescência do IP e da ANXA V em 10.000 eventos celulares empregando citômetro de fluxo FACSCanto® (Becton Dickinson®, Franklin Lakes, New Jersey, EUA). A análise dos resultados foi realizada utilizando o software FlowJo (Tree star, Inc., Ashland, TN, EUA).

A anexina V é uma proteína com propriedades de ligação à fosfatidilserina. Em células normais a fosfatidilserina está localizada na região interna da membrana plasmática. No processo de apoptose, a fosfatidilserina é translocada para a região externa da membrana, ficando exposta a marcadores celulares como a anexina-V. Entretanto, recomenda-se a utilização de IP, que atravessa a membrana de células necrosadas, ou em estágio tardio de apoptose, permitindo a diferenciação entre os processos de apoptose e necrose. As células vivas não serão marcadas nem por anexina V, nem por IP.

3.8 Determinação da fragmentação do DNA e ciclo celular

Para a análise concomitante de fragmentação do DNA e ciclo celular, as células da linhagem GL261 e BV2 (2×10^4 células) foram semeadas e incubadas por 48 horas com meio de cultura R10 ou R10 CS, respectivamente, contendo os seguintes tratamentos: Controle (R10 ou R10 CS), LNC MTX 550nM, LNC MTX 5500nM, solução de MTX 550nM ou solução de MTX 5500nM. Após o término dos tratamentos, as células foram destacadas com tripsina (a 0,25%, por 5 minutos), homogeneizadas em meio R10 ou R10 CS, transferidas para tubos de citometria e centrifugadas (600 g; por 10 min; 4°C). O sobrenadante foi desprezado e foi adicionado a cada tubo, 50µL de uma solução contendo a enzima RNase A (15 mg/mL) e 150µL do tampão hipotônico fluorescente (PBS, 2% SFB, 0,05 % Triton-X100, 550nM de citrato de sódio, 25µg/mL de IP). As amostras foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente e avaliada a intensidade de fluorescência de IP ligado ao DNA de 10.000 eventos por amostra, empregando citômetro de fluxo FACSCanto® (Becton Dickinson®).

3.9 Passagem das LNC MTX através da BHE: Microscopia intravital de vasos piais

Os animais foram anestesiados e um cateter inserido (PE/1, Scientific Commodities, Franklin Lakes, NJ, EUA) na veia femoral, para a infusão dos tratamentos. Em seguida, o camundongo C57Bl/6 fêmea foi colocado em uma base acrílica, em posição esfíngea, sob um estereoscópio (Axio Imager A2, Carl-Zeiss, Göttingen, Alemanha) e foi feita uma incisão mediana na pele para exposição do osso parietal direito da calota craniana seguido de craniotomia. Para a craniotomia, utilizou-se uma broca cirúrgica (Fine Science Tools, Foster City, CA, EUA) para remoção parcial do osso parietal direito (de diâmetro igual a 2,5 mm), na posição 2 mm lateral a linha média e 2 mm posterior ao bregma, havendo-se o cuidado de evitar qualquer comprometimento do córtex cerebral, possibilitando a perfeita visualização dos vasos piais. O animal foi, então, posicionado sob um segundo microscópio, dotado de filtros de fluorescência (Axio Imager A2, Carl-Zeiss, Göttingen, Alemanha), visando a microscopia por epi-iluminação do tecido exposto (VANHEULE *et al.*, 2008). O tecido foi mantido úmido por irrigação com líquido cérebro-espinhal artificial (CSF: pH= 7,2–7,4; NaCl 132 mM; KCl 3 mM; CaCl₂.2H₂O

1,3 mM; NaHCO₃ 24,6 mM; MgCl₂.9H₂O 0,5 mM; uréia 6,7 mM; glicose 3,7 mM) à temperatura de 37°C e coberto com uma lâmina de vidro de 12 mm de diâmetro (Fisherbrand, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA), para observação ao microscópio. As imagens foram capturadas em câmera de vídeo (AxioCam HRc, Carl-Zeiss, Göttingen, Alemanha) e armazenadas em HD externo. Foi utilizada objetiva de imersão em água, de 40X. Ao final, foi realizada análise semi-quantitativa para determinação da densidade óptica da região de interesse (expressa em unidades arbitrárias), utilizando o software Zen 2012 (versão 1.1.1.0, Carl-Zeiss, Göttingen, Alemanha).

Foram observadas e quantificadas LNC^{PCL-Rod-B}_{MTX} presentes na microcirculação cerebral. Estas observações foram realizadas em diferentes intervalos de tempo após a administração oral (1 ou 2 horas) ou IV (10, 30, 60 ou 120 min). Quantificou as fluorescências no interior (li, “intensity inside”) e exterior dos vasos (lo, “intensity outside”). A partir desses valores, foi obtida a intensidade de fluorescência óptica relativa, utilizada para apresentação dos resultados após administração IV, segundo a seguinte fórmula:

$$\Delta I = \frac{1 - (I_i - I_o)}{I_i}$$

3.10 Integridade da barreira hematoencefálica

Solução de azul de Evans (Sigma-Aldrich) a 2% foi injetada IV, imediatamente após a administração das LNC de MTX ou seus respectivos veículos. Vinte e quatro horas depois, o sangue foi coletado para separação do plasma, seguido da coleta do cérebro, após perfusão transcardíaca com PBS (à pressão de perfusão de 100 mmHg, por 5 minutos). Os hemisférios cerebrais, bem como o plasma, foram homogeneizados em ácido tricloroacético a 50%, sonificados e, então, centrifugados a 10.000 rpm durante 20 minutos.

O sobrenadante foi diluído em etanol e as concentrações de azul de Evans foram medidas, utilizando um espectrofotômetro de fluorescência (absorção: 620nm; emissão: 680nm) (FLUOstar Optima; BMG LABTECH, Inc., Ortenberg, Alemanha). A permeabilidade da BHE foi normalizada, dividindo-se a concentração de azul de Evans no tecido (µg/g de massa cerebral) pela concentração no plasma (µg/g de plasma).

3.11 Implante de glioblastoma murino.

O implante do tumor foi realizado por injeção intracraniana de uma suspensão contendo 2×10^7 células de glioma GL261, no volume de 2 μL . Para tanto, seguindo-se anestesia, a cabeça do camundongo foi rigidamente fixada na posição prona e realizada incisão vertical da pele que recobre o crânio para exposição da sutura coronal e bregma. Um pequeno orifício foi feito no crânio utilizando uma broca cirúrgica (Fine Sciences Tools, Foster City, CA, EUA) em um ponto localizado 2 mm a direita da sutura sagital mediana e 2 mm posterior a sutura coronal. Utilizando uma agulha de 26 gauge, 2 μL de solução contendo as células de glioma (em concentração igual a 1×10^7 células/ μL) foram injetadas a uma profundidade de 2 mm da superfície do cérebro, durante um intervalo de 2 minutos, utilizando um sistema de microinjeção acoplado a um aparelho esterotático (Automated Multisite Microinjection System with InjectoMate, Neurostar, Sindelfingen, Alemanha). A agulha foi removida 10 minutos após o término da injeção das células, seguida do preenchimento da janela craniana com cimento odontológico (Fillcanal, Technew, Rio de Janeiro, RJ) e sutura simples para fechar a incisão da pele. O procedimento completo foi realizado com material estéril. Cetoprofeno, fármaco analgésico, foi administrado (via intra muscular, 2 mg/kg) (Biofen 1%, Biofarm, Jaboticabal, SP) ao término da cirurgia.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos de acordo com o tratamento; Salina, LNC MTX ou solução de MTX e foram administradas por via oral na concentração de 0,16 mM de MTX ou volume equivalente a essa concentração a cada 2 dias, durante 10 dias. A formulação usual de MTX e os seus respectivos controles foram administrados em doses e condições equivalentes às administradas nas formulações de LNC.

Os animais inoculados com tumor intracerebral em tratamento foram observados a intervalos de 48h, por sinais de típicos da doença, como hipoatividade, emagrecimento, paralisia, desconforto respiratório. Se o animal apresentasse sinais de desconforto respiratório importante, indicando morte iminente (gaspings), este era eutanasiado com perfusão intracardíaca após anestesia e o tecido tumoral era coletado.

3.11.1 Medida do volume tumoral

Após 10 dias de tratamento com LNC MTX, Solução de MTX e Salina, os animais foram anestesiados e perfundidos transcordialmente com PBS 1X (à pressão de perfusão de 100 mmHg, por 5 minutos), e os cérebros coletados.

Cortes coronais com diâmetro de 2 mm a partir de uma base acrílica (Auto Acrylic Matrices, World Precision Instruments, Sarasota, FL, EUA) e lâminas de aço foram realizados.

Os segmentos cerebrais contendo o tumor foram digitalizados, com *scanner* (Epson Stylus TX235W, Manaus, Brasil), e o volume tumoral foi calculado mediante soma das áreas ocupadas pelo tumor nos diferentes segmentos, sendo expresso como porcentagem do tumor em relação ao tamanho do hemisfério cerebral total. As áreas do tumor e hemisférios foram analisadas por software Image J 1.48V (NIH, EUA).

3.12 Análise estatística

Os resultados obtidos foram apresentados como média $\pm$ e.p.m. e analisados estatisticamente pela análise de variância com comparações múltiplas (ANOVA), seguido do teste de Tukey-Kramer (uma via), ou pelo teste Bonferroni (duas vias), quando necessário. O programa GraphPad Prisma versão 5.00 (GraphPad Prism Software Inc, 2007) foi utilizado para conduzir as análises estatísticas.

4 RESULTADOS

4.1 Captação das LNC^{PCL-Rod B}_{MTX} pelas células BV2 e GL261

4.1.1 Tempo de captação das LNC MTX pelas células BV2

Avaliou-se o tempo necessário para captação LNC^{PCL-Rod B}_{MTX} pelas células BV2, incubando-as por 1, 5, 20, 40 ou 60 minutos. Observamos a presença das LNC^{PCL-Rod B}_{MTX} agrupadas em grânulos no citoplasma das células, sem marcação do núcleo. A localização do núcleo foi confirmada após incubação com DAPI. Os dados obtidos mostraram, ainda, que a permeação das LNC MTX foi tempo dependente, com aumento significativo de captação após 60 minutos (**Figura 1**). Em conjunto, as imagens obtidas mostraram que as LNC MTX são captadas pela células BV2, permanecendo no citoplasma.

Figura 1: Captação das LNC^{PCL-Rod B}_{MTX} pelas células BV2.

A) gráfico de barras demonstra a intensidade de fluorescência emitida pelas LNC^{PCL-Rod B}_{MTX} dentro das células nos tempos de 1, 5, 20, 40 ou 60 minutos de incubação. B) Fotos representativas das células de linhagem BV2 incubadas com LNC^{PCL-Rod B}_{MTX}. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m. de três experimentos realizados em triplicata. ANOVA de uma via. * $P < 0,001$ Vs 1 min.

4.1.2 Mecanismos de captação das LNC^{PCL-Rod B}_{MTX} pelas células de linhagem GL261 e BV2.

Com o objetivo de investigar os mecanismos envolvidos na captação celular das LNC, células GL261 e BV2 foram incubadas com fármacos que bloqueiam os diferentes tipos de transportes celulares (Citocalasina D, Sacarose, Amilorida, Ciclodextrina, Azida sódica, além da incubação à temperatura de 4°C, que inibe o metabolismo celular). A análise dos resultados das incubações com as células GL261 mostrou diminuição significativa da captação das LNC^{PCL-Rod B}_{MTX} na presença dos bloqueios farmacológicos com Ciclodextrina (12,41%), Azida Sódica (39,30%) ou pela incubação a 4°C (59,09%) comparados ao controle (100%) (células incubadas com meio R10 e LNC^{PCL-Rod B}_{MTX} a 5500nM) (**Figuras 2 e 3**).

O mesmo ensaio realizado com as células BV2 indicou que houve bloqueio significativo da captação da LNC^{PCL-Rod B}_{MTX} na vigência dos tratamentos Amilorida (59,58%), Citocalasina D (48,08%), Azida Sódica (58,74%) ou quando incubadas a temperatura de 4°C (33,09%) em relação ao controle (97,66%), onde as células foram incubadas apenas com o Meio R10 CS e LNC MTX Rod B a 5500nM de MTX. (**Figuras 4 e 5**).

Figura 2: Captação celular das LNC^{PCL-Rod B}_{MTX} pelas GL261.

Captação celular das LNC^{PCL-Rod B}_{MTX} na ausência e presença dos bloqueios farmacológicos: Citocalasina D (10 µM), sacarose (0,5 M), Amilorida (1 mM), Ciclodextrina (5 µM), Incubação das LNC MTX à 4°C ou Azida Sódica (15 mM) comparados ao controle (células contendo apenas meio R10 CS). As LNC^{PCL-Rod B}_{MTX} foram observadas no interior das células BV2, 1 hora após incubação. Os bloqueios foram realizados durante 1 hora, previamente à incubação com as LNC. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de 3 experimentos realizados em triplicata. *P < 0,05 Vs. Controle. ANOVA de uma via.

Figura 3: Fotos da Microscopia de Fluorescência das GL261 na presença ou ausência dos bloqueios farmacológicos.

Células GL261 após incubação com LNC^{PCL-Rod B}_{MTX} e DAPI para marcação do núcleo das células, com os mesmos bloqueios farmacológicos: Citocalasina D (10 µM), sacarose (0,5 M), Amilorida (1 mM), Ciclodextrina (5 µM), Incubação das LNC MTX à 4°C ou Azida Sódica (15 mM) comparados ao controle (células contendo apenas meio R10 CS). As LNC^{PCL-Rod B}_{MTX} foram observadas no interior das células GL261, 1 hora após incubação. Os bloqueios foram realizados durante 1 hora, previamente à incubação com as LNC^{PCL-Rod B}_{MTX}.

Figura 4: Captação celular das LNC PCL-RodB MTX pelas BV2.

Captação celular das LNC^{PCL-Rod B}_{MTX} na ausência e presença dos bloqueios farmacológicos: Citocalasina D (10 μ M), sacarose (0,5 M), Amilorida (1 mM), Ciclodextrina (5 μ M), Incubação das LNC MTX à 4°C e Azida Sódica (1,5 mM e 15 mM) comparados ao controle (células contendo apenas meio R10 CS). As LNC^{PCL-Rod B}_{MTX} foram observadas no interior das células BV2, 1 hora após incubação. Os bloqueios foram realizados durante 1 hora, previamente à incubação com as LNC, n=3 (triplicata) *P < 0,05 Vs. Controle. ANOVA de uma via.

Figura 5: Fotos da Microscopia de Fluorescência das BV2 na presença ou ausência dos bloqueios farmacológicos.

Captação celular das BV2 após incubação com LNC^{PCL-Rod B}_{MTX} e DAPI para marcação do núcleo das células, com os mesmos bloqueios farmacológicos: Citocalasina D (10 μM), sacarose (0,5 M), Amilorida (1 mM), Ciclodextrina (5 μM), Incubação das LNC MTX à 4°C e Azida Sódica (1,5 mM e 15 mM) comparados ao controle (células contendo apenas meio R10 CS). As LNC^{PCL-Rod B}_{MTX} foram observadas no interior das células BV2, 1 hora após incubação. Os bloqueios foram realizados durante 1 hora, previamente à incubação com as LNC^{PCL-Rod B}_{MTX}.

4.2 Toxicidade da LNC MTX *in vitro*

4.2.1 Efeitos da LNC MTX e da solução de MTX sobre a proliferação celular

Após 48 horas de incubações, observou-se que 0,21 μM de LNC MTX inibiu em 50% o crescimento de células GL261, demonstrando que o IC₅₀ para a LNC MTX foi de 0,21 μM . O IC₅₀ para a solução de MTX foi de 0,29 μM e para a LNC^{Branca} foi de 57 μM (**Figura 6, Tabela 3**).

Na **Figura 7** está representada a curva de dose-resposta de proliferação das células BV2 incubadas por 48 horas com LNC MTX, Solução de MTX ou a LNC^{Branca}. Os dados obtidos mostraram IC₅₀ de 1,03 μM para LNC MTX, de 27 μM para a Solução de MTX e de 0,7 μM para a LNC^{Branca} nas mesmas condições de incubação descritas anteriormente (**Figura 7; Tabela 3**).

Figura 6. Efeito das suspensões de LNC MTX e da solução de MTX sobre a proliferação de GL261.

Células da linhagem GL261 foram incubadas por 48 horas com LNC MTX, LNC^{Branca} ou Solução de MTX, em diferentes concentrações. Os resultados foram obtidos em ensaios colorimétricos e representam a média $\pm$ e.p.m de 4 ensaios em triplicata. Análise estatística Regressão não linear: Log Vs. Resposta.

Figura 7: Efeito das suspensões de LNC MTX e da solução de MTX sobre a proliferação de BV2.

Células da linhagem BV2 foram incubadas por 48 horas com LNC MTX, LNC ^{Branca} ou Solução de MTX, em diferentes concentrações. Os resultados foram obtidos em ensaios colorimétricos e representam a média $\pm$ e.p.m de 4 ensaios em triplicata. Análise estatística Regressão não linear: Log Vs. Resposta.

Tabela 3: Efeito das suspensões de LNC MTX e da solução de MTX sobre a proliferação de GL261 ou BV2.

Valores de LOGIC50 e IC50 (Log e μ M) $\pm$ e.p.m. após incubações de LNC MTX, Solução de MTX e LNC ^{Branca} em células das linhagens GL261 e BV2.

	GL261		BV2	
	LOG	μ M	LOG	μ M
MTX Sol	$-6,52 \pm 0,0718$	$0,29 \pm 0,003$	$-4,557 \pm 0,1456$	$27 \pm 0,862$
LNC MTX	$-6,66 \pm 0,1304$	$0,21 \pm 0,004$	$-5,985 \pm 0,1509$	$1,03 \pm 0,025$
LNC ^{Branca}	$-4,24 \pm 0,0793$	$57 \pm 1,065$	$-6,126 \pm 0,2846$	$0,74 \pm 0,034$

A análise da curva de crescimento das células GL261 na presença de LNC MTX a 550nM ou a 5500nM, ou solução de MTX a 550nM ou a 5500nM, mostrou que todas as formulações reduziram significativamente a proliferação celular, de maneira tempo dependente, mais precisamente, a partir de 48 horas de incubação. Ainda, crescimento celular do tratamento com LNC MTX 5500nM foi menor em 96 horas de incubação quando comparado aos tratamentos contendo a solução de MTX nas concentrações de 5500nM e 550nM (**Figura 8**)

As células BV2 quando incubadas com os mesmos tratamentos e nas mesmas concentrações que as células GL261 apresentaram efeitos similares. Após 48 horas, os tratamentos diminuíram a proliferação celular em relação as células tratadas pelo meio de cultura e usadas como controle, e após 72 ou 96 horas o tratamento com LNC MTX 550nM inibiu totalmente a proliferação celular em relação ao controle (**Figura 9**).

Figura 8. Efeito das suspensões de LNC MTX e da solução de MTX sobre o crescimento de células GL261

Curva de crescimento das células GL261 frente à incubação com os seguintes compostos: Controle (meio R10), LNC MTX 5500nM e 550nM, solução de MTX a 5500nM e 550nM (MTX Sol). O número de células viáveis foi quantificado a cada 24 horas, durante 96 horas, utilizando o corante azul de Trypan. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m. de 5 ensaios para cada tratamento. # $P < 0,01$ vs. MTX Sol 5500nM, * $P < 0,01$ vs. Meio R10. ANOVA de duas vias.

Figura 9: Efeito das suspensões de LNC MTX e da solução de MTX sobre o crescimento de células BV2.

Curva de crescimento das células BV2 frente à incubação com os seguintes compostos: Controle (meio R10 CS), LNC MTX 5500nM e 550nM, solução de MTX a 5500nM e 550nM (MTX Sol).. O número de células viáveis foi quantificado a cada 24 horas, durante 96 horas, utilizando o corante azul de Trypan. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m. de 4 ensaios para cada tratamento. * $P < 0,01$ vs. Meio R10. ANOVA de duas vias.

4.2.2 Efeitos da LNC MTX e da solução de MTX sobre a indução de morte celular

Para avaliar por qual mecanismo as LNC MTX causam o efeito antiproliferativo observado anteriormente, as células da linhagem GL261 e BV2 foram incubadas durante 48 horas com LNC MTX nas concentrações de 550nM ou 5500nM, com solução de MTX, nas mesmas concentrações obtidas nas formulações de LNC MTX, ou com LNC ^{Branca}, com quantidade correspondente à maior concentração de LNC MTX, seguido de ensaio de citometria de fluxo para quantificar a marcação de ANXA V ou IP.

A análise dos resultados mostrou aumento na porcentagem de células necróticas, com consequente diminuição no número de células viáveis, após incubação das células GL261 com LNC MTX a 5500nM ou LNC ^{Branca} quando comparado aos demais tratamentos (**Figura 10**).

No ensaio realizado com a linhagem celular BV2 houve aumento da porcentagem de células apoptóticas e em apoptose tardia quando incubadas com os tratamentos LNC MTX 550nM ou 5500nM, ou com solução de MTX a 550nM ou a

5500nM em relação ao controle, células incubadas com meio de cultura RPMI (Figura 12)

Figura 10. Indução de morte em células GL261 pelas suspensões de LNC MTX e da solução de MTX

Viabilidade das células GL261 após incubação, durante 48 h, com os compostos: Meio, LNC MTX 550nM, LNC MTX 5500nM, Solução de MTX 550nM, Solução de MTX 5500nM e LNC^{Branca}. Citômetro de fluxo foi utilizado para leitura da fluorescência de anticorpo direcionado contra anexina V ou pela marcação ao iodeto de propídeo. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m. de 4 ensaios em duplicata para cada tratamento. * $P < 0,05$ Vs. Controle. ANOVA de uma via.

Figura 11: Indução de morte em células BV2 pelas suspensões de LNC MTX e da solução de MTX

Viabilidade das células BV2 após incubação, durante 48 h, com os compostos: Meio, LNC MTX 550nM, LNC MTX 5500nM, Solução de MTX 550nM, Solução de MTX 5500nM e LNC Branca. Citômetro de fluxo foi utilizado para leitura da fluorescência de anticorpo direcionado contra anexina V ou pela marcação ao iodeto de propídeo. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m. de 4 ensaios em duplicata para cada tratamento. $P < 0,05$ Vs. Controle e LNC Branca. ANOVA de uma via.

4.2.3 Efeitos da LNC MTX e da solução de MTX sobre a fragmentação de DNA e ciclo celular

Experimentos de análise de ciclo celular foram realizados para avaliar os mecanismos subjacentes ao efeito antiproliferativo das incubações com LNC MTX nas células de linhagens GL261 e BV2. A análise da distribuição do ciclo celular das células GL261 (Figura 12) indicou que todos os compostos LNC MTX 550nM, LNC MTX 5500nM, Solução de MTX 550nM e Solução de MTX 5500nM reduziram significativamente a porcentagem de células marcadas na fase G1/G0 quando comparados a células controle (meio R10).

Em relação ao teste de fragmentação de DNA das células GL261 (**Figura 14**), observamos aumento significativo da fragmentação após incubação com todos os agentes quando comparado às células controles, incubadas com meio de cultura.

A análise da distribuição do ciclo celular das células BV2 (**Figura 13**) indicou que os compostos que reduziram significativamente o número de células na fase G1/G0 foram: LNC MTX 550nM, LNC MTX 5500nM, Solução de MTX 550nM e Solução de MTX 5500nM quando comparados ao controle (células incubadas com meio R10 CS). Na fase G2/M, os tratamentos LNC MTX 5500 nM e Solução de MTX 550 nM aumentaram significativamente a porcentagem de células marcadas nesta fase do ciclo celular em relação ao controle.

Em relação ao teste de fragmentação de DNA das células BV2 (**Figura 15**), observamos aumento significativo da fragmentação após incubação com as LNC MTX 5500nM ou com a Solução de MTX 5500nM quando comparado com o controle (células incubadas com meio de cultura R10+CS).

Figura 12: Efeito dos tratamentos de suspensões de LNC MTX e da solução de MTX sobre o ciclo de celular da linhagem GL261.

Efeitos da incubação com os compostos meio, LNC MTX 550nM, LNC MTX 5500nM, LNC Branca, Solução de MTX 550nM ou Solução de MTX 5500nM sobre as fases do ciclo (fase G1/G0, S ou G2/M) de células GL261. Citômetro de fluxo foi utilizado para leitura da marcação ao iodeto de propídeo. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m. de 4 ensaios em duplicata para cada tratamento. * $P < 0,05$ Vs. Meio. # $P < 0,05$ Vs. LNC MTX 550nM, @ $P < 0,05$ Vs. LNC MTX 5500nM ANOVA de duas vias.

Figura 13: Efeito dos tratamentos de suspensões de LNC MTX e da solução de MTX sobre o ciclo celular da linhagem BV2.

Efeitos da incubação com os compostos meio, LNC MTX 550nM, LNC MTX 5500nM, LNC Branca, Solução de MTX 550nM ou Solução de MTX 5500nM sobre as fases do ciclo (fase G1/G0, S ou G2/M) de células BV2. Citômetro de fluxo foi utilizado para leitura da marcação ao iodeto de propídeo. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m. de 4 ensaios em duplicata para cada tratamento. * $P < 0,05$ Vs. Controle. ANOVA de duas vias.

Figura 14: Efeito dos tratamentos de suspensões de LNC MTX e da solução de MTX sobre a Fragmentação do DNA em GL261.

Efeitos da incubação com os compostos meio, LNC MTX 550nM, LNC MTX 5500nM, LNC^{Branca}, Solução de MTX 550nM ou Solução de MTX 5500nM sobre a Fragmentação do DNA de células GL261. Citômetro de fluxo foi utilizado para leitura da marcação ao iodeto de propídeo. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m. de 4 ensaios em duplicata para cada tratamento. * $P < 0,05$ Vs. controle. ANOVA de uma via.

Figura 15: Efeito dos tratamentos de suspensões de LNC MTX e da solução de MTX sobre a Fragmentação do DNA em células BV2.

Efeitos da incubação com os compostos meio, LNC MTX 550nM, LNC MTX 5500nM, LNC^{Branca}, Solução de MTX 550nM ou Solução de MTX 5500nM sobre a Fragmentação do DNA de células BV2. Citômetro de fluxo foi utilizado para leitura da marcação ao iodeto de

propídeo. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m. de 4 ensaios em duplicata para cada tratamento. * $P < 0,05$ Vs. controle. ANOVA de uma via.

4.3 Estudos *in vivo*

4.3.1 Passagem das LNC^{PCL-Rod B_{MTX}} através da BHE após administração intravenosa e por via oral.

Levando-se em conta os efeitos citotóxicos observados *in vitro*, iniciamos a investigação se a LNC MTX poderia ser um tratamento promissor para o glioblastoma murino.

Para tanto, Rodamina B foi conjugada as LNC (LNC^{PCL-Rod B_{MTX}}) e utilizada como um agente fluorescente para rastrear o destino das nanopartículas *in vivo*. Após injeção IV de LNC^{PCL-Rod B_{MTX}}, imagens dos vasos cerebrais foram obtidas após 10, 30, 60 ou 120 minutos do tratamento. Decorridos 30 minutos da injeção (**Figura 16**), houve maior intensidade de fluorescência na parte externa do vaso cerebral, comparado ao tempo 10 minutos, indicando que as LNC MTX atravessaram a BHE e atingiram o parênquima cerebral, visualizado a partir das fotos capturadas nos tempos correspondentes (**Figura 17**). Resultados similares foram observados nos tempos subsequentes (1 e 2 horas).

O mesmo foi analisado quando as suspensões de LNC MTX foram administradas por via oral. Neste caso, houve diferença significativa na fluorescência perivascular entre o grupo controle e o grupo tratado com LNC^{PCL-Rod B_{MTX}} após 1 h dos tratamentos (**Figura 18**), indicando que após este período de tratamento por via oral, as LNC^{PCL-Rod B_{MTX}} estavam em sua maior parte na região externa aos vasos, portanto, no parênquima cerebral. Não foi observada diferença estatística 2 h após injeção das LNC^{PCL-Rod B_{MTX}}, comparado ao grupo tratado com Salina (**Figura 19**).

Figura 16: Extravasamento de Rodamina para região perivascular após administração via IV de LNC^{PCL-Rod B}_{MTX}.

Intensidade de fluorescência relativa intra e perivascular na superfície cerebral, observada por microscopia intravital, em camundongos C57BL/6 tratadas 10, 30, 60 ou 120 minutos com LNC^{PCL-Rod B}_{MTX}, por via IV. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de 3 animais em cada grupo. * P < 0,05 vs. 10 min. ANOVA de uma via.

Figura 17: Fotos dos vasos piais e parênquima cerebral após injeção intravenosa de LNC^{PCL-Rod B}_{MTX}, obtidas por microscopia intravital.

Imagens obtidas utilizando microscopia de fluorescência, mostrando a permeabilidade das LNC^{PCL-Rod B}_{MTX} por via IV nos tempos de 10, 30, 60 ou 120 minutos após a administração do tratamento. Foram empregados filtro FITC (Ex: 450nm, Em: 550nm) para localizar o vaso e filtro Rodamina (Ex: 540nm, Em: 640nm) para detectar a fluorescência das LNC^{PCL-Rod B}_{MTX}.

Figura 18: Microscopia intravital da região perivascular após administração via oral de LNC^{PCL-Rod B}MTX.

Intensidade de fluorescência relativa intra e perivascular, na superfície cerebral, observada por microscopia intravital, em camundongos C57BL/6 tratadas 1 ou 2 horas antes com LNC^{PCL-Rod B}MTX, por via oral. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m. de 3 animais em cada grupo. . * $P < 0,05$ vs. Salina. ANOVA de uma via.

Figura 19: Fotos da Microscopia intravital em tratamento via oral.

Imagens obtidas utilizando microscopia de fluorescência, mostrando a permeabilidade das LNC^{PCL-Rod B}MTX por via oral nos tempos de 1 e 2 horas após a administração do tratamento,

Foram empregados filtro FITC (Ex: 450nm, Em: 550nm) para localizar o vaso e filtro rodamina (Ex: 540nm, Em: 640nm) para detectar a fluorescência das LNC^{PCL-Rod B}_{MTX}.

4.3.2 Efeito das LNC MTX sobre a Integridade da BHE

A partir dos resultados anteriores, demonstrando que as LNC MTX atravessam a BHE quando administradas por via oral ou intravenosa, investigamos se as LNC MTX alteram a permeabilidade da BHE, quantificando o extravasamento do corante azul de Evans para o parênquima cerebral. Os resultados apresentados na **Figura 20** mostram que as injeções de LNC^{Branca}, de LNC MTX ou de MTX não alteram a permeabilidade da BHE, assim como os controles, uma vez que a concentração de Azul de Evans foi equivalente no cérebro de todos os animais em estudo.

Figura 20: Efeito das LNC sobre a integridade da BHE.

Relação da concentração de azul de Evans no tecido cerebral:plasma de camundongos C57BL/6 tratadas com Salina(0,9%), fase aquosa (Polissorbato 80 a 0,7%), nanocápsulas lipídicas LNC^{Branca} (sem fármaco), LNC MTX, na concentração de 0,25 mg/mL, ou solução de MTX, na concentração de 0,25 mg/mL. O volume de injeção dos tratamentos foi de 100 µL. O azul de Evans foi injetado 24 horas antes da coleta do cérebro e do plasma e 5 minutos após os tratamentos. Os resultados expressam a média ± e.p.m. de 4 animais em cada grupo. ANOVA de uma via.

4.3.3 Eficácia do tratamento com LNC MTX no modelo de glioblastoma murino.

Foi avaliada a eficácia das LNC MTX sobre o crescimento de células GL261 implantadas *in vivo* no microambiente cerebral, formando um glioblastoma murino, Para isso os camundongos foram tratados após 7 dias da inoculação das células tumorais com Salina, Solução de MTX e LNC MTX. O grupo Basal compreendeu animais não injetados com células tumorais.

Após 19 dias do implante das células tumorais foi observada redução da massa corpórea dos animais tratados com salina ou solução de MTX, mas não com solução de LCN MTX (**Tabela 4 e Figura 21**), contudo, não foi observado alteração no consumo de ração desses animais (**Figura 22**). Ao avaliar a massa tumoral (**Figura 23**), observamos que o tratamento com LNC MTX diminuiu significativamente (24,83%) o tamanho do tumor em relação ao grupo Salina (53,20%). O grupo de animais tratados com Solução de MTX (45,55%) não apresentou diferença significativa em relação aos animais tratados com salina.

Tabela 4: Efeito do tratamento de LNC MTX ou solução de MTX sobre a evolução Ponderal dos Animais com Glioblastoma Murino

Os dados apresentados mostram a evolução ponderal em animais inoculados com células tumorais (2×10^7) e tratados com Salina, LNC MTX (0,16 mM) ou com Solução de MTX (0,16 mM). Os resultados são expressos como média $\pm$ e.p.m.

GRUPO	PESO (g)			
	INOCULAÇÃO DO TUMOR (1º DIA)	INÍCIO TRATAMENTO (8º DIA)	EUTANÁSIA (19º DIA)	ΔT INOCULAÇÃO/ SACRIFÍCIO
BASAL (n=3)	21,77 $\pm$ 0,83	22,43 $\pm$ 0,82	22,23 $\pm$ 0,55	0,46
SALINA(n=4)	21,93 $\pm$ 0,66	22,83 $\pm$ 0,45	20,80 $\pm$ 1,22	-1,13
LNC MTX (n=5)	21,48 $\pm$ 0,84	22,20 $\pm$ 0,62	21,38 $\pm$ 0,65	-0,10
SOL MTX (n=5)	23,32 $\pm$ 1,24	22,66 $\pm$ 0,99	20,74 $\pm$ 0,94	-2,58

Figura 21: Efeito do tratamento de LNC MTX ou solução de MTX sobre a variação da Massa Corpórea em animais com Glioblastoma Murino.

Média de peso corporal de camundongos ao longo de todo o período experimental. Grupo Basal, Grupo Controle (Salina), LNC MTX e Solução de MTX. Os resultados são expressos como média $\pm$ e.p.m.

Figura 22: Efeito do tratamento de LNC MTX ou solução de MTX sobre o consumo de ração animais Glioblastoma Murino.

Média de consumo de ração dos camundongos ao longo de todo o período experimental. Grupo Basal, Grupo Controle (Salina), LNC MTX e Solução de MTX. Os resultados são expressos como média $\pm$ e.p.m.

Figura 23: Efeito do tratamento oral de LNC MTX ou solução de MTX sobre o tamanho do Glioblastoma.

Os animais foram tratados com Salina, Solução de MTX (0,16 mM) ou LNC MTX (0,16 mM) por 10 dias, em dias alternados. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m. da porcentagem do tamanho do tumor, em relação ao hemisfério total de 4 animais por grupo. * $P < 0,05$ Vs. tratamento com salina. ANOVA de uma via.

Figura 24: Efeito do tratamento oral de LNC MTX ou solução de MTX sobre o tamanho do Glioblastoma.

Fotos representativas dos cérebros com ou sem tumor dos animais tratados com Salina, Solução de MTX (0,16 mM) ou LNC MTX (0,16 mM) por 10 dias, em dias alternados.

5 DISCUSSÃO

A entrega de fármacos mediada por nanopartículas está recebendo cada vez mais atenção para o tratamento de câncer, devido a várias propriedades inerentes a esses compostos, dentre elas, o seu pequeno tamanho e constituição, que facilitariam a sua passagem através dos microvasos tumorais e da BHE íntegra, levando, assim, a concentrações mais elevadas dos fármacos no local do tumor, bem como na vizinhança do mesmo (BRIGGER *et al.*, 2002). Assim, este trabalho teve o objetivo de investigar se LNC MTX poderia ter efeito citotóxico mais eficaz que a solução de MTX em modelos *in vivo* e *in vitro* de glioblastoma.

Uma pergunta sempre presente em estudos de nanofármacos é seu mecanismo de entrega para as células alvos. Desta forma, inicialmente investigamos se as nanocápsulas permeavam a barreira celular em modelo *in vitro*. Para este estudo, empregamos a cultura de células BV2 de micróglia, e os resultados obtidos mostraram que a LNC^{PCL-Rod B_{MTX}} permeou a barreira celular, de maneira tempo dependente, e permaneceu no citoplasma durante todo o período de observação (60 minutos).

Como já salientado na introdução, a alta taxa de entrada das LNC MTX pela membrana celular pode ser devido a mecanismos dependentes de endocitose, os quais dependem da formação de vacúolos cobertos de proteínas (LEE *et al.*, 2013). O método mais clássico para a investigação dos mecanismos de endocitose é o bloqueio farmacológico destes e a subsequente quantificação intracelular do agente em estudo (JOHANNES, LAMAZE, 2002; LUO *et al.*, 2013; SAHAY *et al.*, 2010). Esta estratégia foi aqui empregada e mensuramos a LNC^{PCL-Rod B_{MTX}} intracelularmente por microscopia de fluorescência.

A sacarose foi utilizada como fármaco bloqueador da endocitose dependente de clatrina. A sacarose é um açúcar que em altas concentrações bloqueia proteínas endocíticas, como a clatrina (SELVI *et al.*, 2012). A citocalasina D foi utilizada como um agente que bloqueia a captação das células por fagocitose, desregulando os microtúbulos que se ligam aos monômeros de actina. Assim, ocorre a despolimerização do microfilamento, não havendo a formação dos fagossomas (ODA *et al.*, 2011). O agente farmacológico empregado que bloqueia a pinocitose dependente de caveolinas, também reconhecido como independente de clatrin, é a ciclodextrina (metil-beta-ciclodextrina), que altera a estrutura de domínios de

colesterol, desorganizando a formação das vesículas e inibindo a endocitose mediada por caveolinas ou por colesterol, (ZUHORN *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2003). A amilorida atua inibindo a macropinocitose, uma endocitose independente de clatrina e cavéolas, e dá origem aos macropinosomas que são maiores (0,5 – 10 μm) e distintos de outras vesículas formadas durante a pinocitose. A macropinocitose é iniciada por ativação de receptores tirosina-quinase, decorrentes, por exemplo, pela ligação de fatores de crescimento. Esta ligação resulta na ativação de uma cascata de sinalização que conduz a alterações no citoesqueleto de actina (KOIVUSALO *et al.*, 2010). A azida sódica é um agente farmacológico que bloqueia o processo de captação/endocitose por ser inibidor do metabolismo celular que bloqueia a síntese de ATP, portanto, processos que são dependentes de energia como síntese e degradação de proteínas intracelulares, lipogênese e transporte de membrana são reduzidos na presença de azida sódica (REED *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos mostraram que os bloqueios com ciclodextrina e azida sódica inibiram significativamente a entrada das LNC^{PCL-Rod B_{MTX}} nas células GL261, assim como a incubação das LNC^{PCL-Rod B_{MTX}} na temperatura de 4°C, podendo inferir que as LNC penetram as células GL261 por endocitose mediada por caveolina, dependente de metabolismo celular. Os resultados por nós obtidos corroboram os obtidos por XIN e colaboradores (2011) com outra linhagem celular de glioma humano, U87 MG, e com nanopartículas diferente da que estudamos, conjugadas com angiopep.

Diferentemente, citocalasina D e amilorida, além da incubação a 4°C reduziram a entrada das LNC^{PCL-Rod B_{MTX}} nas células da micróglia BV2, sugerindo que o mecanismo de entrada das LNC^{PCL-Rod B_{MTX}} nestas células ocorre por fagocitose e macropinocitose, dependentes de ATP e da sinalização da cascata de GTPases da família de proteínas G (BROWN; NEHER, 2014). Sabe-se que as BV2 mimetizam as micróglia e assim são células com atividade semelhante a de macrófagos. Por esta razão, possui características fagocíticas. No entanto, há relatos de que a macropinocitose é um dos mecanismos de endocitose exercidos pelos macrófagos, resultando na formação de grandes vesículas (macropinosomas) (MANDREKAR *et al.*, 2009).

É interessante salientar que os bloqueios de entrada da LNC causados pela, azida sódica, ciclodextrina, citocalasina D e amilorida nas linhagens celulares GL261 ou na BV2 foram efetivos, mas a redução da fluorescência não foi total. Desta forma,

pode-se inferir, que as LNC^{PCL-Rod B_{MTX}} podem também permear a membrana por difusão passiva ou adesão física à membrana celular.

Na continuidade do trabalho, realizamos ensaios para avaliar a toxicidade da LNC MTX em ensaios *in vitro*. Para estas abordagens experimentais, empregamos além da LNC MTX, a suspensão LNC^{Branca}, ou seja, sem o MTX incorporado na formulação e diluída na mesma proporção que as LNC MTX, além da solução de MTX. Para dar credibilidade ao estudo, a curva de concentração da LNC^{Branca} foi feita em condições equivalentes da diluição da solução de MTX e LNC MTX.

Avaliamos o IC50 das LNCs e da solução de MTX no ensaio de proliferação celular em células BV2 e GL261 e observamos que a BV2 é mais sensível aos componentes das LNC do que ao fármaco na solução usual, visto que o IC50 da LNC^{Branca} foi semelhante a IC50 da LNC MTX, as quais foram muito inferiores a IC50 da solução de MTX. A alta toxicidade de LNC^{Branca} é surpreendente e não há ainda uma explicação para este efeito. No entanto, outros estudos com a mesma LNC tem mostrado efeito próprio destas em células de melanoma (Drewes *et al.*, comunicação pessoal), além disso, BULCÃO e colaboradores (2013) demonstraram em estudos de toxicidade aguda e subcrônica, que a LNC^{Branca} promove alteração no peso relativo do baço e reação granulomatosa a agentes estranhos no baço e no fígado de ratos, mas sem alteração nos marcadores de hepatotoxicidade ou nefrotoxicidade, além de causar pequena alteração nos parâmetros hematológicos. Esta última alteração pode indicar possível inflamação ou apenas ser decorrente da interferência da LNC com sistemas que detectam a absorção de luz visível ou fluorescência. Assim, esta toxicidade não foi confirmada, sendo necessário novos métodos de avaliação hematológica após exposição as nanopartículas para confirmar o efeito farmacológico ou tóxico durante o tratamento com as LNC^{Branca}.

Diferentemente da linhagem BV2, na linhagem de glioma GL261 o tratamento com a LNC^{Branca} não foi citotóxico, uma vez que o IC50 foi muito mais elevado do que quando essa linhagem celular foi exposta as LNC MTX, assim como para a solução de MTX. YOON e colaboradores (2010) também realizaram ensaios de IC50 com solução de MTX em células de linhagens de câncer de pulmão (NCI-H23, A549), de mama (MCF-7), gástrico (AGS), de cólon (HCT-116) e de osteossarcoma (Saos-2), e observaram sensibilidades diferentes entre as linhagens. Esta diferença de sensibilidade entre linhagens tumorais e não tumorais pode ser explicada por alterações das vias que influenciam o transporte intracelular do MTX e

que contribuem à sensibilidade a este fármaco, como por exemplo, a alteração no nível de folatos na membrana celular (BACKUS *et al*, 2000).

Quando analisamos a curva de crescimento celular observamos que nas fases mais tardias de incubação as suspensões de LNC MTX foram mais citotóxicas que a solução de MTX, e na linhagem BV2, a suspensão de LNC MTX a 550 nM aboliu completamente o crescimento celular. Dados prévios corroboram nossos resultados em células cancerosas, já que BERNARDI e colaboradores (2013) demonstraram redução do crescimento das linhagens de glioma: C6, proveniente de ratos, e U138-MG, de humanos, ao incubá-las com LNC, constituídas do mesmo lipídio utilizado para produção das LNC usadas nesse estudo, mas contendo indometacina e éster de indometacina no seu interior. Adicionalmente, as formulações nanoencapsuladas foram mais eficazes do que o fármaco livre e não apresentaram efeito sobre a proliferação de células não tumorais. O mecanismo pelo qual os fármacos nanoencapsulados são mais efetivos do que os livres não está definido, mas pode estar relacionado à maior entrada nas células ou acúmulo no seu interior. Adicionalmente, estudo realizado por TRAPANI e colaboradores (2011) demonstrou que o MTX, conjugado com nanocápsulas de quitosana, recobertas com o tensoativo Tween 80, é citotóxico para linhagens celular de glioma (C6), sendo ainda capaz de atravessar uma monocamada de células MDCKII-MDR1 em modelo experimental que mimetiza a BHE. Em conjunto, os ensaios *in vitro* confirmam a atividade citotóxica do MTX nanoencapsulado em células de glioma, portanto os passos seguintes foram avaliar os mecanismos da citotoxicidade.

Inicialmente verificamos se o efeito citotóxico era dependente de morte celular, e os resultados obtidos mostraram que os tratamentos com a suspensão de LNC ou LNC MTX causaram necrose em células de glioma GL261 e que o tratamento com LNC MTX causou apoptose em células BV2, equivalente à induzida pela solução de MTX. Estes resultados mostraram, mais uma vez, a especificidade de ação dos fármacos dependente do tipo celular estudado. Neste sentido, NOGUEIRA e colaboradores (2013) incubaram MTX nanoencapsulado com quitosana e células tumorais HeLa ou MCF-7, onde se demonstrou aumento significativo da apoptose sem alteração da apoptose tardia ou necrose. Essa distinção de morte em cada linhagem celular pode ocorrer devido à susceptibilidade celular ou a diferenças nos constituintes das nanocápsulas, no entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar essa diferença.

Aliado ao estudo de morte celular, investigamos também os efeitos dos tratamentos sobre o ciclo celular. As fases do ciclo celular são divididas em G1, S, G2 e M, a saber: na fase G1, as células produzem constituintes celulares, como as ciclinas, que as capacitarão para realizar a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, que ocorre posteriormente na fase S, fase em que ocorre também a multiplicação ou reparo do DNA; células em G1 podem, ainda, antes de iniciada a replicação do DNA, entrar no estágio G0, e estas contabilizam a maior parte das células não proliferativas e que não estão em crescimento; a fase seguinte à fase S é denominada G2, onde ocorre a síntese dos componentes para a fase M ou de mitose celular (SCHAFER, 1998). Para esta análise, empregamos a citometria de fluxo, na qual é possível identificar as 4 fases distintas e a condição do DNA: fase sub-G0/G1 (DNA fragmentado), fase G0/G1 (antes da síntese de DNA), Fase S (DNA em processo de duplicação) e região G2/M (DNA duplicado). Os resultados por nós obtidos mostram que os tratamentos LNC MTX 550nM ou 5500nM ou Solução de MTX 550nM ou 5500nM induziram diminuição significativa no número de células GL261 na fase G1/G0 do ciclo celular, quando comparados ao controle, sem alterar a distribuição das células nas outras fases do ciclo celular em relação ao controle (S e G2).

Quanto à linhagem celular BV2, onde anteriormente observamos a morte celular por apoptose e apoptose tardia, detectamos também que todos os tratamentos com MTX, ou seja, exceto a LNC^{Branca}, diminuíram significativamente a porcentagem de células marcadas na fase G1/G0 do ciclo celular em relação ao controle. Na fase G2/M os tratamentos LNC MTX 5500nM ou Solução de MTX 550nM aumentaram significativamente a porcentagem de células marcadas nesta fase em relação ao controle.

Sabe-se que o MTX inibe a enzima di-hidrofolato-redutase (DHFR), responsável pela síntese de purina e timidilato, como consequência, ocorre o comprometimento da biossíntese de monofosfato de timidina e bloqueio da síntese de DNA (TONKINSON, *et. al.*, 1997), portanto, a diminuição das células GL261 e BV2 durante a fase G1/G0 parece ter sido consequência da redução da síntese de DNA induzida pelo fármaco, o que explica, juntamente com a necrose ou apoptose na GL261 e BV2, respectivamente, a redução da proliferação após incubação com MTX.

Estudos demonstram que os mecanismos envolvidos na atividade citotóxica do MTX dependem da linhagem celular analisada. De fato, em células de cultura primária de fibroblastos de hamster observou-se apoptose após incubação com MTX, além do bloqueio transiente das fases G1 e S do ciclo celular (SAVAGE; PRASAD, 1988). Também foi demonstrado, por FAIRCHILD e colaboradores (1988), que as células da linhagem de leucemia linfocítica de ratos (L1210), quando tratadas com MTX, permanecem na fase G1 do ciclo celular. Uma explicação possível para a alteração do número de células nas fases do ciclo celular é a inibição da enzima DHFR, causada pelo MTX, levando a uma diminuição da síntese de proteínas e reparo do DNA (SCHWEITZER *et al.*, 1990).

A fragmentação pode ser iniciada em resposta a vários estímulos como na morte celular, envelhecimento e transformação maligna em uma ampla variedade de células (NAGATA, 2000). Para analisar os efeitos dos tratamentos sobre a fragmentação do DNA nas duas linhagens celulares aqui estudadas, utilizou-se o IP, composto que se liga ao DNA de células íntegras, emitindo alta fluorescência, ou se liga a fragmentos de DNA de células não íntegras, emitindo baixa fluorescência (ZAMAI *et al.*, 1996).

Os tratamentos LNC MTX 550nM, LNC MTC 5500nM, Solução de MTX 550nM ou Solução de MTX 5500nM em células GL261 causaram aumento significativo na fragmentação do DNA. Este resultado pode estar relacionado ao mecanismo de ação do MTX, uma vez que esse composto atua inibindo a redução do ácido fólico, interferindo, portanto, na reprodução celular (PATRÍCIO; MOREIRA, 2003). Diferentemente, fragmentação do DNA foi somente observada com as concentrações de 5500 nM de LNC MTX ou solução de MTX em células BV2. Assim, as células BV2 parecem ser mais resistentes ao MTX do que as células GL261, e este resultado corrobora o ensaio de IC50 realizado nas duas linhagens celulares, onde foi visto que o MTX precisou de concentração 100 vezes maior para causar citotoxicidade de 50% nas células BV2 em comparação com as GL261.

Em conjunto, os dados dos estudos *in vitro* mostraram que as LNC MTX penetram a membrana celular, permanecendo no citoplasma e a citotoxicidade é mediada por indução de morte, alterações no ciclo celular e fragmentação do DNA.

Embora não tenha havido diferenças importantes na citotoxicidade entre as LNC MTX e solução de MTX, consideramos relevante avaliar a eficácia do tratamento com as LNC, uma vez que os estudos *in vitro* nos auxiliam a identificar

mecanismos de ação, mas não indicadores absolutos de eficácia terapêutica *in vivo*. Outro ponto muito relevante era evidenciar se as LNC atravessam a BHE. Embora estudos demonstrem que as LNC carregadas com fármacos são mais eficazes no tratamento de doenças do SNC que os mesmos fármacos em solução (BERNARDI, 2009; 2013).

Assim, iniciamos os estudos *in vivo* investigando se as LNC MTX poderiam atravessar a BHE. Empregamos LNC MTX, conjugadas com rodamina e avaliamos sua distribuição nos microvasos piaais em ensaios de microscopia intravital no tecido cerebral de camundongos C57BL/6 fêmeas. A microscopia intravital permite avaliar a microcirculação de diferentes tecidos em tempo real e, desta forma, consiste em uma estratégia experimental importante na avaliação da biodistribuição de fármacos que sejam passíveis de conjugação a fluoróforos (POLETTTO *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2013). Nossos resultados mostraram que as LNC^{PCL-Rod B}_{MTX} atravessam a BHE após administração intravenosa ou oral, embora as cinéticas tenham sido distintas, com atraso no tempo de extravasamento para o parênquima cerebral após administração oral em relação à intravenosa. Estes dados corroboram os resultados obtidos por RODRIGUES e colaboradores (submetido a publicação), no quais foram empregados a LNC de éster de indometacina.

Com o intuito de desvendar se as LNC MTX estariam alterando a estrutura da BHE e, com isso, chegando ao parênquima cerebral, solução de azul de Evans foi utilizada por via IV, após administração dos tratamentos (Salina, LNC^{Branca}, LNC MTX ou Solução de MTX) e a permeabilidade a esse agente foi mensurada. O azul de Evans foi escolhido devido a sua alta solubilidade em água, capacidade de emitir fluorescência quando estimulado, lenta excreção e, principalmente, por sua alta ligação às albuminas plasmáticas (COOKSEY, 2013). Observamos que não houve alteração da integridade da BHE após administração dos tratamentos, e resultados similares foram obtidos por AMBRUOSI e colaboradores (2006), demonstrando que nanopartículas revestidas com o mesmo tensoativo (Polissorbato 80) não alteram a integridade da BHE. Ainda, DHANIKULA e colaboradores (2007) compararam a capacidade do MTX em atravessar a BHE conjugado ou não com dendrímeros, a partir de um modelo de glioma *in vitro*, e mostraram que o fármaco conjugado com dendrímeros aumentou a porcentagem de morte em células tumorais e aumentou a permeabilidade do MTX pela BHE, promovendo sua difusão pelas regiões avasculares do tecido tumoral, onde o fármaco por si só não alcançaria. Portanto, o

efeito terapêutico do MTX conjugado com dendrímeros foi mais eficaz em glioblastoma.

Uma vez que a LNC MTX atravessa a BHE por via oral, decidimos avaliar a eficácia terapêutica por esta via sobre o GBM. A via oral é a rota mais comum e mais conveniente para a administração de fármacos, mas muitos tratamentos não são realizados por essa via pelos princípios ativos não serem absorvidos ou por serem degradados no estômago. Há estudos, contudo, que demonstram que a nanoencapsulação favorece a absorção por via oral pelos seguintes motivos: o fármaco nanoencapsulado pode estar protegido dessa degradação (CATTANI, *et al.*, 2010; OLBRICH *et al.*, 2002); a absorção das nanocápsulas pelo trato gastrointestinal pode ocorrer por via transcelular ou paracelular (DAS; LIN, 2005) e o revestimento dessas nanoestruturas com agentes surfactantes facilita a absorção pelo sistema gastrointestinal. No entanto, vale salientar, que a permeabilidade das nanopartículas através da mucosa intestinal diminui com o aumento do tamanho das mesmas (YAN *et al.*, 2010). Efeitos farmacológicos sistêmicos de nanocápsulas administradas por via oral tem sido relatados por MENDOZA *et al.* (2011), os quais demonstraram que a administração oral de nanopartículas lipídicas, carreando o fármaco edelfosina, atravessou o trato gastrointestinal e alcançou o cérebro, diminuindo o crescimento de glioma, quando comparado ao fármaco livre.

Durante 19 dias após o implante, o desenvolvimento do tumor foi avaliado pela evolução ponderal e massa corpórea dos animais. O tratamento foi realizado a cada 2 dias, e se início foi no oitavo dia após o implante. O tempo determinado para eutanásia foi definido por duas vertentes: diminuição de 20% ou mais da massa corpórea e alterações comportamentais que indicassem dor ou alteração neurológica. Ao final do ensaio observamos que os animais do grupo Basal (sem tumor) ganharam peso normalmente durante os 19 dias; os animais tratados com salina ou com solução de MTX após o implante das células GL261 diminuíram cerca de 2 gramas do peso corpóreo, já os animais tratados com LNC MTX houve uma diminuição de menos de 1 grama de peso corpóreo, indicando que o tratamento com LNC MTX poderia ser mais efetivo.

De fato, condizente com a evolução ponderal dos animais, o tamanho do tumor após tratamento com LNC MTX foi menor em relação ao grupo tratado com salina. Embora, não podemos afirmar que o tratamento com a Solução de MTX é menos eficaz, pois há uma tendência na diminuição no tamanho do tumor em

relação aos animais tratados com salina. No entanto, não houve diferença estatística no tamanho do tumor entre animais tratados com salina e solução de MTX.

É descrito pela literatura que o MTX atravessa a BHE apenas em altas doses, mas com consequente aumento da toxicidade sistêmica e neurotoxicidade quando administrado por via IP (YANG *et al*, 2010). Portanto, os dados aqui obtidos podem indicar que a nanoencapsulação pela LNC seja uma estratégia importante para o tratamento de GBM, embora estudos experimentais complementares sejam necessários para se afirmar esta hipótese.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo podemos concluir que:

1) As LNC MTX são capazes de atravessar as membranas de células GL261 e BV2 por mecanismos diferentes, a saber: na GL261 por endocitose dependente de caveolinas e na BV2 por macropinocitose e fagocitose.

2) As LNC MTX possuem efeito citotóxico nas duas linhagens celulares, causando necrose nas GL261 e apoptose nas BV2. Atua na fase G1 do ciclo celular das duas linhagens, porém as células BV2 são mais resistentes ao MTX do que as GL261; e causam fragmentação do DNA, sendo as células GL261 mais sensíveis a este efeito;

3) LNC MTX atravessa a BHE após administração IV ou oral, sem danificar a estrutura desta barreira;

4) O tratamento com LNC MTX por via oral parece ser mais eficaz do que a solução de MTX para o tratamento de GBM, podendo ser um tratamento promissor para o tratamento desta doença.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIAS

ADEREM, A.; UNDERHILL, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual Review of Immunology**, v.17, p.593–623, 1999.

AGUILAR-MORANTE, D.; MORALES-GARCIA, J.A.; SANZ-SANCRISTOBAL, M.; GARCIA-CABEZAS, M.A.; SANTOS, A.; PEREZ-CASTILLO, A. Inhibition of glioblastoma growth by the thiadiazolidinone compound TDZD-8. **PloS ONE**, v.5, n.11, p.1-12, 2010.

ALDAPE, K.D.; OKCU, M.F.; BONDY, M.L.; WRENSCH, M. Molecular epidemiology of glioblastoma. **The Cancer Journal**, v.9, p.99–106, 2003.

ALISSON, A.C. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. **Immunopharmacology**, v.47, p.63, 2000.

ALLAVENA, P.; GARLANDA, C.; BORRELLO, M.G.; SICA, A.; MANTOVANI, A. Pathways connecting inflammation and cancer. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.18, p.3-10, 2008.

ALVES, O.L. Estudos estratégicos nanotecnologia; Núcleo de Assuntos Estratégicos da Presidência da República: Brasília, 2004/2005, parte II. Disponível em: http://www.sae.gov.br/site/wp-content/uploads/12estudo_nanotecnologia.pdf. Acesso em: 20 set. 2012.

AMBRUOSI, A.; KHALANSKY, A.S.; YAMAMOTO, H.; GELPERINA, S.E.; BEGLEY, D.J.; KREUTER, J. Biodistribution of polysorbate 80-coated doxorubicin-loaded [14C]- poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles after intravenous administration to glioblastomabearing rats. **Journal of Drug Targeting**, v.14, p.97-105, 2006.

ATAÍDE, D.S.T.; ESMANHOTO, L.D.K.; HELMER, K.A.; GUERRA, I.R.C.; GUIMARÃES, C.C.G.; MORITZ, S. Ulceração das placas psoriáticas - efeito cutâneo adverso do metotrexato em altas doses no tratamento da psoríase: relato de três casos. **Anais. Brasileiros de Dermatologia**, v.78, n.6, p.749-753, 2003.

BACKUS, H.H.J.; PINEDO, H.M.; WOUTERS, D.; PADRÓN, J.M.; MOLDERS, N.; VAN DER WILT, C.L.; VAN GROENINGEN, C.J.; JANSEN, G.; PETERS, G.J. Folate depletion increases sensitivity of solid tumor cell lines to 5-fluorouracil and antifolates. **International Journal of Cancer**, v.87, p.771–778, 2000.

BALBUS, J.M.; MAYNARD, A.D.; COLVIN, V.L.; CASTRANOVA, V.; DASTON, G.P.; DENISON, R.A.; DREHER, K.L.; GOERING, P.L.; GOLDBERG, A.M.; KULINOWSKI, K.M.; MONTEIRORIVIERE, N.A.; OBERDÖRSTER, G.; OMENN, G.S.; PINKERTON, K.E.; RAMOS, K.S.; REST, K.M.; SASS, J.B.; SILBERGELD, E.K.; WONG, B.A. Meeting report: hazard assessment for nanoparticles-report from an interdisciplinary workshop. **Environmental Health Perspectives**, v.115, n.11, p.1654-1659, 2007.

BÉDUNEAU, A.; SAULNIER, P.; BENOIT, J.P. Active targeting of brain tumors using nanocarriers. **Biomaterials**, v.28, p.4947- 4967, 2007.

BERNARDI, A.; BRAGANHOL, E.; JÄGER, E.; FIGUEIRÓ, F.; EDELWEISS, M.I.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; BATTASTIN, A.M.O. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. *Cancer Letters*, v.281, p.53–63, 2009.

BERNARDI, A.; FROZZA, R.L.; HOPPE, J.B.; SALBEGO, C.; POHLMANN, A.R.; BATTASTINI, A.M.O.; GUTERRES, S.S. The antiproliferative effect of Indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules in glioma cells is mediated by cell cycle regulation, differentiation, and the inhibition of survival pathways. *International Journal of Nanomedicine*, v.8, p.711–729, 2013.

BIGNAMI, A. **Discussions in neuroscience**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1991. v.8, p.1-45.

BRAT, D.J. Newly codified glial neoplasms of the 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system: angiocentric glioma, pilomyxoid astrocytoma and pituicytoma. **Brain Pathology**, v.17, n.3, p.319-324, 2007.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.54, p.631-651, 2002.

BROWN, G.C.; NEHER, J.J. Microglial phagocytosis of live neurons. **Nature Reviews: Neuroscience**, v.15, p.209–216, 2014.

BULCÃO, R.P.; FREITAS, F.A.; VENTURINI, C.G.; DALLEGRAVES, E.; DURGANTE, J.; GÖETHEL, G.; CERSKI, C.T.S.; ZIELINSKY, P.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; GARCIA, S.C. Acute and subchronic toxicity evaluation of Poly(ϵ -Caprolactone) lipid-core nanocapsules in rats. **Toxicological Sciences**, v.132, n.1, p.162–176, 2013.

CATTANI, V.B.; FIEL, L.A.; JAGER, A.; JAGER, E.; COLOMÉ, L.M.; UCHOA, F.; STEFANI, V.; COSTA, T.D.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, R.A. Lipid-core nanocapsules restrained the indomethacin ethyl ester hydrolysis in the gastrointestinal lumen and wall acting as mucoadhesive reservoirs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.39, p.116–124, 2010.

CHAE, M.; PETERSON, T.E.; BALDEMAN, A.; CHEN, S.; ZHANG, L.; RENNER, D.N.; JOHNSON, A.J.; PARNEY, I. Increasing glioma-associated monocytes leads to increased intratumoral and systemic myeloid-derived suppressor cells in a murine model. **Neuro-Oncology**, v.0, p.1–14, 2014.

CHAN, W.Y.; KOHSAKA, S.; REZAIE, P. The origin, and cell lineage of micrógliia: new concepts. **Brain Research Reviews**, v.53, p.344–354, 2007.

CHHOR, V.; LE CHARPENTIER, T.; LEBON, S.; ORÉ, MARIE-VIRGINE.; CELADOR, I.L.; JOSSERAND, J.; DEGOS, V.; JACOTOT, E.; HAGBERG, H.; SAVMAN, K.; MALLARD, C.; GRESSENS, P.; FLEISS, B. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia *in vitro*. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.32, p.70–85, 2013.

COOKSEY, C.J. Quirks of dye nomenclature. 1. Evans blue. **Biotechnic & Histochemistry**, v.89, p.1–3, 2013.

CUNHA, V.R.R.; FERREIRA, A.M.C.; CONSTANTINO, V.R.L.; TRONTO, J.; VALIM, J.B. Hidróxidos duplos lamelares: nanopartículas inorgânicas para armazenamento e liberação de espécies de interesse biológico e terapêutico. **Química Nova**, v.33, n.1, p.159–171, 2010.

DAS, D.; LIN, S.S. Double-coated poly (butylcynanoacrylate) nanoparticulate delivery systems for brain targeting of dalargin via oral administration. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.94, p.1343–1353, 2005.

DEANGELIS, L.M. Brain tumors. **New England Journal of Medicine.**, v.344, p.114–123, 2001.

DELUCIA, R.; OLIVEIRA FILHO, R.M.; PLANETA, C.S.; GALLACCI, M.; AVELLAR, M.C. **Farmacologia integrada**. 3.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2007. p.510–533.

DHANIKULA, R.S.; ARGAW, A.; BOUCHARD, J.F.; HILDGEN, P. Methotrexate loaded polyether-copolyester dendrimers for the treatment of gliomas: enhanced efficacy and intratumoral transport capability. **Molecular Pharmaceutics**, v.5, n.1, p.105–116, 2007.

DIETRICH, J.; MONJE, M.; WEFEL, J.; MEYERS, C. Clinical patterns and biological correlates of cognitive dysfunction associated with cancer therapy. **Oncologist**, v.13, p.1285–1295, 2008.

DOHERTY, G.J.; MCMAHON, H.T. Mechanisms of endocytosis. **Annual Review of Biochemistry**, v.78, p.857–902, 2009.

EL ANDALOUSSI, A.; HAN, Y.; LESNIAK, M.S. Prolongation of survival following depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells in mice with experimental brain tumors. **Journal of Neurosurgery**, v.105, p.430–437, 2006.

ELSAESSER, A.; HOWARD, C.V. Toxicology of Nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.64, p.129–137, 2012.

FAIRCHILD, C.R.; MAYBAUM, J.; STRAW, J.A. Enhanced cytotoxicity with methotrexate in conjunction with hypoxanthine in L1210 cells in culture. **Cancer Chemother. Pharmacol**, v.22, p.26–32, 1988.

FERNANDES, M.F.; FILGUEIRAS, C.A. Um panorama da nanotecnologia no Brasil (e seus macro-desafios). **Química Nova**, v.31, n.8, p.2205-2213, 2008.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nature Reviews Cancer**, v.5, p.161–171, 2005.

FIGUEIRÓ, F.; BERNARDI, A.; FROZZA, R.L.; TERROSO, T.; ZANOTTO-FILHO, A.; JANDREY, E.H.F.; MOREIRA, J.C.F.; SALBEGO, C.G.; EDELWEISS, M.I.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; BATTASTINI, A.M.O. Resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules treatment reduces *in vitro* and *in vivo* glioma growth. **Journal of Biomededical Nanotechnology**, v.9, n.3, p.516–526, 2013.

FISCHER, H.C.; CHAN, W.C. Nanotoxicity: the growing need for *in vivo* study. **Current Opinion in Biotechnology**, v.18, n.6, p.565-571, 2007.

FORTUNATO, E. **As metas da nanotecnologia**: aplicações e implicações. Lisboa: Centro de Investigação de Materiais, Plano nacional de inovação, Departamento de Ciência dos Materiais, Universidade Nova de Lisboa: FCT, 2005. P.1.

FULLER, G.N.; SCHEITHAUER, B.W. The 2007 revised World Health Organization entities. **Brain Pathology**, v.17, n.3, p.304-307, 2007.

FURNARI, F.B.; FENTON, T.; BACHOO, R.M.; MUKASA, A.; STOMMEL, J.M.; STEGH, A.; HAHN, W.C.; LIGON, K.L.; LOUIS, D.N.; BRENNAN, C.; CHIN, L.; DEPINHO, R.A.; CAVENEE, W.K. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes & Development**, v.21, p.2683–2710, 2007.

GAO, F.; CHEN, D.; HU, Q.; WANG, G. Rotenone directly induces BV2 cell activation via the p38 MAPK pathway. **PloS One**, v.8, n.8, p.1–9, 2013.

GENESTIER, L.; PAILLOT, R.; QUEMENEUR, L.; IZERADJENE, K.; REVILLARD, J.P. Mechanisms of action of methotrexate. **Immunopharmacology**, v.7, n.2/3, p.247-257, 2000.

GIL, P.R.; OBERDORSTER, G.; ELDER, A.; PUNTES, V.; PARAK, W.J. Correlating physico-chemical with toxicological properties of nanoparticles: the present and the future. **ACS Nano**, v.4, n.10, p.5527-5531, 2010.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, 2001. P.869.

GREISH, K. Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting. **Cancer Nanotechnology: Methods in Molecular Biology**, v.624, p.25–37, 2010.

GUTMANN, D.H. Micróglia in the tumor microenvironment: taking their TOLL on glioma biology. **Neuro-Oncology**, v.17, n.2, p.171-173, 2015.

HALLWORTH, M.; CAPPS, N. **Therapeutic drug monitoring, clinical biochemistry in medicine**, London: ACB Venture Publications, 1993. P.1-28

HANISCH, U.K.; KETTENMANN, H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. **Nature Neuroscience**, v.10, n.11, p.1387–1394, 2007.

HEKMATARA, T.; BERNREUTHER, C.; KHALANSKY, A.S.; THEISEN, A.; WEISSENBERGER, J.; MATSCHKE, J.; GELPERINA, S.; KREUTER, J.; GLATZEL, M. Efficient systemic therapy of rat glioblastoma by nanoparticle-bound doxorubicin is due to antiangiogenic effects. **Clinical Neuropathology**, v.28, n.3, p.153–164, 2009.

HENN, A.; LUND, S.; HEDTJARN, M.; SCHRATTENHOLZ, A.; PORZGEN, P.; LEIST, M. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. **ALTEX**, v.26, p.83–94, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativas 2014**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>. Acesso em: 15 set. 2014.

JOHANNES, L.; LAMAZE, C. Clathrin-dependent or not: is it still the question? **Traffic**, v.3, p.433–451, 2002.

NANOINVESTIMENTOS. **Jornal da Ciência**, n.4403, de 12 de Dezembro de 2011. Disponível em: <http://www.jornaldaciencia.org.br/edicoes/?url=http://jcnoticias.jornaldaciencia.org.br/6-nanoinvestimentos/>. Acesso em: 10 nov. 2014.

KAUFMAN, D.M. **Neurología clínica para psiquiatras**. Espanha, Local: Elsevier Masson, 2008. p.469-480.

KOIVUSALO, K.; WELCH, C.; HAYASHI, H.; SCOTT, C.C.; KIM, M.; ALEXANDER, T.; TOURET, N.; HAHN, K.M.; GRINSTEIN, S. Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. **The Journal of Cell Biology**, v.188, n.4, p.547–563, 2010.

KRAKSTAD, C.; CHEKENYA, M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. **Molecular Cancer**, v.9, p.135, 2010.

KREUTZBERG, G.W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trend Neurosci**, v.19, p.312-318, 1996.

KUNZMANN, A.; ANDERSSON, B.; THURNHERR, T.; KRUG, H.; SCHEYNIUS, A.; FADEEL, B. Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility,

biodistribution and biodegradation. **Biochimica et. Biophysica Acta**, v.1810, p.361–373, 2010.

LEE, B.; AMANO, T.; WANG, H.Q.; PANTOJA, J.L.; YOON, C.W.; HANSON, C.J.; AMATYA, R.; YEN, A.; BLACK, K.L.; YU, J.S. Reactive oxygen species responsive nanoprodug to treat intracranial glioblastoma. **ACS Nano**, v.7, n.4, p.3061–3077, 2013.

LETEN, C.; STRUYS, T.; DRESSELAERS, T.; HIMMELREICH, U. *In vivo* and *ex vivo* assessment of the blood brain barrier integrity in different glioblastoma animal models. **Journal of Neurooncology**, v.119, 297–306, 2014.

LI, C.I., ed. **Breast cancer epidemiology**. New York: Springer, 2010. 417p.

LIU, J.; SHAPIRO, J.I. Endocytosis and signal transduction: basic science update. **Biological Research for Nursing**, v.5, p.117–128, 2003.

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

LUO, Y.; TENG, Z.; WANG, T.T.Y.; WANG, Q. Celular uptake and transport of zein nanoparticles: effects of sodium caseinate. **Journal of Agricultural and. Food Chemistry**, v.61, p.7621–7629, 2013.

MAHALEY, M.S.; METTLIN, C.; NATARAJAN, N.; LAWS, E.R.; PEACE, B.B. National survey of patterns of care for brain-tumor patients. **Journal of. Neurosurgery**, v.71, p.826-836, 1980.

MANDREKAR, S.; JIANG, Q.; LEE, C.Y.D.; KOENIGSKNECHT-TALBOO, J.; HOLTZMAN, D.M.; LANDRETH, G.E. Microglia mediate the clearance of soluble $\alpha\beta$ through fluid phase macropinocytosis. **The Journal of Neuroscience**, v.29, n.13, p.4252–4262, 2009.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation, **Nature**, v.454, n.7203, p.436-444, 2008.

MAO, S.; GERMERSHAUS, O.; FISCHER, D.; LINN, T.; SCHEPF, R.; KISSEL, T. Uptake and transport of PEG-graft-trimethyl-chitosan copolymer-insulin nanocomplexes by epithelial cells. **Pharmaceutical Research**, v.22, n.12, p.2058–2068, 2005.

MENDOZA A.E.H.; PRÉAT, V.; MOLLINEDO, F.; BLANCO-PRIETO, M. J. *In vitro* and *in vivo* efficacy of edelfosine-loaded lipid nanoparticles against glioma. **Journal of Controlled Release**, v.156, p.421–426, 2011.

MERCER, J.; HELENIUS, A. Virus entry by micropinocytosis. **Nature Cell Biology**, v.11, p.510-520, 2009.

MISTRY, A.; STOLNIK, S.; ILLUM, L. Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.379, p.146-157, 2009.

MONTGOMERY, D.L. Astrocytes: form, functions and roles in diseases. **Veterinary Pathology Online**, v.31, p.145-167, 1994.

NAGATA, S. Apoptotic DNA fragmentation. **Cell Research Experimental**, v.256, p.12–18, 2000.

NAKAZATO, Y. The 4th Edition of WHO classification of tumours of the Central Nervous System published in 2007. **Neurological Surgery**, v.36, n.6, p.473-491, 2008.

NEVES, C.; JORGE, R.; BARCELOS, A. A teia de toxicidade do metotrexato: órgão oficial da sociedade portuguesa de reumatologia. **Acta Reumatológica Portuguesa**, v.34, p.11-34, 2009.

NEWCOMB, E.W.; ZAGZAG, D. The murine GL261 glioma experimental model to assess novel brain tumor treatments. In: VAN MEIR, E.G., ed. **CNS cancer: models, markers, prognostic factors, targets and therapeutic approaches**. Dordrecht: Humana Press, p.227–241, 2009.

NEWCOMB, W.E.; TAMASDAN, C.; ENTZMINGER, Y.; ARENA, E.; SCHEE, T.; KIM, M.; CRISAN, D.; LUKYANOV, Y.; MILLER, C.D.; ZAGZAG, D. Flavopiridol inhibits the growth of GL261 gliomas *in vivo*: implications for malignant glioma therapy. **Cell Cycle**, v.3, n.2, p.230–234, 2004.

NOGUEIRA, D.R.; TAVANO, L.; MITJANS, M.; PÉREZZ, L.; INFANTE, M.R.; VINARDELL, M.P. *In vitro* antitumor activity of methotrexate via pH-sensitive chitosan nanoparticles. **Biomaterials**, v.34, p.2758–2772, 2013.

OBERDÖRSTER, G.; OBERDÖRSTER, E.; OBERDÖRSTER, J. Nanotoxicology: an emerging discipline involving from studies of ultrafine particles. **Environmental Health Perspectives**, v.7, p.113, 2005.

ODA, K.; YUMOTO, R.; NAGAI, J.; KATAYAMA, H.; TAKANO, M. Mechanism underlying insulin uptake in alveolar epithelial cell line RLE-6TN. **European Journal of Pharmacology**, v.672, n.1/3, p.62-69, 2011.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **The American Journal of Pathology**, v.170, p.1445–1453, 2007.

OLBRICH, C.; KAYSER, O.; MÜLLER, R.H. Lipase degradation of Dynasan 114 and 116 solid lipid nanoparticles (SLN)--effect of surfactants, storage time and crystallinity. **International Journal of Pharmaceutics**, v.26, n.237, p.119-128, 2002.

OLIVEIRA, C.P.; VENTURINI, C.G.; DONIDA, B.; POLETTO, F.S.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. **Soft Matter**, v.9, p.1141–1150, 2013.

OSTROM, Q.T.; GITTLEMAN, H.; LIAO, P.; ROUSE, C.; CHEN, Y.; DOWLING, J.; WOLINSKY, Y.; KRUCHKO, C.; BARNHOLTZ-SLOAN, J. CBTRUS Statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007–2011. **Neuro-Oncology**, v.16, p.iv1–iv63, 2014.

PATRÍCIO, J.A.; MOREIRA, L.M. Efeito do metotrexato na inibição da divisão celular em grandes longevos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.2, n.2, p.185-191, 2003.

POLETTO, F.S.; FIEL, L.A.; LOPES, M.V.; SCHAAB, G.; GOMES, A.M.O.; GUTERRES, S.S.; ROSSI, B.B.; POHLMANN, A.R. Fluorescent-Labeled Poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules: synthesis, physicochemical properties and macrophage uptake. **Journal of Colloid Science and Biotechnology**, v.1, n.1, p.89-98, 2012.

RAPPA, G.; MERCAPIDE, J.; ANZANELLO, F.; PRASMICKAITE, L. XI, Y.; JU, J.; FODSTAD, O.; LORICO, A. Growth of cancer cell lines under stem cell-like conditions has the potential to unveil therapeutic targets. **Experimental Cell Research**, v.314, p.2110–2122, 2008.

REED, A.L.; ROWSON, S.A.; DIXON, J.B. Demonstration of ATP-dependent, transcellular transport of lipid across the lymphatic endothelium using an *in vitro* model of the lacteal. **Pharmaceutical Research**, v.30, n.12, p.3271–3280, 2013.

REEVES, G.I.; MARKS, J.E. Prognostic significance of lesion size for glioblastoma multiforme. **Radiology**, v.132, p.469-471, 1979.

RODRIGUES, S.F.; FIEL, L.A.; SHIMADA, A.L.; PEREIRA, N.R.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, R.A.; FARSKY, S.H. Lipid-core nanocapsules act as a drug shuttle through the blood brain barrier and reduce glioblastoma after intravenous or oral administrations. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, 2014. [Submitted].

RUBINO, F.M. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. **Journal of Chromatography**, v.764, p.217-254, 2001.

SAHAY, G.; ALAKHOVA, D.Y.; KABANOV, A.V. Endocytosis of nanomedicines. **Journal of Controlled Release**, v.145, p.182–195, 2010.

SANDGREN, K.J.; WILKINSON, J.; MIRANDA-SAKSENA, M.; MCLNERNEY, G.M.; BYTH-WILSON, K.; ROBINSON, P.J.; CUNNINGHAM, A.L. A differential role for macropinocytosis in mediating entry of the two forms of vaccinia virus into dendritic cells. **PLoS Pathogens**, v.6, n.4, p.1–16, 2010.

SARIN, H.; KANEVSKY, A.S.; WU, H.; BRIMACOMBE, K.R.; FUNG, S.H.; SOUSA, A.A.; AUH, S.; WILSON, C.M.; SHARMA, K.; ARONOVA, M.A. Effective transvascular delivery of nanoparticles across the blood brain tumor barrier into malignant glioma cells. **Journal of Translational Medicine**, v.6, p.80, 2008.

SARTORI, T.; SEIGI, T.M.; PINHEIRO, C.A.; MACHADO, C.A. Development and validation of a fast RP-HPLC method for determination of methotrexate entrapment efficiency in polymeric nanocapsules. **Journal of Chromatogr. Science**, v.46, p.505–509, 2008.

SAVAGE, J.R.K.; PRASAD, R. Generalized blocking in S phase by methotrexate. **Mutation Res/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.201, p.195-201, 1988.

SCHAFER, K.A. The cell cycle: a review. **Veterinary Pathology Online**, v.35, p.461-478, 1998.

SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R.; FREITAS, L.L.; GUTERRES, S.S. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanosferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.21, n.2, p.99-106, 2002.

SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R.; FREITAS, L.L.; GUTERRES, S.S. Caracterização físico-química e estabilidade de sistemas nanoestruturados para administração de fármacos. **Química Nova**, v.26, p.726-737, 2003.

SCHWEITZER, B.I.; DICKER, A.P.; BERTINO, J.R. Dihydrofolate reductase as a therapeutic target. **FASEB J**, v.4, n.8, p.2441–2452, 1990.

SELVI, R.B.; CHATTERJEE, S.; JAGADEESAN, D.; CHATURBEDY, P.; SUMA, B.S.; ESWARAMOORTHY, M.; KUNDU, T.K. ATP driven clathrin dependent entry of carbon nanospheres prefer cells with glucose receptors. **J. Nanobiotechnology**, v.10, p.35, 2012.

SENGER, D.R.; VAN DE WATER, L.; BROWN, L.F. Vascular permeability (VPF, VEGF) in tumor biology. **Cancer and Metastasis Reviews**, v.12, p.303-324, 1993.

SHAPIRO, W.R.; AUSMAN, J.I.; RALL, D.P. Studies on the chemotherapy of experimental brain tumors: evaluation of 1,3-bis(2-chloroethyl)-l-nitrosourea, cyclophosphamide, mithramycin, and methotrexate. **Cancer Research**, v.30, p.2401–2413, 1970.

SIMONS, K.; IKONEN, E. Functional raft in cell membranes. **Nature**, v.387, p.569-572, 1997.

SOLITO, E.; SASTRE, M. Micróglia function in Alzheimer's disease. **Frontiers in Pharmacology: Neuropharmacology**, v.3, n.14, p.1–10, 2012.

STEPHENSON, S.M.; LOW, P.S.; LEE, R.J. Folate receptor-mediated targeting of liposomal drugs to cancer cells. **Methods in Enzymology**, v.387, p.33-50, 2004.

STOLLG, G.; JANDER, S. The role of micróglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. **Progress in Neurobiology**, v.58, n.3, p.233–247, 1999.

STROJNIK, T.; KAVALAR, R.; BARONE, T.A.; PLUNKETT, R.J. Experimental model and immunohistochemical comparison of U87 human glioblastoma cell xenografts on the chicken chorioallantoic membrane and in rat brains. **Anticancer Research**, v.30, n.12, p.4851-4860, 2010.

TONKINSON, J.L.; MARDER, P.; ANDIS, S.L.; SCHULTZ, R.M.; GOSSETT, L.S. Cell cycle effects of antifolate antimetabolites: implications for cytotoxicity and cytostasis. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.39, p.521-531, 1997.

TRAPANI, A.; DENORA, N.; LACOBELLIS, G.; SITTERBERG, J.; BAKOWSKY, U.; KISSEL, T. Methotrexate-loaded chitosan- and glycolchitosan-based nanoparticles: a promising strategy for the administration of the anticancer drug to brain tumors. **AAPS PharmSciTech**, v.12, n.4, p.1302–1311, 2011.

ULASOV, V.I.; RIVERA, A.A.; NETTELBECK, D.M.; RIVERA, L.B.; MATHIS, J.M.; SONABEND, A.M.; TYLER, M.; WANG, M.; DOUGLAS, J.T.; LESNIAK, M.S. An oncolytic adenoviral vector carrying the tyrosinase promoter for glioma gene therapy. **International Journal of Oncology**, v.31, p.1177–1185, 2007.

UNDERHILL, D.M. Macrophage recognition of zymosan particles. **Journal of Endotoxin Research**, v.9, p.176–180, 1999.

VAN MEIR, E.G.; HADJIPANAYIS, C.G.; NORDEN, A.D.; SHU, H.K.; WEN, P.Y.; OLSON, J.J. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v.60, p.166–193, 2010.

VENTURINI, G.C.; JÄGER, E.; OLIVEIRA, C.P.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A.M.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A. Formulation of lipid core nanocápsulas. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering. Aspects**, v.375, p.200–208, 2011.

WANG, Y.; JIANG, T. Understanding high grade glioma: molecular mechanism, therapy and comprehensive management. **Cancer Letters**, v.331, p.139–146, 2013.

WEN, P.; LOEFFLER, J.S.; MORRIS, J.H.; LAMPSON, L.A. The effects of irradiation on major histocompatibility complex expression and lymphocytic infiltration in the normal rat brain and the 9L gliosarcoma brain tumor model. **Journal of Neuroimmunology**, v.27, p.239–244, 1990.

WONG, H.L.; WU, X.Y.; BENDAYAN, R. Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.64, p.686–700, 2012.

WURDINGERA, T.; DEUMELANDTB, K.; VAN DER VLIET, H.J.; WESSELING, P.; GRUIJL, T.D. Mechanisms of intimate and long-distance cross-talk between glioma and myeloid cells: how to break a vicious cycle. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Reviews on Cancer**, v.1846, n.2, p.560–575, 2014.

XIN, H.; JIANG, X.; GU, J.; SHA, X.; CHEN, L.; LAW, K.; CHEN, Y.; WANG, X.; JIANG, Y.; FANG, X. Angiopep-conjugated poly(ethylene glycol)-co-poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles as dual-targeting drug delivery system for brain glioma. **Biomaterials**, v.32, p.4239–4305, 2011.

XU, Z.P.; NIEBERT, M.; PORAZIK, K.; WALKER, T.L.; COOPER, H.M.; MIDDELBERG, A.P.J.; GRAY, P.P.; BARTLETT, P.F.; LU, G.Q.M. Subcellular compartment targeting of layered double hydroxide nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v.130, p.86–94, 2008.

YAN, F.; ZHANG, C.; ZHENG, Y. The effect of Poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity. **Nanomedicine**, v.6, p.170–178, 2010.

YANG, M.; KIM, J.K.; KIM, J.; JANG, S.; KIM, S.H.; KIM, J.C.; SHIN, T.; WANG, H.; MOON, C. Acute treatment with methotrexate induces hippocampal dysfunction in a mouse model of breast cancer. **Brain Research Bulletin**, v.89, n.1/2, p.50–56, 2012.

YOON, S.; CHOI, J.R.; KIM, J.; SHIN, J.; ZHANG, X.; KANG, J. Influence of reduced folate carrier and dihydrofolate reductase genes on methotrexate-induced cytotoxicity. **Cancer Research Treatment**, v.42, n.3, p.163–171, 2010.

ZAGZAG, D.; ESENCAY, M.; MENDEZ, O.; YEE, H.; SMIRNOVA, I.; HUANG, Y.; CHIRIBOGA, L.; LUKYANOV, E.; LIU, M.; NEWCOMB, E.W. Hypoxia- and vascular endothelial growth factor-induced stromal cell-derived factor-1 α /CXCR4 expression in glioblastomas: one plausible explanation of Scherer's structures. **The American Journal of Pathology**, v.173, p.545–560, 2008.

ZAGZAG, D.; LUKYANOV, Y.; LAN, L.; ESENCAY, M.; MENDEZ, O.; YEE, H.; VOURA, E.B.; NEWCOMB, E.W. Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. **Laboratory Investigation**, v.86, p.1221–1232, 2006.

ZAGZAG, D.; MILLER, D.C.; CHIRIBOGA, L.; YEE, H.; NEWCOMB, E.W. Green fluorescent protein immunohistochemistry as a novel experimental tool for the detection of glioma cell invasion *in vivo*. **Brain Pathology**, v.13, p.34–37, 2003.

ZAGZAG, D.; ZHONG, H.; SCALZITTI, J.M.; LAUGHNER, E.; SIMONS, J.W.; SEMENZA, G. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α in brain tumors:

association with angiogenesis, invasion, and progression. **Cancer**, v.88, p.2606–2618, 2000.

ZAMAI, L., FALCIERI, E., MARHEM, G., VITALE, M. Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptotic cells in the absence of nucleosomal DNA fragmentation. **Cytometry**, v.23, p.303-311, 1996.

ZANOTTO-FILHO, A.; CORADINI, K.; BRAGANHOL, E.; SCHRÖDER, R.; OLIVEIRA, C.M.; SIMÕES-PIRES, A.; BATTASTINI, A.M.O.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; FORCELINI, C.M.; BECK, R.C.R.; MOREIRA, J.C.F. Curcumin-Loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.83, p.156–167, 2013.

ZUHORN, I.S.; KALICHARAN, R.. Lipoplex-mediated transfection of mammalian cells occurs through the cholesterol-dependent clathrin-mediated pathway of endocytosis. **Journal of Biological Chemistry**, v.277, p.18021-18028, 2002.

National Science Foundation. Nanotechnology definition NSET. 2000. Disponível Em: http://www.nsf.gov/crssprgm/nano/reports/omb_nifty50.jsp. Acessado em: Janeiro 2015.