UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós - Graduação em Farmácia

Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

Efeito de nanoemulsão contendo oleato de paclitaxel em
glioblastoma murino: Estudos *in vivo* e *in vitro*

Marina Cecília Spatti

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientador (a):

Prof. Dr (a). Sandra Helena Poliselli Farsky

São Paulo

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós - Graduação em Farmácia
Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

Efeito de nanoemulsão contendo oleato de paclitaxel em
glioblastoma murino: Estudos *in vivo* e *in vitro*

Marina Cecília Spatti

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018. O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientador (a):

Prof. Dr (a). Sandra Helena Poliselli Farsky

São Paulo
2016

Marina Cecília Spatti

Efeito de nanoemulsão contendo Oleato de Paclitaxel em glioblastoma
murino: estudos *in vivo* e *in vitro*

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr (a). Sandra Helena Poliselli Farsky
Orientadora/Presidente

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo, 15 de Junho de 2016

Ficha Catalográfica

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

S738e Spatti, Marina Cecília
Efeito de nanoemulsão contendo oleato de paclitaxel em
glioblastoma murino: estudos *in vivo* e *in vitro* / Marina Cecília
Spatti. -- São Paulo, 2016.
93p.

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 3. Quimioterápicos
4. Nanotecnologia I. T. II. Farsky, Sandra Helena Poliselli,
orientador.

615.90028 CDD

***Aos meus pais,
Isabel e Fernando, vocês são vencedores!
A minha irmã,
Melri, minha melhor amiga.
A Ricardo,
Pelo apoio, amor e cuidado.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida. Aos meus pais, por permitirem que eu chagasse mais longe, meus desesperos e desafios foram superados por amor a vocês.

Ao meu noivo, Ricardo Cestaro Chiqueto, pela paciência, amor e compreensão. O seu companheirismo, perdendo alguns finais de semana comigo para conclusão desse trabalho, o seu incentivo e as infinitas discussões científicas, faz deste trabalho, de algum modo, também ser seu.

A minha orientadora, Sandra Helena Poliselli Farsky, pela dedicação e permitir fazer parte da sua equipe.

Ao Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão, coordenador do Laboratório de Lipídes do Instituto do Coração – InCor - e professor titular na Universidade de São Paulo, por fornecer as nanoemulsões.

A todos que passaram pelo Laboratório de Toxicologia Experimental por compartilhar dos conhecimentos, das alegrias, das tristezas, das angústias, das frustrações e aprendizado, vocês fizeram parte desse processo de evolução. Natalia Rubio, amiga querida, tornou o caminho árduo mais suave. Muito obrigada por nunca se esquecer de mim.

A todos os técnicos e funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, especialmente a Paula por facilitar a minha vida no laboratório, Samantha por estar atenta aos prazos e a D. Luzia, pelo café, por ensinar respeito e dedicação.

A agência de fomento CAPES, pela bolsa concedida.

OBRIGADA!!!!

Digo-vos, pois: Pedi e ser-vos-á dado; procurai e achareis; batei e abrir-se-vos-á; porque todo aquele que pede, recebe; quem procura, encontra, e ao que bate, abrir-se-á.

Qual o pai de entre vós que, se o filho lhe pedir pão, lhe dará uma pedra? Ou, se lhe pedir um peixe, lhe dará uma serpente? Ou, se lhe pedir um ovo, lhe dará um escorpião?

Pois se vós, que sois maus, sabeis dar coisas boas aos vossos filhos, quanto mais o Pai do Céu dará o Espírito Santo àqueles que lho pedem!

(Evangelho de São Mateus, capítulo 7, versículo 7 – 11)

RESUMO

SPATTI, M. C. **Efeito de nanoemulsão contendo oleato de paclitaxel em glioblastoma murino: estudos *in vivo* e *in vitro***. 2016. 88f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O glioblastoma multiforme (GBM) é um tipo de câncer grave que acomete o sistema nervoso central (SNC), e a sobrevida dos pacientes é de aproximadamente 12 meses. O tratamento com o quimioterápico paclitaxel (PTX) reduz o GBM experimental e humano. No entanto, sua utilização é limitada pelas reações adversas graves que acarreta. A nanoemulsão rica em colesterol (LDE), a qual mimetiza a lipoproteína de baixa densidade, tem sido empregada como um sistema de entrega de fármacos eficiente em alguns casos de tumores. No presente trabalho visou-se avaliar a eficácia do oleato de PTX (OPTX), um derivado mais lipofílico do que o PTX, associado a LDE (LDE-OPTX) em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente, células tumorais da linhagem de glioblastoma murino GL261 foram incubadas com PTX em solução ou com LDE-OPTX, nas concentrações de 1 ou 10 μM . Os resultados obtidos mostraram que o tratamento *in vitro* com PTX e o LDE-OPTX causa toxicidade *in vitro* em células GL261 pela redução da proliferação e indução de apoptose, e que ainda reduz a secreção de MCP-1 (proteína quimiotóxica de monócitos). Os ensaios *in vivo* mostraram a toxicidade intensa do PTX comercial, uma vez que os animais com GBM não sobreviveram ao tratamento com 75mg/Kg, i.p., a cada 3 dias, e foram a óbito a partir do oitavo dia de tratamento. Diferentemente, os animais tratados com a mesma dose de LDE-OPTX sobreviveram ao tratamento, sem sinais de toxicidade, mas os dados obtidos mostraram que este protocolo de tratamento não foi eficaz para redução do volume tumoral. Assim, os animais com GBM passaram a ser tratados com doses diárias, i.p., de 15 mg/kg de PTX ou de 75mg/Kg de LDE-OPTX. Os resultados obtidos mostraram a ineficácia e eficácia dos tratamentos com PTX e LDE-OPTX, respectivamente, em reduzir o GBM; no entanto os animais tratados com LDE-OPTX apresentaram redução no peso corporal e no número de linfócitos circulantes. Em conjunto, os dados obtidos mostram a habilidade de preparação LDE-OPTX causar toxicidade *in vitro* nas células GL261 e sua eficácia terapêutica em dose elevada, em reduzir o GBM em modelo murino.

Palavras Chave: Toxicidade, eficácia terapêutica, nanotecnologia, GL261

ABSTRACT

SPATTI, M. C. **Effect nanoemulsion containing paclitaxel oleato in murine glioblastoma: in vivo and in vitro studies.** 2016. 88p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Glioblastoma multiforme (GBM) is a type of severe cancer that affects the central nervous system, and patient survival is about 12 months. The treatment with the chemotherapeutic paclitaxel (PTX) reduces the experimental and human GBM, however, their use is limited by side effects. The lipid nanoemulsion (LDE), that is mimetic to low density protein, has been employed as an efficient drug nanocarrier to treat cancer. Therefore, the present study aimed to assess the effectiveness of the oleate PTX (OPTX), a more lipophilic derivative of PTX, associated to (LDE), in *in vitro* and *in vivo* studies. Initially, glioblastoma murine strain GL261 was incubated with commercial PTX solution or LDE-OPTX at concentrations of 1 or 10 μ M. Data obtained showed that treatment with PTX or LDE-OPTX caused *in vitro* toxicity to GL261 cells, by reducing the proliferation and inducing apoptosis. Moreover, both treatments reduced the secretion of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *In vivo* experiments showed the severe toxicity of commercial PTX, as mice with GBM did not survive to the treatment with 75mg/kg, i.p., each 3 days, and died after 8 days of treatment. Conversely, animals treated with the same schedule of treatment with LDE-OPTX survived until the end of treatment, without any toxicity signal. Nevertheless, the treatment was not effective to reduce the GBM volume. Hence, other sets of animals with GBM were treated with daily i.p. dose of 15mg/kg of PTX or 75mg/kg of LDE-OPTX. Data obtained showed the inefficacy and efficacy of PTX and LDE-OPTX treatments, respectively, to reduce the volume of GBM. Nevertheless, mice treated with LDE-OPTX lost weight and lower number of circulating lymphocytes. Together, our data show the ability of LDE-OPTX treatment cause *in vitro* toxicity on GL261 cells e the *in vivo* therapeutic efficacy of higher doses on GBM murine model.

Key words: toxicity; therapeutic efficacy, nanotechnology, GL261

LISTA DE ABREVIATURAS

ABDI Agencia Brasileira de Desenvolvimento Industrial

ATA Ácido Tricloroacético

BHE Barreira Hematoencefálica

DMSO Dimetilsulfoxido

DNA Ácido Desoxirribonucléico

EPR Efeito de Aumento de Retenção e Permeabilidade

ETP Etoposídeo

FCF Faculdade de Ciências Farmacêuticas

FITC Isotiocianato de Fluoresceína

GBM Glioblastoma Multiforme

IL – 6 Interleucina 6

INCA Instituto Nacional do Câncer

IP Itraperitoneal

IOS International Organization for Standardisation

IV Intravenoso

LDE Nanoemulsão Rica em Colesterol

LDE-OPTX Nanoemulsão Contendo Oleato de Paclitaxel

LDL Low Density Lipoprotein

MCP-1 Proteína Quimiotática de Monócitos – 1

NF-kB Fator Nuclear Kappa B

NIOSHI National Institute of Occupational Safety & Health

NNI National Nanotechnology Initiative

NNI National Nanotechnology Initiative

NSF National Science Foundation

OECD Organisation for Economic Co-operation and Development

OPTX Oleato de Paclitaxel

PE Ficoetrina

PI Iodeto de Propídio

PTX Paclitaxel

R&D Research and Development

R10 Meio de cultura RPMI 1640 adicionado de 10% de SFB

ROS Reactive oxygen species

RPMI Roswell Park Memorial Institute

SFB Soro Fetal Bovino

SNC Sistema Nervoso Central

STAT 3 Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3

MAT Macrófago Associado ao Tumor

TMZ Temozolamida

TNF Fator de necrose tumoral

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização físico-química da nanoemulsão de oleato de paclitaxel.

Tabela 2: Efeito da inibição do crescimento de células GL261 após incubação com LDE-OPTX ou PTX. Valores representados em IC50 (log e μM).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Acúmulo de fármacos no microambiente tumoral devido à maior permeabilidade vascular e o efeito de retenção. Adaptado de DUNCAN, 2003.....	22
Figura 2 Estrutura da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e da nanoemulsão (LDE).....	24
Figura 3 Células gliais maduras e seus precursores. Adaptado de: Huse e Holland, 2010.	26
Figura 4 Mecanismo de ação dos taxanos.....	31
Figura 5 Esquema representativo dos três protocolos experimentais <i>in vivo</i> utilizados para investigar a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) ou avaliação da diminuição do crescimento tumoral após os diferentes tratamentos	38
Figura 6 Curva de tendência concentração - resposta das incubações com LDE-OPTX ou PTX em células GL261.....	48
Figura 7 Efeito de diferentes concentrações de nanoemulsão contendo oleato de paclitaxel (LDE-OPTX) sobre o crescimento de células GL261.	49
Figura 8 Comparação dos efeitos do paclitaxel em solução (PTX) e nanoemulsão contendo oleato de PTX (LDE-OPTX) sobre o crescimento celular.	50
Figura 9 Efeitos dos tratamentos com PTX ou LDE-OPTX sobre o ciclo de células GL261	51
Figura 10 Efeitos dos tratamentos com PTX ou LDE-OPTX sobre fragmentação do DNA de células GL261.....	51
Figura 11 Efeitos dos tratamentos com PTX ou LDE-OPTX sobre a viabilidade das células de GBM (GL261).....	52
Figura 12 Determinação da concentração de nitrito em células GL261	53
Figura 13 Efeitos dos tratamentos com PTX ou LDE-OPTX sobre a formação de EROs nas células GL261	54
Figura 14 Efeitos dos tratamentos com PTX ou LDE-OPTX sobre a secreção da quimiocina MCP-1 no sobrenadante de células GL261	55
Figura 15 Efeito da velocidade de infusão dos diferentes tratamentos em camundongos C57BL/6.....	56
Figura 16 Efeitos dos tratamentos <i>in vivo</i> com PTX ou LDE-OPTX sobre a integridade da barreira hematoencefálica	57
Figura 17 Efeitos dos tratamentos <i>in vivo</i> com PTX ou LDE-OPTX sobre o volume tumoral do glioblastoma	58

Figura 18 Efeitos dos tratamentos <i>in vivo</i> com PTX ou LDE-OPTX sobre o peso corporal dos camundongos com GBM	59
Figura 19 Efeitos dos tratamentos <i>in vivo</i> com PTX ou LDE-OPTX sobre a leucograma de camundongos com GBM	60
Figura 20 Determinação do volume do GBM em camundongos tratados com solução de PTX ou de LDE-OPTX uma vez ao dia	62
Figura 21 Efeitos dos tratamentos <i>in vivo</i> com PTX ou LDE-OPTX sobre o peso corporal dos camundongos com GBM	63
Figura 22 Efeitos dos tratamentos <i>in vivo</i> com PTX ou LDE-OPTX sobre o consumo de ração dos camundongos com GBM	64
Figura 23 Efeitos dos tratamentos <i>in vivo</i> com PTX ou LDE-OPTX sobre o leucograma dos camundongos com GBM – análise morfológica.....	65
Figura 24 Efeitos dos tratamentos <i>in vivo</i> com PTX ou LDE-OPTX sobre o leucograma dos camundongos com GBM – análise por citometria de fluxo	66
Figura 25 Efeitos dos tratamentos <i>in vivo</i> com PTX ou LDE-OPTX sobre os leucócitos na medula óssea de camundongos com GBM.....	67

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Nanotecnologia, nanotoxicologia e a aplicação de compostos nanoestruturados no tratamento do câncer	19
1.2 Nanoemulsão rica em colesterol (LDE) para tratamento do câncer	23
1.3 Gliomas	26
1.3.1 Glioblastoma multiforme (GBM)	28
1.4 Paclitaxel (PTX)	30
2 OBJETIVO	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Obtenção e caracterização da LDE contendo OPTX e preparação da solução comercial de paclitaxel.....	35
3.1.1 Associação do OPTX a LDE	36
3.1.2 Preparação da formulação comercial de PTX.....	36
3.2 Culturas das linhagens celulares de GBM murino GL261	37
3.3 Tratamentos <i>in vitro</i> e Grupos Experimentais	37
3.4 Animais	37
3.5 Tratamentos <i>in vivo</i> e, Grupos e Protocolos Experimentais.....	38
3.6 Obtenções de amostras biológicas	39
3.6.1 Coleta de sangue circulante e medula óssea.....	39
3.6.2 Coleta do cérebro.....	40
3.7 Ensaios <i>in vitro</i>.....	40
3.7.1 Concentração Inibitória (IC50%)	40
3.7.2 Curva de crescimento das células GL261	42
3.7.3 Ciclo celular e fragmentação do DNA	42
3.7.4 Viabilidade celular	43
3.7.5 Determinação da concentração de nitrito	43
3.7.6 Caracterização das espécies reativas de oxigênio	44
3.7.7 Quantificação de MCP-1	44
3.8 Ensaios <i>in vivo</i>	44

3.8.1 Medida da velocidade de infusão das preparações	44
3.8.2 Permeabilidade da barreira hematoencefálica	45
3.8.3 Injeção de células GL261 em camundongos e avaliação do crescimento tumoral.....	45
3.8.4 Leucograma	46
3.8.5 Avaliação dos leucócitos circulantes por citometria de fluxo.....	47
3.9 Análises estatísticas	47
4 RESULTADOS.....	47
4.1 Ensaios in vitro.....	47
4.1.1 IC50%	47
4.1.2 Efeitos dos tratamentos com PTX ou LDE-OPTX sobre o crescimento das células GL261	49
4.1.3 Efeitos dos tratamentos com PTX ou LDE-OPTX sobre o ciclo e fragmentação de DNA de células GL261	50
4.1.4 Efeitos dos tratamentos com PTX ou LDE-OPTX sobre a viabilidade das células GL261	52
4.1.5 Efeitos dos tratamentos com PTX ou LDE-OPTX sobre a concentração de nitrito nas células GL261	53
4.1.6 Efeitos dos tratamentos com PTX ou LDE-OPTX sobre a formação de EROS.....	53
4.1.7 Efeitos dos tratamentos com PTX ou LDE-OPTX sobre a secreção de MCP-1 por células GL261	54
4.2 Ensaios <i>in vivo</i>	55
4.2.1 Determinação da velocidade de infusão do PTX ou LDE-OPTX em camundongos.....	55
4.2.2 Efeitos dos tratamentos com PTX ou LDE-OPTX sobre a integridade da BHE.....	56
4.2.3 Efeitos dos tratamentos <i>in vivo</i> com 75 mg/Kg de PTX ou LDE-OPTX sobre o desenvolvimento do GBM	57

4.2.4 Efeitos dos tratamentos *in vivo* com 15 mg/Kg de PTX ou 75 mg/Kg de LDE-OPTX sobre o desenvolvimento do GBM.....61

5. DISCUSSÃO68

6. CONCLUSÕES.....75

7. REFERÊNCIAS.....76

Anexo A: Informações para os Membros de Banca Julgadoras de Mestrado/Doutorado.

Anexo B: Pareceres da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Ofício CEUA 23.2014 Protocolo – 450

Anexo C: Ficha do Aluno

1 INTRODUÇÃO

1.1 Nanotecnologia, nanotoxicologia e a aplicação de compostos nanoestruturados no tratamento do câncer

As primeiras inspirações sobre nanotecnologia surgiram em uma palestra em 1959, quando o físico norte americano Richard Feynman, transmitiu a ideia que a criação de novos materiais era questão de conhecimento e tecnologia, alegando que os princípios da física não impossibilitam a manipulação de um por um dos átomos. Mas somente em 1974, Norio Taniguchi, um pesquisador da Universidade Científica de Tóquio cria a palavra “nanotecnologia”, definindo-a como um conjunto de estudos e aplicações referentes aos objetos e processos na escala nanométrica. Em 1986, Eric Drexler, o primeiro a se formar em doutor em nanotecnologia, populariza o termo nanotecnologia em seu livro “Engines of Criation” (NIOSH, 2015).

Atualmente, não há um consenso internacional sobre o conceito de nanotecnologia, sendo esse conceito modificado, para se adequar ao avanço da ciência. No relatório de acompanhamento setorial da Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial ABDI (2013) o conceito de nanotecnologia compreende o controle da matéria na escala nanométrica, com dimensões de cerca de 1 a 100 nanômetros (nm), onde fenômenos únicos permitem novas aplicações. Esse conceito é o mais difundido por diferentes organizações mundiais.

Para a International Organization for Standardization (ISO), a nanotecnologia têm que contemplar minimamente alguns aspectos como entendimento e controle da matéria e processos em nanoescala, tipicamente, mas não exclusivamente, abaixo de 100 nanômetros em uma ou mais dimensões onde ocorrem fenômenos dependentes de tamanho e de novas aplicações, como a produção de novas estruturas, materiais e dispositivos. Outro aspecto está relacionado à utilização das propriedades dos materiais em nanoescala que são diferentes das propriedades dos átomos individuais, moléculas, ou dos materiais macroscópicos, criando materiais, dispositivos e sistemas melhores que exploram essas novas propriedades. Essa definição também é compartilhada pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (NIOSH, 2015.)

A nanotecnologia definida por National Nanotechnology Initiative (NNI) é a compreensão e controle da matéria em dimensões entre 1 a 100 nm, onde surgem

fenômenos únicos que permitem novas aplicações envolvendo imagem, medição, modelagem e manipulação de matéria na nanoescala (ISO, 2015).

Dessa maneira, o conceito também engloba não somente a produção de estruturas nanométricas, mas também as técnicas utilizadas para manipular a matéria nessa escala. (BUXTON *et al.*, 2003).

A NNI é uma iniciativa do governo dos Estados Unidos de pesquisa e desenvolvimento (R&D) que envolve atividades relacionadas à nanotecnologia com a cooperação de agências federais. O investimento da NNI foi de 22 bilhões de dólares desde 2001, já incluindo uma estimativa para 2016. (NANO.GOV, 2015). Um dos setores de mais rápido crescimento nessa área é a nanobiotecnologia, especificamente na entrega de fármacos na oncologia que chegará em 2017 a U\$ 6 bilhões (ANTUNES, *et al.*, 2013).

A produção industrial em nanotecnologia vem crescendo significativamente nos últimos anos, o que contribui para os diversos setores tecnológicos (ALVES, *et al.*, 2005), resultando em inúmeras aplicações para produtos de consumo, sendo muitas extensamente comercializadas e cada vez mais incorporadas no cotidiano. Contudo, a investigação sobre os seus potenciais efeitos para o ambiente e saúde humana cresce mais lentamente que a produção e exposição a esses produtos (VANCE, *et al.*, 2015).

A discussão sobre a nanotoxicologia, que é uma nova área do conhecimento, é bastante pertinente, uma vez que apesar dos materiais não serem prejudiciais na sua forma original, podem tornam-se tóxicos em nanoescala, (OBERDÖRSTER, 2010), e as características dos nanomateriais como tamanho, área superficial, aglomeração e dispersão podem facilitar acúmulo no meio ambiente. Assim, a investigação sobre o potencial risco toxicológico dos nanomateriais é primordial, embora seja muito complexa porque além das variações físico químicas, cada nanomaterial pode apresentar características intrínsecas o que acaba por dificultar a extrapolação dos resultados a outras classes de nanomateriais (PASCHOALINO, *et al.*, 2010). Alguns anos de pesquisa nessa área já confirmaram que os materiais em nanoescala exibem toxicidade inesperada e incomum. Assim, nanopartículas podem adquirir uma corona de proteínas quando expostas a fluidos biológicos, e essa camada pode influenciara interação célula/ nanopartícula. Além disso, as nanopartículas podem induzir modificações estruturais a proteínas, levando toxicidade. No entanto, há

pouco conhecimento sobre as interações entre a engenharia dos nanomateriais com os seres humanos, animais e o meio ambiente (NATURE NANOTOXICOLOGY, 2011).

Adicionalmente, outro fator que dificulta o maior entendimento da nanotoxicologia é a diversidade de sistemas de estudos, que levam a conclusões distintas sobre o mesmo nanomaterial. Este fato ocorre porque os nanomateriais têm formas e área de superfícies que facilitam sua difusão, aglomeração e agregação de acordo com o seu tamanho, densidade e propriedades físico-químicas (TEEGUARDEN, *et al.*, 2007). A Nanotoxicologia é extremamente relevante para a área farmacêutica, uma vez que os parâmetros de cinética e dinâmica, que elucidam a absorção, biotransformação, distribuição e excreção, bem como o mecanismo de ação, podem ser distintos em compostos nanoestruturados em relação ao composto original (HUBBS, *et al.*, 2011).

A nanotecnologia na área do câncer tem grande destaque, pois podem ser modificadas para terem multifuncionalidades, sendo aplicadas simultaneamente como agentes de contraste em imagens, agentes terapêuticos e/ou veículos para entrega de fármacos (GROBMYER, *et al.*, 2011). Dessa forma, a utilização de nanocompostos para tratamento do câncer pode permitir a redução dos efeitos adversos da terapêutica quimioterápica tradicional. Muitas variedades de nanopartículas estão disponíveis e possuem potencial para o uso no tratamento do câncer, incluindo diferentes metais, polímeros, lipossomas, partículas lipídicas sólidas e nanoemulsões (TORCHELIN, 2007).

A associação dos fármacos aos sistemas nanoestruturados possibilitou o aumento da seletividade tumoral em sítios específicos sem a necessidade de um alvo celular específico para o tumor (LIU, *et al.*, 2015). De fato, estudos demonstram que fármacos têm sua circulação sanguínea prolongada quando conjugados com polímeros ou nanopartículas e que na ausência de ligantes de alvos específicos se acumulam em tumores, sugerindo um mecanismo que retém os fármacos no microambiente tumoral. (DUNCAN, 2003). O “efeito de aumento de retenção e permeabilidade” (EPR) ocorre devido às anomalias nos vasos sanguíneos tumorais, fazendo com que a vascularização, necessária para a entrada de nutrientes e oxigênio para o microambiente tumoral, torna os vasos permeáveis e a diminuição

da drenagem linfática acaba não removendo, de forma eficiente, as macromoléculas (MATSUMURA E MAEDA, 1986).

Figura 1 Acúmulo de fármacos no microambiente tumoral devido à maior permeabilidade vascular e o efeito de retenção.

Acúmulo dos nanomateriais no tumor devido, pelo menos em parte, as fenestras dos vasos sanguíneos tumorais e da ineficácia da drenagem linfática. Adaptado de DUNCAN, 2003.

Desde a identificação do EPR alguns estudos demonstraram que a partir do efeito EPR o acúmulo de macromoléculas e partículas nanométricas, de forma passiva, ocorre em tecidos de tumores sólidos (MAEDA, 2001; MATTHEOLABAKIS, *et al.*, 2012). Apesar de ser um fenômeno variável, os pacientes podem se beneficiar na terapia com partículas nanométricas, através de melhor eficácia ou na redução da acumulação do fármaco em tecidos saudáveis através do EPR (THEEK, *et al.*, 2014). Dessa forma, a utilização de nanocompostos para tratamento do câncer pode

permitir a redução dos efeitos adversos da terapêutica quimioterápica tradicional. Muitas variedades de nanopartículas estão disponíveis e possuem potencial para o uso no tratamento do câncer, incluindo diferentes metais, polímeros, lipossomas, partículas lipídicas sólidas e nanoemulsões (TORCHELIN, 2007).

1.2 Nanoemulsão rica em colesterol (LDE) para tratamento do câncer

A lipoproteína de baixa densidade (LDL) é a principal lipoproteína responsável por carrear o colesterol no sangue (DUCOBU, 1990). Além da superfície apolar composta por fosfolipídios, colesterol não esterificado e um núcleo polar constituído por ésteres de colesterol, as LDL possuem apolipoproteína B100 como parte protéica que se liga a receptores específicos localizados em depressões na membrana celular revestido por uma proteína, a clatrina (MARANHÃO, *et al.*, 1994). Após essa interação dos receptores com a lipoproteína ocorre invaginação, formando vesículas endocíticas. Através da fusão do lisossomo com a vesícula há a degradação e liberação dos lipídeos no citoplasma assim, as células utilizam desse colesterol para a síntese de membranas celulares (GOLDSTEIN; BROWN, 2009). Já foi confirmado o fenômeno de superexpressão dos receptores de LDL em vários tipos de células neoplásicas, como células de glioma maligno humano, U-251 MG (RUDLING *et al.*, 1983), células de melanoma, B16F10 (VERSLUIS *et al.*, 1996), e linhagens celulares de glioblastoma humano, como U-87MG, U-251MG, SF-767 (MALETINSKA *et al.*, 2000). Os trabalhos de Michael Stuart Brown e Joseph Goldstein, conquistaram o Premio Nobel de Fisiologia ou Medicina 1995, quando elucidaram o metabolismo do colesterol e descobriram o aumento de receptores de LDL em células cancerígenas, abrindo novas perspectivas para o tratamento do câncer.

Pelas dificuldades encontradas em isolar e manusear a LDL do sangue, Maranhão e colaboradores (1993) desenvolveram uma nanoemulsão (LDE) com estrutura semelhante a LDL, e mesma cinética plasmática. Mesmo que não contendo a parte protéica, a LDE quando injetada na corrente sanguínea, entra em contato com as lipoproteínas naturais, adquirindo entre outras a apo E, que é reconhecido pelos receptores de LDL, a qual tem mais afinidade pelos receptores do que a própria LDL (MARANHÃO *et al.*, 1993).

Os trabalhos envolvendo a LDE, sob a supervisão do Professor Raul Maranhão mostraram resultados satisfatórios tanto na redução do câncer quanto na toxicidade dos quimioterápicos associados à LDE (RODRIGUES, *et al.*, 2005; DIAS, *et al.*, 2007; TEIXEIRA, *et al.*, 2008; PIRES, *et al.*, 2009; MENDES, *et al.*, 2009; LOURENÇO-FILHO, *et al.*, 2011; KRETZER, *et al.*, 2012), como em doença aterosclerótica em modelo animal (MARANHÃO, *et al.*, 2008).

Figura 2 Estrutura da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e da nanoemulsão (LDE).

Diferenças entre a LDL e a LDE, a apolipoproteína, parte protéica das lipoproteínas, só adere as LDE após as diversas colisões com as lipoproteínas na corrente sanguínea. Fonte: modificado de www.lookfordiagnosis.com

O tamanho de 70 nm das gotas das nanoemulsões pode resistir à desestabilização física causada pela separação gravitacional, floculação e / ou a coalescência (BERNARDI, *et al.*, 2011). Nanoemulsões podem ser usadas para direcionar fármacos antineoplásicos para o foco tumoral, como foi demonstrada em câncer de mama, carcinoma de ovário, leucemia mielóide e mielomas múltiplos. (TAVARES *et al.*, 2011). As nanoemulsões contendo diversos tipos de agentes terapêuticos têm sido estudadas nos últimos tempos. Dentre as vantagens dos sistemas de entrega de fármacos em nanoemulsões estão: excelente

biocompatibilidade, ótima biodegradabilidade e capacidade de carregar, tanto fármacos hidrófilos quanto hidrófobos (ZHANG *et al.*, 2013).

Estas características, em conjunto, estão presentes na LDE e conferem a esta potencial para atuar como transportador de fármacos na terapia do câncer (MARANHÃO *et al.*, 1993). De fato, quando agentes quimioterápicos, dentre eles: carmustina, etoposídeo (ETP), paclitaxel (PTX) ou daunorrubicina (DNR) foram incorporados a essas nanoemulsões, observou redução acentuada na toxicidade causada por estes agentes (MARANHÃO, *et al.*, 2002; RODRIGUES, *et al.*, 2002; VALDUGA *et al.*, 2003)

A ação farmacológica, da carmustina associada à LDE, não diminuiu em células cancerígenas comparado com o fármaco livre. Além disso, a captação do complexo LDE-carmustine pelo tumor foi maior comparado tecido normal correspondente, e os pacientes com tumor apresentaram efeitos adversos mínimos, mesmo com doses elevadas de LDE-carmustine. (MARANHÃO, *et al.*, 2002).

Ainda, etoposídeo (ETP) ou paclitaxel (PTX) incorporados a LDE causaram diminuição do crescimento tumoral de camundongos com melanoma; ademais, observou-se redução de 30% das metástases em camundongos C57BL/6 tratados com LDE-PTX+ETP (associação de LDE com paclitaxel e etoposídeo) comparados com o grupo de camundongos tratados com solução comercial de PTX+ETP (paclitaxel e etoposídeo). A toxicidade observada pela diminuição da massa corpórea dos animais e mielossupressão foi menor nos camundongos com melanoma tratados com LDE-PTX+ETP comparados com os animais que receberam o tratamento com solução comercial de PTX+ETP (KRETZER *et al.*, 2012).

Rodrigues e colaboradores (2005) realizaram ensaios de toxicidade em camundongos C57BL/6 e mostraram que a DL50 de LDE– oleato de paclitaxel (LDE-OPTX) é menor (DL50=326 $\mu\text{M/kg}$) que o PTX (DL50=37 $\mu\text{M/kg}$). Quando comparado a toxicidade de ambos os veículos, Cremophor EL para o PTX e LDE para a LDE-OPTX, verificou-se que Cremophor EL foi muito mais tóxico que LDE. A maior dose tolerada de LDE-OPTX foi 178 $\mu\text{M/kg}$ e a dose máxima tolerada da solução comercial (PTX) foi de 18 $\mu\text{M/kg}$. Rodrigues e colaboradores (2005) mostraram também, nos ensaios *in vitro* com células de carcinoma de pulmão humano (NCIH292) que a modificação química do paclitaxel para oleato de paclitaxel não alterou a atividade citostática do fármaco. Apesar dos melhores

resultados demonstrados com o uso de nanoemulsões comparado às formulações tradicionais no tratamento de alguns tipos de câncer, não se sabe ainda o comportamento desses agentes no tratamento de câncer cerebral, como o glioblastoma maligno.

1.3 Gliomas

Os gliomas são um grupo de tumores histologicamente heterogêneos, desenvolvendo-se a partir de células tronco neural ou seus precursores (HUSE, HOLLAND, 2010), sendo que a maioria possui um comportamento biológico maligno. Gliomas são os mais comuns e devastadores tumores primários do sistema nervoso central (SNC) (GERHARTDT, *et al.*, 2009) com um difícil diagnóstico e tratamento, fundamentalmente são da linhagem astrocitária, oligodendroglial ou ependimária (DOOLITTLE, 2004).

Figura 3 Células gliais maduras e seus precursores. Adaptado de: Huse e Holland, 2010.

Mundialmente, os tumores que afetam o SNC representam 1,9% das neoplasias. No Brasil, foi estimado para os anos de 2014 e 2015, 576 mil novos casos de câncer, sendo que desses novos casos, 8,6% representam o câncer no

SNC para os homens e 7,17% para as mulheres (INCA 2014). A sobrevida dos pacientes com câncer do SNC é baixa, sendo que apenas 5 a 10% sobrevivem por dois anos (BLEEHEN; STEENING, 1991).

Segundo a OMS, para classificação dos gliomas foram considerados parâmetros, como tipo celular, grau de malignidade e localização (STUPP, *et al.*, 2010). Quanto ao tipo celular, a classificação se baseia na semelhança fenotípica das células tumorais, com os diferentes tipos de células gliais (astrócitos, oligodendrócitos) (FULLER; SCHEITHAUER, 2007).

O grau de malignidade é representado numericamente de I a IV (LOPES, *et al.*, 2012), onde I corresponde ao menor grau de malignidade e IV maior grau de malignidade (WELLER, *et al.*, 2015). Tumores de grau I são aplicados a lesões com baixo potencial proliferativo e com possibilidade de cura após cirurgia; a designação para grau II são células infiltrativas, mas, muitas vezes se repetem com tendência para evolução de grau mais elevado. Neoplasia com classificação de grau III são com histologia de malignidade que inclui núcleo atípico e atividade mitótica rápida e o grau IV são atribuídas a neoplasias mitoticamente ativas e necrose (LOUIS *et al.*, 2007; FULLER, SCHSITHAUER, 2007).

Um dos fatores que contribui para agressividade tumoral é o processo inflamatório (CRUSZ; BALKWILL, 2015). Nos gliomas a contribuição, desses processos inflamatórios envolve a micróglia (CHHOR *et al.*, 2013).

A micróglia é a célula do SNC responsável pela imunidade inata, sendo considerada como os macrófagos residentes do cérebro (GRACE *et al.*, 2014). Quando há uma lesão no SNC, ocasionada por doenças neurodegenerativas, acidente vascular cerebral ou tumores cerebrais, a micróglia, é ativada, expressando mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio (EROs) (GUTMANN, 2015). As EROs ocasionam danos celulares, acelerando o processo mutagênico, elevando o grau de malignidade dos gliomas (KURASHY, *ET AL.*, 2011).

A localização dos gliomas se estende por todo cérebro, entretanto, observa-se predileção com base nos grupos etários (NAKAZATO, 2008). Em crianças, costumam ocorrer no hipotálamo e em regiões infratentoriais, ou seja, abaixo do tentorium cerebelar (tronco cerebral e cerebelo), e em adultos, geralmente, são

supratentoriais e centralizados na substância branca nos hemisférios cerebrais (STIEBER, 2001).

Os sinais e sintomas de pacientes com gliomas dependem da sua localização, extensão e edema cerebral. Os sinais e sintomas mais comuns incluem dor de cabeça, dificuldade ao falar e deglutir; dificuldade de concentração, desorientação, náuseas, vômitos, fadiga extrema, perda de memória, de coordenação e visão; paralisia em áreas do corpo e convulsões (FARINA, *et al.*, 2014).

Após o diagnóstico, o tratamento adequado é prescrito de acordo com as características do glioma, como tamanho, histologia, perfil molecular e estágio do tumor. Assim, se o tumor está localizado no cérebro de forma que o procedimento cirúrgico é possível, a cirurgia é a primeira opção, e se necessário seguido de tratamento radioterápico e quimioterápico para prevenção de recorrência (LI, 2010).

1.3.1 Glioblastoma multiforme (GBM)

GBM é o glioma primário mais comum no SNC em adultos (REARDON & WEN, 2015). Origina-se das células astrocíticas, que tem função de fornecer suporte estrutural para os neurônios, além de exercer o clearance de detritos celulares (HUSE; HOLLAND, 2010). O termo GBM foi introduzido por Cushing, na segunda metade do século XIX (CUNHA, *et al.*, 2010). A localização mais relatada do glioblastoma é a região supratentorial, sem predileção pelos hemisférios cerebrais. Comumente ocorre nos lobos frontais e parietais, sendo que a ocorrência é rara nos lobos occipitais e na região bilateral do cérebro (CUNHA, *et al.*, 2010). Quanto às características histológicas apresentam atipia nuclear, aumento da proliferação, proliferação microvascular e necrose (HUSE; HOLLAND, 2010).

Atualmente, não há conhecimento para a prevenção do GBM, mas possíveis fatores de risco já foram discutidos, como o uso de telefones celulares (INCA, 2014). Outro fator de risco é a exposição prévia a radioterapia, como acontece para o tratamento de leucemia (GALLEGO, 2015). Ademais, neurofibromatoses e algumas síndromes são conhecidas por aumentar o risco de GBM (GALLEGO, 2015). O GBM apresenta alguns sintomas clínicos característicos que incluem: dores de cabeça progressivas, déficits neurológicos focais e convulsões (LIMA *et al.*, 2012).

O tratamento atual padrão para o GBM recém diagnosticado é ressecção máxima do tumor (quando possível), seguida de radioterapia associada à quimioterapia por Temozolomida (TMZ).

A TMZ pertence a uma classe de agentes alquilantes (NAJMAN; GADELHA, 2002), e em pH fisiológico é convertida a 5-3- (methyltriazene-1-yl) imidazole-4-carboximide (MTIC), e após a degradação é capaz de metilar o DNA (SOUSA *et al.*, 2015). Por ser uma substância lipofílica, atravessa a barreira hematoencefálica (BHE), alcançando tumores cerebrais (NAJMAN; GADELHA, 2002). Contudo, melhorias na sobrevida de pacientes com GBM têm sido modestas, e normalmente o GBM tem recidivas, sendo que a sobrevida dos pacientes não é prolongada com nenhum dos tratamentos atuais (WELLER, 2011; PREUSSER *et al.*, 2015).

Um fator que contribui para o fracasso de muitos medicamentos contra o GBM é o acesso limitado ao tumor através BHE (GROSSMAN, *et al.*, 2012). A BHE é uma barreira física fisiológica que restringe a entrada de compostos exógenos ao cérebro, incluindo muitas terapias antitumorais (GROSSMAN *et al.*, 2012), por possuir junções celulares estreitas impedindo, portanto, a absorção de fármacos. Além disso, a BHE expressa bomba de efluxo de fármacos, como a glicoproteína P, que promove a remoção dos fármacos no cérebro (LOPES, *et al.*, 2012).

Ademais, o processo inflamatório local, em alguns casos, pode diminuir os efeitos benéficos da terapia, podendo gerar resistência (GRIVENNIKOV, *et al.*, 2010), uma vez que citocinas inflamatórias são produzidas pelas células tumorais e por células imunes infiltrante, resultando em ativação crônica de NF- κ B e STAT3 (MCFARLAND, *et al.*, 2013) que são importantes fatores de transcrição envolvidos na mediação da resposta inflamatória (GRIVENNIKOV, 2010). Em GBM, a ativação de NF- κ B e STAT3 é bem mais expressiva e uma vez ativadas nas células tumorais, em resposta a estímulos como citocinas e estresse, podem controlar a expressão de genes anti-apoptóticos e de proliferação (GRIVENNIKOV; KARIN, 2010). Na inflamação a liberação de citocinas, como a IL-6 e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), pode contribuir para a progressão do glioblastoma, uma vez que, está relacionada a vias de proliferação e invasão de tumores, assim como a quimiocina MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos – 1; ZHAI *et al.*, 2011). A MCP-1 é membro da família de quimiocinas C-C (MCP-1/CCL2), composta por 76 amino ácidos e 13 kDa de tamanho, sendo uma das principais quimiocinas que regulam a

migração e infiltração de macrófagos/microglia (DESHAMANE, *et al.*, 2009). Estudos *in vitro* com células GL261 mostraram que a expressão de MCP-1 pelo tumor está diretamente envolvida com acúmulo de macrófagos/microglia no glioma, promovendo a agressividade do tumor (ZHU, *et al.*, 2011).

Assim, esses fatores de limitações tanto nos tratamentos quanto no mau prognóstico do GBM, são consideráveis para o desenvolvimento por novas abordagens terapêuticas. O emprego da nanotecnologia, em particular na área do câncer, promete melhorar a entrega da terapia especificamente para o tumor e, portanto, reduzir os efeitos adversos indesejados da quimioterapia. Além disso, agentes quimioterápicos potentes que foram abandonados devido a efeitos adversos graves poderão ser reutilizados usando nanotecnologia para sistemas de distribuição mais eficientes, favorecendo sua utilização viável para o tratamento do câncer (HOOK *et al.*, 2010).

1.4 Paclitaxel (PTX)

O PTX pertence a um grupo de fármacos antineoplásicos, os taxanos; foi descoberto pelo botânico Arthur Barclay em 1962, a partir da casca da planta *Taxus brevifolia*, embora somente em 1971 tenha sido isolado e extraído (WANI *et al.*, 1971). Em 1979 seu mecanismo antitumoral foi identificado e diferentemente dos alcalóides da vinca e colchicina, que inibem a formação de microtúbulos, o PTX induz a polimerização destes. Foi demonstrado que o PTX é eficaz no tratamento de carcinoma epitelial de ovário, câncer de próstata, câncer de mama, colo uterino, células tumorais de pulmão e sarcoma de kaposi (MICHA, *et al.*, 2007; MUSTACCHI, *et al.*, 2015; YARED; TRACZUK, 2012). Em muitos países, inclusive no Brasil, o PTX é usado como tratamento antineoplásico de primeira linha em câncer de ovário, e de segunda linha em câncer de mama (ROWINSKY, 1997). Sendo um composto hidrofóbico, acredita-se que pode penetrar nas células por difusão passiva.

Na forma como o PTX é apresentado atualmente no mercado, ou seja, diluído em partes iguais de etanol e Cremophor EL, numa preparação denominada de Taxol® (Bristol-Myers-Squibb) ocorre toxicidade promovida pelo Cremophor EL, o qual induz a liberação de histamina levando à hipersensibilidade grave. Dessa forma, o tratamento quimioterápico fica comprometido a não ser que sejam adotadas medidas profiláticas com o uso de anti-histamínicos ou corticosteróides a fim de

diminuir os efeitos tóxicos (DIAS *et al.*, 2006). Como já salientado o mecanismo de ação do PTX está relacionado à polimerização dos heterodímeros α - e β - tubulinas, que são subunidades de proteínas solúveis dos microtúbulos. Essa polimerização estabiliza os microtúbulos, que são componentes necessários durante a divisão celular e na manutenção do formato celular, além de influenciarem uma variedade de atividades celulares, como: a mobilidade celular, o transporte de organelas, a secreção extracelular, a interação entre os receptores de superfície, o crescimento e sinais de transdução intracelular. Qualquer interferência nos microtúbulos acarretará paralisação da divisão e mobilidade celular, já que a fase G2 tardia ou M do ciclo celular estará bloqueada (MANFREDI *et al.*, 1984).

Figura 4 Mecanismo de ação dos taxanos. Adaptado de: Cardoso, 2009.

O alvo principal dos antineoplásicos alcalóides é a inibição da mitose, além da interferência sobre os microtúbulos, mesmo das células que não estão em estado proliferativo, e que também necessitam da polarização dos microtúbulos para manter as suas funções, como as células neurais, onde o transporte axonal que contém os neurotransmissores é guiado pelos microtúbulos (TRUDEAU, 1996). A não seletividade para as células tumorais leva a efeitos adversos, tais quais: alopecia (HAIT *et al.*, 2007), toxicidade gastrointestinal (ATTARD *et al.*, 2006), toxicidade epitelial, mucosite (KIRSCH-VOLDERS, 1996) e neuropatia periférica (HAIT *et al.*,

2007). Os sintomas que mais levam à interrupção do tratamento incluem perda da função motora, neurotoxicidade e mielossupressão. Dentre os sintomas neuropáticos, estão: dormência e formigamento nas extremidades, perda dos reflexos tendinosos profundos e fraqueza muscular distal. A mielossupressão decorre da estabilização dos microtúbulos mitóticos de células hematopoiéticas, o que inibe a sua proliferação (HAIT *et al.*, 2007).

Pra diminuir os efeitos foram necessárias modificações na molécula ou no solvente do paclitaxel. Nesse sentido, destacaram-se a utilização de veículos ou transportadores como lipossomas, ciclodextrinas, micelas poliméricas emulsões e nanopartículas (CALLEJA, *et al.*, 2014; MUSTEATA; PAWLISZYN, 2006; YONCHEVA, *et al.*, 2012; LUNDBERG, 2002; 2011).

A síntese de derivados do paclitaxel também é proposta para a diminuição da toxicidade. Para tanto, modificações na sua molécula aumentando a hidrofiliabilidade, possibilita que o paclitaxel seja transportado por veículos aquosos, enquanto as alterações para aumentar a sua lipofiliabilidade permitiriam o transporte em veículos mais lipídicos.

Estudos demonstraram que a administração de um derivado do PTX mais lipofílico, chamado oleato de PTX (OPTX), proporcionou maiores concentrações de paclitaxel plasmático em coelhos, indicando sua maior biodisponibilidade. Os dados farmacocinéticos apresentaram maior ASC (área sobre a curva), C_{max} superior, e depuração sistêmica inferior quando o paclitaxel foi formulado em oleato na emulsão lipídica recoberta com polietilenoglicol do que quando formulado em Cremophor EL/etanol (LUNDBERG *et al.*, 2002).

O OPTX associado à LDE foi estudado por Rodrigues e colaboradores (2005), e ensaios *in vivo* e *in vitro* mostraram que há estabilidade da associação. Ensaios de citotoxicidade por citometria de fluxo mostraram atividade antiproliferativa. No modelo de melanoma murino, foi confirmada a eficácia terapêutica do tratamento com diminuição do tumor e menos efeitos tóxicos com DL50 maior e tempo de sobrevida maior dos camundongos tratados com a associação LDE-OPTX do que o fármaco comercial.

Esse composto nanométrico tem sido testado em certas doenças onde sabidamente o colesterol ou seus receptores estão envolvidos, como no caso de pacientes com doença coronária. Foi observado que em pacientes submetidos à

revascularização do miocárdio e tratados com LDE-OPTX houve captação do PTX pelo tecido arterial de forma mais intensa do que quando os pacientes foram tratados com formulação tradicional de PTX (COUTO *et al.*, 2007). Da mesma maneira, Maranhão e colaboradores (2008), em estudo realizado em coelhos com lesão aterosclerótica, demonstraram redução da área lesionada e ausência de efeitos tóxicos nos animais tratados com LDE-OPTX, em comparação aos coelhos tratados com solução fisiológica. Estudos clínicos em pacientes com câncer de mama, também têm confirmado ausência de toxicidade como mielossupressão, contagem de leucócitos e de eritrócitos; reações de hipersensibilidade não ocorreram, assim como, toxicidade hepática e renal (PIRES *et al.*, 2009). Nesse estudo, Pires e colaboradores (2009) mostraram que não há dissociação das partículas do LDE-OPTX quando na circulação de pacientes com câncer de mama. Além disso, observou-se melhora nos parâmetros farmacocinéticos, aumentando o tempo de meia vida do fármaco no plasma e maior concentração do fármaco no tecido tumoral. A concentração de LDE e LDE-OPTX em carcinoma ginecológico (ovário, endométrio e colo uterino) é maior que no tecido normal correspondente (DIAS, *et al.*, 2007)

Do exposto, os dados apresentados na literatura mostram a eficácia terapêutica da LDE-OPTX em neoplasias e doença aterosclerótica. Contudo, desconhece-se a eficácia de LDE-OPTX no tratamento de tumor cerebral, bem como os mecanismos farmacológicos e tóxicos decorrentes do tratamento de GBM com LDE-OPTX.

2 OBJETIVO

Avaliar o efeito da nanoemulsão (LDE) contendo oleato de paclitaxel (OPTX) e de sua formulação usual (PTX) em células de glioblastoma murino GL261 e a eficácia terapêutica dessas preparações no desenvolvimento do glioblastoma *in vivo*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e caracterização da LDE contendo OPTX e preparação da solução comercial de paclitaxel

A associação LDE-OPTX, descrita no item 3.1.1, foi fornecida pelo Dr. Raul Cavalcante Maranhão, professor Titular da FCF/USP, coordenador do Laboratório de Metabolismo de Lípidos do Instituto do Coração (InCor), do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, da USP.

A preparação da LDE-OPTX foi realizada segundo método previamente descrito por Maranhão e colaboradores (1993). Resumidamente, foi utilizado uma mistura composta de 40:20:1:0,5 de oleato de colesterol, de fosfatidilcolina, de trioleína e de colesterol, respectivamente, e dissolvidos em solução clorofórmio – etanol (2:1 v/v). Posteriormente essa mistura foi seca sob fluxo de nitrogênio e mantida por 16 horas a 4°C em dessecador a vácuo para remoção de solventes residuais por completo.

Após esse procedimento, adicionou-se à mistura 10 mL de tampão TRIS–HCl 0,01 M, pH 8,0. Por irradiação ultrassônica, a suspensão foi emulsificada durante 3 horas, sob atmosfera de nitrogênio, com temperatura entre 51 a 55° C (na qual os componentes estão em estado de transição cristal-liquido), controlado por termometro digital inserido diretamente no frasco. A irradiação ultrassônica foi realizada com uma potência de 125 watts, em modo contínuo de operação por um disruptor de células Branson, modelo B450 equipado com ponta de titânio de 1 cm de diâmetro.

A emulsão foi ultracentrifugada a 35.000 rpm por 30 minutos na temperatura de 4°C. O sobrenadante (1 mL), contendo partículas que flutuam em densidade 1,006 g/mL foi retirado e descartado, e o volume restante teve sua densidade ajustada para 1,210 g/mL pela adição de brometo de potássio e realizou-se ultracentrifugação (35.000 rpm por 2 horas a 4° C) do sobrenadante removeu-se 2 mL contendo a fração de partículas de tamanho e composição desejados. A nanoemulsão foi dialisada (Spectrapor 6), utilizando 4,0 L de tampão TRIS – HCl 0,01 M, pH 8,0 por 16 horas, a 4° C para remover o brometo de potássio. Após esse período, a nanoemulsão foi esterilizada por filtração com filtros poros de 0,22 µm de diâmetro.

Tabela 1 Caracterização físico-química da nanoemulsão de oleato de paclitaxel.

Análise	LDE- OPTX
Diâmetro	70 nm
Potencial Zeta	- 43 mSV
Teor de incorporação	5,0 mg/mL
pH	8,05

3.1.1 Associação do OPTX a LDE

Rodrigues e colaboradores (2005) descreveram a associação do OPTX a LDE. Para a associação foi realizada sonicação durante 40 minutos a 50 a 55° C, em banho de água, onde a LDE foi adicionada a solução de paclitaxel dissolvida em etanol 10% do volume final. Essa associação ocorreu em uma proporção de 5:1 em massa de lipídeos:fármaco.

Todos os processos foram realizados pelo grupo de pesquisa do Prof. Raul C. Maranhão, do Laboratório de Metabolismo de Lípidos

3.1.2 Preparação da formulação comercial de PTX

O princípio ativo de PTX utilizado na preparação do composto tradicional, em solução, foi fornecido pelo grupo de pesquisa do Prof. Raul Maranhão. Essa formulação foi preparada no Laboratório de Toxicologia Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas na Universidade de São Paulo. Para tanto, o princípio ativo foi solubilizado no solvente utilizado na formulação comercial, que é composto por partes iguais de Etanol e Cremophor EL, um derivado polioxetilado de óleo de castor. Antes dos ensaios *in vitro* ou *in vivo* a solução de PTX foi filtrada em filtro de 0,22 µm, assim como, a solução salina 0,9% utilizada nos ensaios *in vivo*.

Para os ensaios *in vivo*, o PTX foi diluído 10 x em solução salina 0,9%. A partir de uma concentração mãe (50mg/kg), preparada no Laboratório de Toxicologia Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas na Universidade de São Paulo, pipetou-se 50 µL da solução de PTX em 450 µL de solução salina 0,9% e os animais receberam 300 µL dessa solução final.

3.2 Culturas das linhagens celulares de GBM murino GL261

As GL261 foram implantadas em camundongos C57BL/6 para o desenvolvimento do GBM, sem a necessidade de um sistema imune deficiente, podendo mimetizar o crescimento e a resposta imune mais semelhante com o GBM humano (NEWCOMB; ZAGZAG; 2009). Adicionalmente, essas células apresentam características histopatológicas e biológicas semelhantes a do GBM humano, como a infiltração no tecido saudável, a angiogênese e a necrose (Aguilar-Morante, *et al.*, 2010).

As células foram cultivadas em garrafas de cultura contendo meio de cultura RPMI (RPMI 1640, Vitrocell, Campinas, SP), suplementado com soro fetal bovino (SFB) (Soro fetal bovino, Vitrocell®) a 10% mantidas a uma atmosfera úmida a 37 °C, contendo 5% de CO₂. Como estoque as células ficaram mantidas em SFB com 5% de DMSO (dimetilsulfóxido).

Para a realização dos ensaios as células foram mantidas até atingirem de 70 a 80% de confluência e então foram lavadas e coletadas por tripsinização (tripsina 0,25%, Vitrocell®) e ressuspensas em RMPI com SFB a 10%.

3.3 Tratamentos *in vitro* e Grupos Experimentais

Para o tratamento *in vitro* foram empregados os diferentes grupos experimentais: 1) R10 (meio RPMI 1640, Vitrocell®, Campinas, SP, suplementado com SFB a 10%); 2) Nanoemulsão contendo LDE-OPTX ou 3) Paclitaxel (PTX), em determinados períodos de tempo como será descrito a seguir. As composições foram diluídas em meio R10, nas diferentes concentrações 0,0001; 0,0003; 0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10 ou 30 µM. O volume de R10, como controle, foi equivalente aos tratamentos de LDE-OPTX ou PTX.

3.4 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas, com peso entre 20-25g. 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 e todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de

Experimentação Animal (CEUA FCF/USP: 450). Antes ou durante, quando necessário, os animais foram anestesiados, com uma solução de quetamina e xilazina, nas doses de 75 mg/kg e 7,5 mg/kg, respectivamente, via i.p., e para a eutanásia, essa solução foi administrada, também por via i.p., nas doses de 300 mg/kg e 30 mg/kg de quetamina e xilazina, respectivamente.

3.5 Tratamentos *in vivo* e, Grupos e Protocolos Experimentais

Para os tratamentos *in vivo* foram empregados os seguintes grupos experimentais: solução salina 0,9%, LDE-OPTX, PTX por via i.p. ou via endovenosa. Os animais receberam os tratamentos de LDE-OPTX nas doses de 50 ou 75 mg/kg, de PTX nas doses de 75 mg/kg, 50 mg/kg ou 15 mg/kg. Volumes equivalentes de solução salina 0,9% foram empregados como controles

Figura 5 Esquema representativo dos três protocolos experimentais *in vivo* utilizados para investigar a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) ou avaliação da diminuição do crescimento tumoral após os diferentes tratamentos

Protocolo 1 – A investigação do efeito da LDE-OPTX sobre a permeabilidade da BHE. LDE-OPTX foi administrado nas doses de 50 ou 75 mg/kg e PTX nas dose de 50mg/kg.

Protocolo 2 – Investigação da eficácia terapêutica da LDE-OPTX sobre o GBM. LDE-OPTX ou PTX foram administrados na dose de 75 mg/kg.

Protocolo 3 - Investigação da eficácia terapêutica da LDE-OPTX sobre o GBM. LDE-OPTX ou PTX foram administrados diariamente, entre os dias 8 e 18, nas doses de 75 mg/kg e 15 mg/kg, respectivamente.

3.6 Obtenções de amostras biológicas

3.6.1 Coleta de sangue circulante e medula óssea

Após a anestesia dos animais, a cavidade abdominal foi cirurgicamente exposta e, posteriormente procedeu-se o isolamento da aorta abdominal, onde se coletou o sangue com auxílio de uma seringa de 1 mL e agulha de 26 G. anticoagulante (Heparina 5000 UI/mL) foi utilizada. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 1000 g, 4º C por 10 min . Após a obtenção das células circulantes, foi realizada a perfusão cardíaca, conforme descrito no item 3.4.2. Em seguida, pela vivisseção da medula óssea, para retirada do fêmur e com as epífises preservadas, foram coletadas as células da medula óssea. Após a retirada, as epífises foram

removidas e o canal medular foi perfundido com 1mL de meio de cultura RPMI 1640 (Vitrocell®, Campinas, SP), com auxílio de seringa de 1mL com agulha de 26 G. Após contagem em câmara de Neubauer, 1×10^6 células foram transferidas para tubos de citometria de fluxo.

3.6.2 Coleta do cérebro

Para a coleta do cérebro, os animais foram anestesiados e após a coleta de sangue como descrito no item 3.6.1, seguiu-se a perfusão cardíaca com PBS (à pressão de perfusão de 100 mmHg, por 5 minutos). Pela manipulação cirúrgica, a caixa craniana foi exposta e o cérebro foi coletado. Em seguida, foi colocado em base acrílica (Auto Acrylic Matrices, World Precision Instruments, Sarasota, FL, EUA) para a realização de cortes coronais com diâmetro de 2 mm para a realização da medida do volume tumoral.

3.7 Ensaios in vitro

3.7.1 Concentração Inibitória (IC50%)

As células das linhagens GL261 foram semeadas numa placa de 96 poços em 100µL de meio de cultura, R10 a uma densidade de 5×10^3 células por poço.

Após o plaqueamento, as células foram incubadas a 37°C e 5% CO₂. Após 24h, as células foram tratadas com R10, LDE-OPTX ou PTX e novamente incubadas por 24 horas ou 48 horas nas concentrações de 0,0001; 0,0003; 0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10 e 30 µM, diluídos com R10, representadas em escala log de -4; -3,5; -3; -2,5; -2; -1,5; -1; -0,5; 0, 0,4; 1; 1,4; respectivamente.

Para os períodos de incubação de 24 horas ou 48 horas, as placas foram fixadas com ATA (ácido tricloroacético) e incubadas por 60 min, a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados, as placas lavadas por 5 vezes com água da torneira, e secas a temperatura ambiente.

Posteriormente, 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-se as placas 5 vezes com uma solução de ácido

acético 0,1%. Novamente, as placas secaram a temperatura ambiente. A coloração inespecífica foi solubilizada com 100 μ L de trizma base (100 mM) e a absorbância foi

avaliada em espectrofotômetro UV (SpectraMAX 190, Molecular devices, Sunnyvale, EUA) a 515 nm.

Usando as medidas da absorbância, a média obtida em células incubadas com R10(C) e os testes de crescimento com os tratamentos em diferentes concentrações (TTT), a porcentagem de célula foi calculada:

$$[(TTT*100)/Media (C)]] = X$$

E assim a porcentagem de células mortas:

$$[(100 - X)]$$

O software Origin 8.0 foi utilizado para o cálculo do IC50, empregando o cálculo estatístico da curva de dose-resposta sigmoidal de cada tratamento, indicando a sensibilidade aos tratamentos, expressa na concentração de fármaco que causou a inibição do crescimento de 50% das células (IC50%).

3.7.2 Curva de crescimento das células GL261

Para avaliar o efeito dos tratamentos sobre o crescimento das células GL261, após tripsinização, 5×10^3 células foram plaqueadas em placas de 24 poços. Em ensaio inicial, observamos o crescimento de células GL261 na presença de LDE-OPTX em diferentes concentrações (μM): 0,001, 0,01, 0,1, 1 ou 10. Assim, verificamos que as concentrações de 1 e 10 μM de LDE-OPTX promoviam maior inibição de crescimento, de forma que tais concentrações foram utilizadas nos experimentos subsequentes com LDE-OPTX ou PTX. Células incubadas com meio de cultura R10 foram empregadas como controle. Os seguintes tempos de incubação foram utilizados: 24, 48, 72 ou 96 horas. O número de células viáveis foi avaliado pelo método de Trypan blue.

3.7.3 Ciclo celular e fragmentação do DNA

Para a análise concomitante de fragmentação do DNA e ciclo celular, as células de GL261 foram tratadas com LDE-OPTX nas concentrações 1 ou 10 μM , PTX nas concentrações 1 ou 10 μM ou R10. Após o término dos tratamentos, as células foram coletadas em meio R10, homogeneizadas, transferidas para tubos de citometria e centrifugadas (600 g; 10min; 4°C). O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados a cada tubo 50 μL de uma solução contendo a enzima RNaseA (15 mg/mL) e 150 μL do tampão hipotônico fluorescente (PBS, 2% SFB, 0,05 %

Triton– X100, 0,1% de citrato de sódio, 25 µg/mL de iodeto de propídio). As amostras foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Foi avaliada a intensidade de fluorescência do iodeto de propídio ligado ao DNA de 10.000 eventos por amostra em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson®).

3.7.4 Viabilidade celular

Para avaliação da viabilidade celular foram plaqueadas 5×10^3 células GL261 e estas foram posteriormente incubadas com LDE-OPTX ou PTX, nas concentrações de 1 ou 10 µM, ou controle R10, por 48 horas. Após o término dos tratamentos, as células foram coletadas e incubadas com 100 µL de anticorpo anti-Anexina V APC (BD Bioscience, San Diego, EUA) por 20 minutos, e imediatamente antes da leitura, por citômetro de fluxo, foi acrescentado 10 µL de iodeto de propídio (PI) (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). A leitura de fluorescência foi realizada em citômetro de fluxo FACS Canto II. Foram obtidos 10.000 eventos. A análise da fluorescência foi realizada pelo software FlowJo (v.10, TreeStar,). As células positivas para Anexina V foram consideradas em apoptose, enquanto que as células positivas para PI foram consideradas em necrose, células positivas para ambos os marcadores foram consideradas em apoptose tardia e, finalmente, células negativas para ambos marcadores foram consideradas viáveis.

3.7.5 Determinação da concentração de nitrito

A produção do óxido nítrico foi avaliada indiretamente pela quantificação da concentração de nitrito pela reação de Griess. Após o tratamento das células com LDE-OPTX ou PTX, nas concentrações de 1 ou 10 µM, ou R10, por 24 ou 48 horas, 100 µL do sobrenadante foi incubado com 100 µL de reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de di-hidrocloridato de naitiletilenodiamida diluída em ácido fosfórico) por 10 minutos, em microplaca de 96 poços. Após este período, a absorbância foi lida em espectrofotômetro UV (SpectraMax 190, Molecular devices, Sunnyvale, EUA) a 540 nm. Uma curva com concentrações conhecidas de nitrito de sódio foi utilizada para a quantificação da concentração de nitrito presente nas amostras, e os resultados foram expressos em µM.

3.7.6 Caracterização das espécies reativas de oxigênio

Radicais livres (superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila) foram quantificados por ensaio com o marcador de EROs diacetato de 2', 7'-dicloro-dihidrofluoreceína (DCFH). Para tanto, as células GL261 foram incubadas (5×10^3) com LDE-OPTX ou PTX, nas concentrações de 1 ou 10 μM , ou R10, a 37 °C, por 48 horas. O sobrenadante foi armazenado a – 20°C, as células foram lavadas com 2 mL de PBS estéril e incubadas com 500 μL da solução de DCFH a 10 μM . As células foram incubadas a 37 °C, em estufa contendo 5% de CO_2 , por 1 hora. A fluorescência emitida foi lida no $\lambda_{\text{exc.}}$: 485 nm e $\lambda_{\text{emi.}}$: 530 nm, em leitor de fluorescência para microplacas (Synergy H1 HybridMulti-ModeMicroplate Reader, BiotekIntruments,Winooski, USA). A intensidade de fluorescência foi expressa em unidades arbitrárias de fluorescência. Como controle positivo do experimento, usou-se células GL261 incubadas com peróxido de hidrogênio (fonte) na concentração de 10 μM .

3.7.7 Quantificação de MCP-1

Para a quantificação da quimiocina MCP -1, foram plaqueadas 5×10^3 células GL261. Essas células foram então incubadas com LDE-OPTX ou PTX, nas concentrações de 1 ou 10 μM , ou controle R10, por 48 horas. O sobrenadante das células GL261 foi utilizado para a quantificação de MCP-1, por método imunoenzimático (ELISA), de acordo com a metodologia fornecida pelo fabricante nos kits comerciais (BDPharmigen, San Diego, EUA).

3.8 Ensaios *in vivo*

3.8.1 Medida da velocidade de infusão das preparações

Camundongos C57BL/6 fêmeas foram anestesiados, canulados e tratados agudamente (24 h) com LDE-OPTX 50mg/kg, PTX 50mg/kg, veículo do PTX ou solução fisiológica (200 μL), utilizando as velocidades de infusão de 0,3 mL/h, 0,6 mL/h ou 2,4 mL/h. Os animais foram observados a intervalos de 48h, por sinais de típicos da doença, como hipoatividade, emagrecimento, paralisia, desconforto respiratório. Para as preparações de PTX 50mg/Kg e do seu veículo, foi feita uma diluição de 10X em solução fisiológica. Sendo assim, o volume final injetado foi de 200 μL para o tratamento com PTX, na dose de 50 mg/kg diluído 10 x em solução

fisiológica. Para o tratamento com LDE-OPTX, na dose de 50 mg/kg o volume final injetado foi de 200 μ L.

3.8.2 Permeabilidade da barreira hematoencefálica

Com o intuito de investigar se a nanoemulsão desestabiliza a BHE, solução de Evans “blue” (Sigma-Aldrich) a 2% foi injetada i.v., cinco minutos após realização dos tratamentos agudos, que também foram realizados por via i.v., com 50 mg/kg ou 75 mg/kg de LDE-OPTX (volume final injetado de 200 μ L ou 300 μ L, respectivamente) 50 mg/kg de PTX diluído 10 x em solução fisiológica (volume final de 200 μ L), veículo do PTX ou solução fisiológica (200 μ L). Vinte e quatro horas depois, o sangue foi coletado para separação do plasma, seguido da coleta do cérebro após perfusão transcardíaca. Os hemisférios cerebrais, bem como o plasma, foram homogeneizados em ácido tricloroacético a 50%, sonificados e então centrifugados. Os sobrenadantes foram coletados, diluídos em etanol e as concentrações de Evans “blue” nas amostras foram medidas utilizando um espectrofotômetro de fluorescência (absorção: 620 nm; emissão: 680 nm; FLUOstarOptima; BMG LABTECH, Inc.). A permeabilidade da BHE foi normalizada dividindo-se a concentração de Evans “blue” no tecido (μ g/g de massa cerebral) pela concentração no plasma (μ g/g de plasma).

3.8.3 Injeção de células GL261 em camundongos e avaliação do crescimento tumoral

A indução do tumor cerebral nos camundongos C57BL/6 fêmeas foi realizada por injeção intracraniana de uma suspensão contendo 3×10^7 de células GL261, suspensas em volume de 2 μ L. Para tanto, seguindo-se anestesia, foi 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 sítio localizado 2,7 mm a direita da sutura sagital mediana e 0,5 mm posterior a sutura coronal. Utilizando-se uma agulha de 26 gauge, 2 μ L de solução contendo as células de glioma foram injetadas a uma profundidade de 2,4 mm da superfície do cérebro, durante um intervalo de 8 minutos, utilizando um sistema de microinjeção acoplado a um aparelho esterotático (Automated Multisite Microinjection System com InjectoMate, Neurostar,

Sindelfingen, Alemanha). A agulha foi removida 10 minutos após o término da injeção das células, seguido do preenchimento da janela craniana com cimento odontológico (Fillcanal, Technew, Rio de Janeiro, RJ) e sutura simples para fechar a incisão da pele. Solução de iodo a 1% foi colocada sobre o sítio cirúrgico antes e após a realização da cirurgia. O procedimento completo foi realizado com material estéril. Cetoprofeno (Biofen 1%, Biofarm, Jaboticabal, SP), fármaco analgésico, foi administrado via intramuscular, na dose de 2 mg/kg, ao término da cirurgia. Os animais foram cuidadosamente monitorados para sinais de redução de massa corpórea, atividade e instabilidade motora. Quando os animais apresentaram sinais evidentes de doença (pouca deambulação, arqueamento, baixa ingestão de comida e perda de massa corpórea), foram sacrificados, sob anestesia, e tiveram o seu sangue coletado. Em seguida, foram perfundidos por via transcardial com PBS, para coleta do tumor cerebral.

Para verificação do efeito terapêutico do tratamento com 75 mg/kg de LDE-OPTX, 75 mg/Kg de PTX ou solução fisiológica (controle), os cérebros dos animais portadores de tumor e tratados foram coletados, segundo a metodologia descrita acima. Cortes coronais com diâmetro de 2 mm foram obtidos, utilizando para isso uma base acrílica (Auto AcrylicMatrices, World PrecisionInstruments, Sarasota, FL, EUA). Imagens do corte histológico foram obtidas utilizando um escâner e a área tumoral foi determinada utilizando o software Image J (Image J 1.48v NIH, EUA). Os resultados foram expressos como porcentagem do volume tumoral ocupada no hemisfério ipsilateral.

3.8.4 Leucograma

A coleta do sangue para a contagem de leucócitos totais foi realizada de acordo com o item 3.6. A contagem total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer após a diluição das amostras de sangue na proporção de 1:20 (vol:vol) com líquido de Türk.

A contagem diferencial foi realizada em esfregaços de sangue corados com corante Panótico® (Laborclin produtos para laboratórios LTDA. Pinhais, Paraná).

3.8.5 Avaliação dos leucócitos circulantes por citometria de fluxo

A avaliação dos marcadores (CD3, CD4, CD18 e Ly6G), os leucócitos foram isolados do sangue e da medula óssea como descrito no item 3.6. O sangue foi coletado usando anticoagulante (Heparina 5000 UI/mL) e a medula óssea utilizando meio de cultura RPMI. A lise das hemácias foi realizado adicionando NaCl 0,2% e após 30 a 40 segundos foi adicionado NaCl 1,6%. Os Leucócitos foram incubados com 100 µL dos anticorpos

monocloidas anti – CD3 conjugado com Peridininina Clorofila (PercP) (BD, Bioscience, San Diego, EUA), anti -CD4 conjugado ao ficoeritrina (PE) (BD, Bioscience, San Diego, EUA), anti – Ly6G APC (BD Bioscience, San Diego, EUA), anti – CD18 conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC, BD Bioscience, San Diego, EUA). Os anticorpos foram diluídos 1:100 em PBS. Sob a proteção da luz, as incubações permaneceram por 20 minutos a 4°C.

Após esse período de tempo, as análises foram realizadas em citômetro de fluxo FACS Canto II (Bectonand Dickinson) e foi realizada a leitura computadorizada pelo software FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, TN, EUA). Foram analisados 10.000 eventos, e os dados mostram a porcentagem de células marcadas.

3.9 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram apresentados como média $\pm$ e.p.m. e foram analisados estatisticamente pela análise de variância com comparações múltiplas (ANOVA), seguido do teste de Tukey-Kramer, ou pelo Teste “t” de Student, quando necessário. O programa GraphPad Prisma versão 4.00 (GraphPadPrism Software Inc, 1992-2003) foi utilizado para conduzir as análises estatísticas.

4 RESULTADOS

4.1 Ensaios in vitro

4.1.1 IC50%

Após 24 horas de incubação, observou-se que 3,6 µM de LDE-OPTX e 49,3 µM de PTX inibiram 50% o crescimento de GL261. No tempo de 48 horas, o IC50 para LDE-OPTX foi de 0,8 µM e para a solução de PTX o IC50 foi de 9,9 µM.

Tabela 2 Efeito da inibição do crescimento de células GL261 após incubação com LDE-OPTX ou PTX. Valores representados em Log e μM da IC50.

GL261				
	PTX		LDE-OPTX	
	log	μM	Log	μM
24 horas	$1,66 \pm 0,22$	$49,3 \pm 25,6$	$0,5 \pm 2,5$	$3,66 \pm 6,02$
48 horas	$0,7 \pm 0,62$	$9,9 \pm 5,5$	$0,7 \pm 1,20$	$0,8 \pm 1,06$

Figura 6 Curva de tendência concentração - resposta das incubações com LDE-OPTX ou PTX em células GL261.

As células GL261 foram incubadas por até 48 horas com LDE-OPTX ou PTX. O ensaio foi realizado em 3 placas em triplicata, e os resultados obtidos estão representados no gráfico em 9 cores diferentes. A concentração utilizada para cada uma das amostras foi de 30; 10; 3; 1; 0,3; 0,1; 0,03;

0,01; 0,003; 0,001; 0,0003; 0,0001 μM que correspondem a Log de 1,4; 1; 0,4; 0; -0,5; -1; -1,5; -2; -2,5; -3; -3,5; -4, respectivamente

4.1.2 Efeitos dos tratamentos com PTX ou LDE-OPTX sobre o crescimento das células GL261

As concentrações de 1 ou 10 μM de LDE–OPTX, provocaram maior inibição do crescimento celular (**Figura 7**), o que foi determinante para a escolha das concentrações para os estudos subseqüentes. Demonstramos, assim, que as células GL261 apresentaram seu ritmo de crescimento diminuído a partir de 48 h de incubação com LDE-OPTX ou PTX (**Figura 8**).

Figura 7 Efeito de diferentes concentrações de nanoemulsão contendo oleato de paclitaxel (LDE-OPTX) sobre o crescimento de células GL261.

As seguintes concentrações de LDE-OPTX foram testadas: 0,0001; 0,01; 0,1; 1 ou 10 μM . A contagem celular foi feita nos seguintes tempos de incubação: 24, 48, 72 ou 96 horas. Após o tratamento, o crescimento celular foi avaliado pelo método de azul de Trypan. Os resultados expressam as medias ($n=3$). Para análise estatística, foi utilizada ANOVA, seguida de teste de Tukey's para comparação entre grupos.

Figura 8 Comparação dos efeitos do paclitaxel em solução (PTX) e nanoemulsão contendo oleato de PTX (LDE-OPTX) sobre o crescimento celular.

As células GL261 foram incubadas com LDE-OPTX, PTX ou R10 por 24, 48, 72 ou 96 horas. O crescimento celular foi avaliado pelo método de Azul de Trypan. Os resultados expressam as médias dos resultados de quatro repetições para cada grupo experimental. Para análise estatística, foi utilizada ANOVA, seguida de teste de Tukey's para comparação entre os grupos. *P < 0,05 vs Meio.

4.1.3 Efeitos dos tratamentos com PTX ou LDE-OPTX sobre o ciclo e fragmentação de DNA de células GL261

Os resultados do ciclo e fragmentação do DNA de células GL261 incubadas com as formulações foram semelhantes aos encontrados em células incubadas com R10 (controle), mostrando que tanto o PTX como o LDE-OPTX não afetaram estes parâmetros (**Figuras 9 e 10**).

Figura 9 Efeitos dos tratamentos com PTX ou LDE-OPTX sobre o ciclo de células GL261

Após 48 horas de incubação com os tratamentos as células foram incubadas com meio R10 (controle), PTX em solução (1 ou 10 μM) ou LDE-OPTX (1 ou 10 μM), foi determinado o percentual de células GL261 em cada fase do ciclo celular (G0/G1, S ou G2/M). As médias expressam o número de repetições do experimento (n = 4). Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida de teste de Tukey's para comparação entre os grupos.

Figura 10 Efeitos dos tratamentos com PTX ou LDE-OPTX sobre fragmentação do DNA de células GL261.

Após 48 horas de incubação com R10, PTX em solução (1 ou 10 μM) ou LDE-OPTX (1 ou 10 μM), foi determinado o percentual de células contendo DNA fragmentado. As médias expressam o número de repetições do experimento (n = 4). Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida de teste de Tukey's para comparação entre os grupos.

4.1.4 Efeitos dos tratamentos com PTX ou LDE-OPTX sobre a viabilidade das células GL261

A análise do percentual de células viáveis por citometria de fluxo nos permitiu quantificar também as porcentagens de células em apoptose ou necrose. Os dados obtidos mostraram redução do número de células viáveis após os tratamentos com PTX nas concentrações de 1 ou 10 μM , ou após o tratamento LDE-OPTX na concentração de 10 μM . A análise dos tipos de morte, mostrou que o tratamento com PTX induziu apoptose (1 ou 10 μM) e apoptose tardia (10 μM) e o tratamento com LDE-OPTX (10uM) causou apoptose (**Figura 11**).

Figura 11 Efeitos dos tratamentos com PTX ou LDE-OPTX sobre a viabilidade das células de GBM (GL261).

As células foram incubadas com os tratamentos LDE-OPTX (1 ou 10 μM) ou solução PTX (1 ou 10 μM) ou meio R10, por 48 horas. Após este período, o percentual de células viáveis, em apoptose, apoptose tardia ou em necrose foi determinado por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média ($n = 4$) de cada grupo experimental. Para análise estatística, foi utilizada ANOVA, seguida de teste de Tukey's, para comparação entre os grupos. * $P < 0,05$ vs. R10.

4.1.5 Efeitos dos tratamentos com PTX ou LDE-OPTX sobre a concentração de nitrito nas células GL261

Os resultados apresentados na Figura 12 mostram que concentrações de nitrito em células GL261 tratadas com LDE-OPTX ou PTX, nas concentrações de 1 ou 10 μM , ou R10, por 24 ou 48 horas, foram equivalentes.

Figura 12 Determinação da concentração de nitrito em células GL261

As células foram incubadas com R10, solução de PTX (1 ou 10 μM) ou LDE-OPTX (1 ou 10 μM), por até 48 horas. Em seguida, a concentração de nitrito nas amostras foi determinada por reação de Griess. As médias expressam o número de repetições ($n = 4$). Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida de teste de Tukey's para comparação entre os grupos.

4.1.6 Efeitos dos tratamentos com PTX ou LDE-OPTX sobre a formação de EROS

As células GL261 foram tratadas com PTX ou LDE-OPTX, nas concentrações de 1 ou 10 μM , ou com meio R10, e ensaiadas para quantificação da produção de EROS, empregando o marcador sensível à presença de radicais livres DCFH. Os resultados obtidos não mostraram diferenças significativa entre os grupos de células tratadas na produção de EROs pelas células GL261 (**Figura 13**).

Figura 13 Efeitos dos tratamentos com PTX ou LDE-OPTX sobre a formação de EROs nas células GL261

As células foram incubadas com R10, solução de PTX (1 ou 10 μM) ou LDE-OPTX (1 ou 10 μM). Em seguida as EROs foram medidas utilizando o marcador fluorescente DCFH. Os resultados expressam as médias de cada grupo ($n = 4$). Análise estatística foi realizada por ANOVA, seguida de teste de Tukey's para comparação entre os grupos.

4.1.7 Efeitos dos tratamentos com PTX ou LDE-OPTX sobre a secreção de MCP-1 por células GL261

Observamos que a concentração de MCP-1 diminuiu significativamente no sobrenadante das GL261 frente ao tratamento com PTX, nas concentrações de 1 ou 10 μM , ou frente ao tratamento com LDE-OPTX na concentração de 10 μM . Os valores obtidos foram menores que os encontrados em células GL261 tratadas com meio de cultura R10 (**Figura 14**).

Figura 14 Efeitos dos tratamentos com PTX ou LDE-OPTX sobre a secreção da quimiocina MCP-1 no sobrenadante de células GL261

Após 48 horas de incubação com meio R10 (controle), solução de PTX (1 ou 10 μM) ou LDE-OPTX (1 ou 10 μM) a quimiocina MCP-1 foi quantificada pelo método ELISA. Análise estatística foi feita utilizando ANOVA, seguida de teste de Tukey's, para comparação entre os grupos. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ vs. R10.

4.2 Ensaios *in vivo*

4.2.1 Determinação da velocidade de infusão do PTX ou LDE-OPTX em camundongos

As seguintes velocidades de infusão, por via i.v dos tratamentos foram testadas, como se segue: 0,3 mL/h, 0,6mL/h e 2,4mL/h. Observamos que os animais morriam no intervalo de 24 h após administração de PTX ou veículo do PTX, independentemente da velocidade de injeção. Já em animais tratados com LDE-OPTX não foi observada morte, em quaisquer das velocidades de infusão empregadas. As mortes causadas pelo PTX ou veículo do PTX foram evitadas quando essas soluções foram diluídas 10x em solução fisiológica.

Figura 15 Efeito da velocidade de infusão dos diferentes tratamentos em camundongos C57BL/6

Os animais foram tratados intravenosamente, em dose única com 50 mg/kg de LDE-OPTX ou de 50 mg/kg de solução de PTX, solução de PTX diluída 1:10, veículo do PTX, veículo do PTX diluído 1:10 ou solução fisiológica. A sobrevivência avaliada dentro do período de 24 h. O volume de injeção foi 200 μ L. As soluções de PTX e veículo do PTX foram diluídos ou não 10 vezes em solução fisiológica.

4.2.2 Efeitos dos tratamentos com PTX ou LDE-OPTX sobre a integridade da BHE

Após os tratamentos i.v. em dose única com 50 mg/kg ou 75 mg/kg LDE-OPTX, ou 50 mg/kg de PTX, a integridade da BHE foi mantida inalterada comparada aos animais tratados com solução fisiológica, mostrando que os tratamentos não alteram a permeabilidade da barreira, mesmo quando a dose de LDE-OPTX foi maior que a de PTX (Figura 16).

Figura 16 Efeitos dos tratamentos *in vivo* com PTX ou LDE-OPTX sobre a integridade da barreira hematoencefálica

Os animais foram tratados intravenosamente, em dose única com 50mg/kg de solução de PTX, 50mg/kg ou 75mg/kg de LDE-OPTX ou solução fisiológica (controle). Cinco minutos após os tratamentos, foi administrado Azul de Evans (100 μ L) e somente após 24 horas foi realizada a coleta dos tecidos para análise. Os resultados expressam as médias em cada grupo (n=3). Análise estatística utilizada foi ANOVA, seguida de teste de Tukey's, para comparação entre os grupos.

4.2.3 Efeitos dos tratamentos *in vivo* com 75 mg/Kg de PTX ou LDE-OPTX sobre o desenvolvimento do GBM

4.2.3.1. Sobre o volume do GBM.

A medida do volume tumoral foi realizada após quatro dias do início dos tratamentos. Os camundongos com GBM tratados com PTX, na dose de 75 mg/kg, mostraram alteração gastrointestinal o que levou a eutanásia de todos os animais desse grupo antes dos demais grupos, impossibilitando, assim, a comparação da medida do volume tumoral do GBM (**Figura 17**). Os camundongos com GBM que continuaram recebendo os tratamentos com LDE-OPTX, na dose de 75 mg/kg, ou solução fisiológica foram eutanasiados após dez dias do início dos tratamentos. Não foi observado diferença do volume tumoral dos camundongos com GBM que foram

tratados com 75 mg/kg LDE-OPTX comparado com os camundongos do grupo solução fisiológica.

Figura 17 Efeitos dos tratamentos in vivo com PTX ou LDE-OPTX sobre o volume tumoral do glioblastoma

Os animais foram tratados por via intraperitoneal, em intervalo de três dias, com 75 mg/Kg de LDE-OPTX ou de solução de PTX ou solução fisiológica. Na parte superior da figura estão demonstrados a cavidade abdominal de animais tratados com salina (A) ou com PTX (B) coletados após 4 dias de tratamentos. Os segmentos cerebrais do cérebro dos animais tratados com solução fisiológica (C), ou LDE-PTX (D). A quantificação dos volumes tumorais está apresentada na Figura (E) e correspondem à média $\pm$ e.p.m de 7 a 10 animais por grupo e foram analisados por teste T de Student, sem significância estatística.

4.2.3.2 Sobre o peso corporal dos camundongos com GBM

O peso dos camundongos com GBM tratados com PTX, na dose de 75 mg/kg, a cada três dias, por quatro dias, foi comparado com o grupo de animais tratados com solução fisiológica ou com 75 mg/kg de LDE-OPTX. Os resultados apresentados na Figura 18 mostram diminuição acentuada de peso nos animais tratados com PTX, justificando a eutanásia dos mesmos durante o decorrer do tratamento. O peso dos animais nos grupos de animais tratados com 75 mg/kg LDE-OPTX ou tratado com solução fisiológica foi mensurado até o décimo oitavo dia após a injeção de células GL261 no tecido cerebral e os resultados foram equivalentes entre os grupos (**Figura 18**).

Figura 18 Efeitos dos tratamentos in vivo com PTX ou LDE-OPTX sobre o peso corporal dos camundongos com GBM

Após oito dias do implante das células GL261 iniciou-se os tratamentos por via intraperitoneal, em intervalo de três dias com 75 mg/Kg LDE-OPTX ou solução de PTX ou solução fisiológica (controle). A mensuração do peso dos animais foi realizada nos dias 1,8, 12 e 18 após o implante tumoral. Os resultados expressam as média $\pm$ e.p.m das porcentagens de variações dos pesos corporais de cada grupo (n=8). Análise estatística utilizada foi ANOVA. *** $P < 0,001$ vs. Solução fisiológica e LDE-OPTX.

4.2.3.3 Sobre o leucograma dos camundongos com GBM

O sangue da artéria abdominal inferior dos camundongos com GBM foi coletado para determinação do leucograma. A contagem dos leucócitos foi comparada somente nos animais que receberam os tratamentos com 75 mg/kg de LDE-OPTX ou solução fisiológica (controle), pois estes grupos permaneceram recebendo os tratamentos a cada três dias, por via i.p., no mesmo período de tempo (dez dias, desde do oitavo dia de implante até o décimo oitavo dia). Não observamos diferença do número total e diferencial de leucócitos dos camundongos tratados com LDE-OPTX na dose de 75 m/kg comparado com o grupo controle (solução fisiológica) (**Figura 19**).

Figura 19 Efeitos dos tratamentos in vivo com PTX ou LDE-OPTX sobre a leucograma de camundongos com GBM

Os animais foram tratados, por via intraperitoneal, em intervalos de três dias com nanoemulsão contendo 75mg/kg de LDE-OPTX ou solução fisiológica. Após coleta do sangue, procedeu-se a contagem dos leucócitos totais diluindo a amostra de sangue em 1:20 de líquido de Türk e pela extensão sanguínea realizou-se a contagem diferencial dos leucócitos. Os resultados expressam as

médias $\pm$ e.p.m. de cada grupo (n=8). Análise estatística ANOVA foi realizada, para comparação entre os grupos.

4.2.4 Efeitos dos tratamentos *in vivo* com 15 mg/Kg de PTX ou 75 mg/Kg de LDE-OPTX sobre o desenvolvimento do GBM

4.2.4.1 Sobre o volume do GBM.

Uma vez que observamos toxicidade intensa com o tratamento com PTX na dose de 75 mg/Kg e não observamos redução do GBM o tratamento de 75 mg/kg LDE-OPTX, a cada três dias, mudamos os esquemas terapêuticos, no sentido de minimizar a toxicidade do PTX e verificar a eficácia terapêutica de LDE-OPTX. Assim, os animais passaram a ser tratados uma vez ao dia, durante 18 dias, com 15 mg/kg de PTX ou com 75mg/kg de LDE-OPTX.

Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com solução fisiológica não causou alteração no tecido gastrointestinal (Figura 20 A), mas que os tratamentos com PTX ou LDE-OPTX causaram alterações gastrointestinais, como visualizadas nas Imagens B e C da Figura 20. No entanto, no grupo tratado com LDE-OPTX observou-se redução significativa da massa tumoral em relação à massa tumoral observada nos animais tratados com solução salina (Figura 20, D,E,F,e G) . Embora o tratamento com PTX tenha reduzido o volume tumoral, não houve diferença significativa com o grupo de camundongos tratados com solução salina ou 75 mg/kg LDE-OPTX.

Figura 20 Determinação do volume do GBM em camundongos tratados com solução de PTX ou de LDE-OPTX uma vez ao dia

A medida do volume tumoral foi obtida após análise da proporção da área tumoral pela área total do hemisfério ipsilateral no software ImageJ do segmento do cérebro com diâmetro de 2 mm dos camundongos com GBM tratados com 75 mg/kg de LDE-OPTX, 15 mg/kg de PTX ou solução fisiológica. A= cavidade abdominal de animais tratados com salina; B= com PTX; C= com LDE-OPTX;

D= cérebros de animais tratados com salina; E=com PTX; F= com LDE-OPTX; G=representação gráfica dos volumes tumorais. Os resultados da Figura G representam a média $\pm$ e.p.m. de 4 animais por grupo. A análise estatística ANOVA foi utilizada. * $P < 0.01$ vs solução fisiológica.

4.2.4.2 Sobre o peso corporal dos camundongos com GBM

O peso corpóreo dos animais com GBM após 18 dias de tratamento com 75 mg/kg de LDE-OPTX administrados uma vez ao dia, pela via intraperitoneal apresentou diminuição comparado com o grupo solução fisiológica (controle) a partir do 15º dia de tratamento. Os animais com GBM após 18 dias de tratamento com 15 mg/kg PTX administrados uma vez ao dia, pela via intraperitoneal, não apresentou diminuição da massa corpórea comparado com o grupo solução fisiológica em qualquer momento durante os 18 dias de tratamento (**Figura 21**).

Figura 21 Efeitos dos tratamentos in vivo com PTX ou LDE-OPTX sobre o peso corporal dos camundongos com GBM

Após oito dias do implante de células GL261 iniciou-se os tratamentos por via intraperitoneal, administrados todos os dias, por 18 dias com 75 mg/kg de LDE-OPTX, 15 mg/kg de PTX ou solução fisiológica. O peso da massa corpórea dos camundongos foram registrados a cada 48 horas durante os tratamentos. O dia 1 é considerado o dia do início do tratamento, os animais foram eutanasiados

no 19º dia após o início dos tratamentos. Os resultados expressam a média de cada grupo (n=4). Utilizou-se ANOVA para análise estatística. ** $P < 0,01$ e.*** $P < 0,001$ vs. solução fisiológica.

4.2.4.3 Sobre o consumo de ração

O consumo de ração dos animais com GBM tratados uma vez ao dia, durante 18 dias, pela via intraperitoneal com 75 mg/kg de LDE-OPTX, 15 mg/kg de PTX foi equivalente nos três grupos de animais estudados. Em todos os grupos, observou-se redução do consumo de ração durante a evolução do tumor (**Figura 22**).

Figura 22 Efeitos dos tratamentos in vivo com PTX ou LDE-OPTX sobre o consumo de ração dos camundongos com GBM

Os tratamentos iniciaram oito dias após o implante com células GL261. O peso da ração dos camundongos foi registrado a cada 48 horas durante todo o tratamentos com 75 mg/kg de LDE-OPTX, 15 mg/kg de PTX ou solução fisiológica. O dia 1 representa o dia do início dos tratamentos (8 dias após o implante do tumor cerebral) e o último tratamento se deu no dia 18 e então após 24 horas os animais foram eutanasiados. Os resultados expressam as médias de cada grupo (n=4). ANOVA foi utilizado para análise estatística.

4.2.4.4 Sobre o leucograma dos camundongos com GBM

O sangue da artéria abdominal inferior dos camundongos foi coletado para determinação de leucograma dos animais tratados com 75 mg/kg de LDE-OPTX, 15

mg/kg de PTX ou solução fisiológica (controle) durante 18 dias. Observou-se redução no número total de leucócitos em animais tratados com LDE-OPTX, sendo que a análise morfológica mostrou redução no número de linfócitos (**Figura 23**). Esta redução foi confirmada por citometria de fluxo, onde foram marcados leucócitos CD4+, CD18/CD4+, Ly6G+ e Ly6G+/CD18+. Somente a % de CD4+ foi reduzida em animais tratados com LDE-OPTX (**Figura 24**).

Figura 23 Efeitos dos tratamentos in vivo com PTX ou LDE-OPTX sobre o leucograma dos camundongos com GBM – análise morfológica

Após 18 dias de tratamento com 75 mg/kg de LDE-OPTX, 15 mg/kg de, PTX ou solução fisiológica, por via intraperitoneal, uma vez ao dia, durante 18 dias o sangue da artéria abdominal foi coletado e realizou-se a contagem dos leucócitos totais diluindo a amostra de sangue em 1:20 de líquido de Türk e pela extensão sanguínea realizou-se a contagem morfológica dos leucócitos. Os resultados expressam as médias de cada grupo (n = 4). Análise estatística ANOVA foi realizada, para comparação entre os grupos.

Figura 24 Efeitos dos tratamentos in vivo com PTX ou LDE-OPTX sobre o leucograma dos camundongos com GBM – análise por citometria de fluxo

Expressão da cadeia $\beta 1$ integrinas (CD18⁺) em Linfócitos (CD4⁺) e Neutrófilos (Ly6G⁺) (B, D, respectivamente), Linfócitos (CD4⁺) (A) e Neutrófilos (Ly6G⁺) (C) foram avaliados por citometria de fluxo no sangue dos camundongos com glioblastoma após 18 dias de tratamento, pela via intraperitoneal com LDE-OPTX na dose de 75 mg/kg, PTX na dose de 15 mg/kg ou solução fisiológica (controle), administrados uma vez ao dia, por 18 dias. Os resultados expressão a média de cada grupo (n=4). Para análise estatística foi utilizado ANOVA para comparação entre grupos.

4.2.4.5 Sobre o número diferencial de leucócitos na medula de camundongos com GBM

A análise por citometria de fluxo das células da medula óssea dos camundongos com GBM tratados uma vez ao dia com 75 mg/kg LDE-OPTX ou 15

mg/kg PTX não apresentaram diferenças quando comparados com o grupo solução fisiológica (Figura 25 A e C, respectivamente)

Figura 25 Efeitos dos tratamentos in vivo com PTX ou LDE-OPTX sobre os leucócitos na medula óssea de camundongos com GBM

Expressão de Integrina (CD18⁺) em Linfócitos (CD4⁺) e Neutrófilos (Ly6G⁺) (B, D, respectivamente), Linfócitos (CD4⁺) (A) e Neutrófilos (Ly6G⁺) (C) foram avaliados por citometria de fluxo na medula óssea dos camundongos com glioblastoma após 18 dias de tratamento com 75 mg/kg LDE-OPTX, 15 mg/kg de PTX ou solução fisiológica (controle) uma vez ao dia, pela via intraperitoneal. Os resultados expressão a média de cada grupo (n=4). Para análise estatística foi utilizado ANOVA para comparação entre grupos.

5. DISCUSSÃO

Na tentativa de melhorar a eficácia terapêutica no câncer e diminuição dos efeitos tóxicos, fármacos como etoposídeo, carmustina e paclitaxel vêm sendo associados à LDE e, de fato, estudos mostram inibição do crescimento tumoral e menores efeitos adversos em animais de experimentação (Rodrigues, *et al.*, 2005; Kretzer, *et al.*, 2012) e em pacientes com câncer no trato genital feminino (DIAS *et al.*, 2007). Os dados do presente estudo, que foi realizado para investigar a eficácia terapêutica do paclitaxel (PTX) associado a LDE (LDE-OPTX) sobre o GBM, confirmou a menor toxicidade do fármaco quando ligado a LDE, e sugere que também a formulação LDE-OPTX possa ser eficiente para o tratamento do GBM.

No presente estudo foi empregado o modelo experimental de GBM induzido com células GL261, em camundongos fêmeas, uma vez que em ensaios preliminares do estudo corroboramos com os dados da literatura que mostram maior evolução tumoral em camundongos C57BL/6 fêmeas que em machos (NEWCOMB *et al.*, 2007). Os mecanismos envolvidos nesta diferença entre gêneros não está estabelecida, mas há evidências que os hormônios femininos facilitem a implantação e/ou proliferação celular. De fato, embora resultados possam ser controversos, há fortes evidências que os hormônios femininos parecem exercer efeitos positivos no desenvolvimento de glioblastoma e astrocitoma (ULASOV *et al.*, 2007).

O PTX foi escolhido para este estudo uma vez que vem sendo estudado em gliomas, mostrando resultados promissores para sua utilização, principalmente na terapia direcionada ao alvo (PASSARELLA, *et al.*; 2010; SUN, *et al.*, 2011) e causa toxicidade grave, que compromete o tratamento. Ademais, para uma melhor associação com a LDE, o PTX foi modificado quimicamente em oleato (OPTX), a fim de torná-lo mais lipofílico (LUNDBERG *et al.*, 2003).

Assim, iniciamos os ensaios para evidenciar a citotoxicidade do LDE-OPTX em GL261. Nossos dados demonstraram que a incorporação ao LDE tornou a preparação mais citotóxica que o PTX, já que as IC50% foram muito diferentes, e muito menores para a LDE-OPTX do que para PTX. Desta forma, escolhemos dar continuidade para o trabalho com duas concentrações próximas da IC50% da LDE-OPTX. A toxicidade da solução de PTX é dependente do veículo, o que por nós detectado nos ensaios *in vivo*, que serão descritos mais adiante. É interessante salientar que nossos resultados diferem do apresentado por Rodrigues e

colaboradores (2005), que mostraram equivalência de citotoxicidade entre LDE-OPTX solubilizada em Cremophor/EL com a formulação comercial de PTX em linhagem celular de carcinoma de pequenas células de pulmão (NCI H292).

Dando continuidade ao estudo, nós empregamos duas concentrações de LDE-OPTX próximas a IC50% e nossos resultados mostraram que estas (1 ou 10 μ M) foram as melhores concentrações para inibir a proliferação celular, sendo que este efeito não foi decorrente de alterações no ciclo celular. No entanto, o tratamento causou morte por apoptose. Não existem dados na literatura que demonstrem o efeito da LDE-OPTX em células GL261, contudo, em células de outros tipos de câncer, como o de mama, MCF-7, foi observado aumento de apoptose (SHARIFI *et al.*, 2014). Como já salientado, nenhum dos tratamentos alterou a distribuição das células GL261 nas diferentes fases do ciclo celular, havendo preponderância das mesmas nas fases G0 e G1 do ciclo. Rodrigues *et al.*, (2005) e KALECHMAN *et al.*, (2000) mostraram que células B16 (células de melanoma murino) incubadas com LDE-OPTX, localizam-se nas fases S e G2/M do ciclo. Diferenças celulares podem explicar a diferença em relação aos nossos resultados.

A fragmentação do DNA tem sido empregada para detectar mecanismos de morte celular, uma vez que a fragmentação pode se iniciar em resposta a morte celular, através da reação dos radicais livres com as timinas no DNA levando a quebra das cadeias de fita simples (NAGATA, 2000). Nossos dados mostram que as incubações com LDE-OPTX ou PTX nas concentrações de 1 ou 10 μ M não alteraram o número de fragmentos de DNA, e estes corroboram os dados descritos por SURAPANENI e colaboradores (2012), que demonstraram que PTX não atua diretamente exercendo qualquer efeito sobre componentes nucleares, DNA e RNA, mas sim estabilizando os microtúbulos, como já descrito na Introdução.

Alguns autores já descreveram que o veículo utilizado na formulação comercial do PTX, é responsável por si só em causar reações de hipersensibilidade, (PIRES *et al.*, 2009). Diferença no tempo de incubação de 48 horas para as GL261 e 72 horas para as células NCI H292 com os tratamentos, podem explicar nossos resultados de equivalência com as incubações da LDE-OPTX com PTX, sabendo que, a morte celular é mais dependente do tempo de exposição das células ao PTX do que a sua concentração (GLOBE; BEAR, 2003).

Observando a diminuição do crescimento celular associado à morte celular por apoptose nas células GL261, investigamos se os agentes poderiam estar influenciando a diminuição de EROs, visto que, o aumento de EROs por algumas células cancerígenas podem promover a proliferação e diferenciação celular (TRACHOOTHAN, *et al.*, 2009). Para tanto, comparamos células GL261 incubadas com LDE-OPTX ou PTX 1 ou 10 μ M com as células GL261 incubadas com R10. Assim, quantificamos EROs nessas células, contudo, não observamos diferença significativa na presença de EROs nas células após os tratamento com LDE-OPTX ou PTX, indicando que a diminuição do crescimento celular promovido pelos tratamentos é independente da produção de EROs. Assim, outras vias de apoptose podem ser ativadas pelo LDE-OPTX ou pelo PTX. A via da apoptose mitocondrial é dependente da família de proteínas Bcl-2 e leva a liberação eficiente de fatores pro-apoptótico, a partir do espaço interno da membrana mitocondrial. A família de proteínas Bcl-2 inclui proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL) e pro-apoptóticas (Bax e Bak) baseado na presença de domínios homólogos Bcl-2. Proteínas que estimulam ou inibem a apoptose interagem um com o outro e determina a morte ou sobrevivência das células, sugerindo que Bcl-2/Bax pode ser mais importante que qualquer outro promotor que determina apoptose (SHARIFI *et al.*, 2014). Assim, é objetivo futuro avaliar a ação da LDE-OPTX sobre estas vias. É importante ressaltar que há dados que mostrem que o PTX afeta esta via (FERLINI, *et al.*, 2003).

A MCP-1 é expressa em células GL261 (WANG *et al.*, 2013), e pode estar envolvida com o desenvolvimento tumoral (ZHAI, *et al.*, 2011), promovendo o acúmulo de monócitos e macrófagos no local do tumor (MIZUTANI, *et al.*, 2011). Atraídos pela MCP-1, os monócitos, no microambiente tumoral, são capazes de se diferenciar em macrófagos associados ao tumor (TAMs), favorecendo o crescimento e metástases (MIZUTANI, *et al.*, 2011). De fato, bloqueando CCL2 com anticorpo monoclonal, ZHU *et al.*, 2011 observou maior sobrevida de camundongos C57BL/6 com GBM causado pelo implante intracraniano com GL261. Como base nos dados aqui obtidos pode se supor que a inibição da secreção de MCP-1 seja um possível mecanismo de ação do PTX. Da mesma maneira, os agentes LDE-OPTX ou PTX podem aumentar a sobrevida de camundongos, agindo diretamente, diminuindo a concentração de MCP-1. Os mecanismos ainda não estão descritos, mas pode

sugerir uma ação do PTX sobre a via de ativação do fator de transcrição NFkappa B, envolvido na síntese da quimiocina.

Diante dos resultados que obtivemos *in vitro*, fomos investigar *in vivo* o efeito do tratamento com LDE-OPTX ou PTX em camundongos C57BL/6 fêmeas após implante intracerebral do GBM com células GL261.

É importante ressaltar que a administração de LDE-OPTX não alterou a integridade da BHE, e que poderia alcançar o parênquima cerebral por ruptura da BHE. Dessa maneira o azul de Evans foi escolhido para realizar esse ensaio por ser lentamente excretado, altamente solúvel em água, capacidade de emitir fluorescência quando estimulado e, principalmente, por alta ligação as albuminas plasmáticas. Realizamos primeiramente o ensaio de velocidade de infusão dos tratamentos e mostramos que, sob qualquer das velocidades de infusão intravenosa testadas, 100% dos animais sobreviviam após tratamento com LDE-OPTX, transcorridas 24 horas da injeção. Já em animais tratados com PTX ou com o seu veículo (Cremophor + etanol, 1:1), ocorreu morte de todos os animais independente da velocidade de infusão. Um dos maiores problemas da formulação de PTX é o veículo, onde uma mistura de partes iguais de Cremophor /EL e etanol são utilizados para solubilizar PTX. Cremophor EL tem sido associado com broncoespasmos, hipotensão e outras reações de hipersensibilidade (CONSTANTINIDES *et al.*, 2000). Ao diluir o PTX e o seu veículo 10x em solução fisiológica, a morte dos animais não foi mais observada. Dessa forma, pudemos dar continuidade ao ensaio de permeabilidade da barreira. Escolhemos a maior velocidade de infusão (2,4mL/h), pois permitia realizar infusões em um maior número de camundongos por dia, sem alterar a confiabilidade dos resultados. Em ensaio utilizando Azul de Evans injetado 5 minutos após os tratamentos com LDE-OPTX, PTX, veículo do PTX ou solução fisiológica, observou que nenhum dos tratamentos alterou a permeabilidade BHE. Portanto, a redução do tumor após tratamento com LDE-OPTX ou PTX não seria consequência de alteração da permeabilidade da barreira. O mecanismo envolvido da entrada do paclitaxel nas células ainda é desconhecido, mas por possuir natureza hidrofóbica, sugere-se, então, que mecanismos de difusão facilitada poderiam atuar favorecendo a entrada desses agentes no parênquima cerebral e no sítio tumoral (MANFREDI *et al.*, 1984). Quanto a LDE, o mecanismo envolvido de internalização as células é através dos receptores de LDL, como descrito na Introdução.

Passados oito dias do implante, os tratamentos com 75 mg/Kg de LDE-OPTX, 75 mg/Kg PTX (diluído 10 x em solução fisiológica) ou solução fisiológica (controle), foram iniciados. Foi utilizada a via i.p., e o tratamento se estendeu durante 10 dias e foi realizado a cada 3 dias, para os grupos de camundongos tratados com LDE-OPTX ou solução fisiológica, pois os camundongos com GBM que receberam tratamento com 75 mg/kg de PTX foram acometidos por obstipação intestinal acompanhado de distensão abdominal, conduzindo a sinais eminentes de morte. Portanto, optou-se pela eutanásia desse grupo de camundongos (PTX 75 mg/kg).

Dessa maneira, foi possível comparar os efeitos no volume tumoral do GBM e leucograma, um importante marcador de toxicidade, somente do tratamento com 75 mg/kg de LDE-OPTX com o grupo controle, que recebeu solução fisiológica. Observamos toxicidade sistêmica após os quatro primeiros dias de tratamento, pela redução do peso corporal, mas não observamos modificações no leucograma. Kretzer e colaboradores (2012,) administraram uma combinação de quimioterápicos composta por paclitaxel e etoposídeo (9 μ mol/kg; 7,6 mg/kg de cada quimioterápico), em camundongos Balb-c sem tumor, e observaram grave diminuição da massa corpórea nos camundongos após a primeira dose. Portanto, nossos resultados apesar de condições diferentes, em que os camundongos com tumor (GBM) receberam uma dose, aproximadamente, dez vezes maior do tratamento somente com um dos quimioterápicos (PTX) foi possível observar a diminuição na massa corpórea dos camundongos em etapas mais tardias do tratamento. Ademais, vale ressaltar que embora a concentração de OPTX administrado em associação com LDE ter sido alta, não houve redução do volume tumoral, sugerindo que ou o PTX não é eficiente para tratar GBM, ou a LDE não passa a BHE e concentrações suficientes de OPTX tenham alcançado a área tumoral.

Buscando um eficaz esquema terapêutico, para a redução do GBM novos ensaios foram realizados. Camundongos C57BL/6, após oito dias do implante de células GL261 no tecido cerebral, passaram a receber o tratamento uma vez ao dia, durante 18 dias, por via i.p. Assim, o tratamento com 75 mg/kg de LDE-OPTX foi eficaz no tratamento do GBM. Apesar da toxicidade observada (obstipação intestinal) no tratamento da LDE-OPTX, mas não do tratamento com PTX é importante ressaltar que a LDE apresenta uma melhora, especificamente, desse efeito tóxico, visto que, o PTX nessa mesma dose (75 mg/kg) levou a morte dos

camundongos. Essa diferença de dose do PTX (15 mg/kg) em relação a LDE-OPTX (75 mg/kg) foi escolhido devido ao quadro de toxicidade observado no primeiro esquema terapêutico quando PTX na dose de 75 mg/kg, administrado com intervalo de três dias, que não foi tolerado pelos camundongos. O fato de menor intervalo de tempo, no segundo esquema terapêutico, está justificado, tendo em vista a procura pela melhor efetividade terapêutica.

A medida do volume tumoral foi realizada no 19º dia e os camundongos que receberam o tratamento com 75 mg/kg de LDE-OPTX comparados com solução fisiológica mostrou diminuição do volume tumoral, o que não pôde ser visto nos camundongos que receberam o tratamento com 15 mg/kg PTX. Contudo, alguns sinais de toxicidade como diminuição da massa corpórea, não relacionado com a diminuição do consumo de ração, e diminuição de leucócitos, causados provavelmente pela diminuição de linfócitos, como confirmado na contagem de leucócitos diferenciais, foram observados nos camundongos tratados com 75 mg/kg de LDE-OPTX, assim como, obstipação intestinal acompanhado de distensão abdominal. O PTX tem como um dos efeitos tóxicos a mielossupressão (HAIT *et al.*, 2007). Contudo, quando avaliamos células circulantes, por citometria de fluxo, observamos em animais tratados com LDE-OPTX somente diminuição de linfócitos T CD4, mas não dependentes de toxicidade na medula óssea, já que os número de linfócitos estavam normais neste compartimento. Kretzer e colaboradores (2012) mostraram diminuição do efeito mielossupressor, protegido pela LDE carreando o PTX, corroborando nossos dados. Assim, acreditamos que a redução do número de linfócitos na circulação seja decorrente de re-localização destas células em tecidos linfóides. Esta hipótese será investigada. Contudo, é importante ressaltar que apesar desses sinais de toxicidade causado pela LDE-OPTX, camundongos com GBM tratados com PTX na mesma dose de LDE-OPTX (75 mg/kg) em esquema terapêutico menos agressivo (com intervalos de três dias) mostrou sinais de toxicidade maiores conduzindo a óbito esses camundongos, confirmado os dados a literatura que mostram que a associação de fármacos a LDE reduz a toxicidade dos mesmos (RODRIGUES, *et al.*, 2005; MARANHÃO, *et al.*, 2008; PIRES, *et al.*, 2009; TEIXEIRA, *et al.*, 2009; KRETZER, *et al.*, 2012).

Em conjunto, os resultados obtidos, inéditos na literatura, mostram a habilidade da LDE-OPTX causar toxicidade em células de GBM *in vitro*, evidenciadas pela

redução da proliferação e indução de apoptose, sugerindo sua possível aplicação para o tratamento *in vivo* de glioblastoma. Assim, aqui também mostramos que a LDE-OPTX foi eficaz em reduzir o GBM em modelo murino, no entanto o protocolo de tratamento envolveu o emprego de doses elevadas de LDE-OPTX. Uma explicação plausível para este fato pode ser a inability da LDE-OPTX atravessar a BHE, o que deve ser estudado no futuro. É importante salientar que nosso laboratório possui a abordagem experimental para investigar a passagem de nanofármacos pela BHE *in vivo*, empregando ensaios de microscopia intravital, quando as nanopartículas são acopladas a fluoróforos (RODRIGUES, *et al.*, 2016), o que não é possível para as LDE. No entanto, ficou bastante evidenciado neste trabalho, e corrobora demais trabalhos com LDE (KRETZER, *et al.*, 2012; MARANHÃO, *et al.*, 2008), que a incorporação de fármacos a LDE reduz significativamente a toxicidade *in vivo* dos mesmos, sendo que os animais sobreviveram a administração de concentrações de PTX na formulação LDE-OPTX, que não seriam possíveis com a formulação comercial de PTX. Desta forma, os resultados aqui apresentados reforçam a importância de LDE para a terapia e que estudos adicionais sejam realizados com o modelo de GBM.

6. CONCLUSÕES

A LDE-OPTX e a solução de PTX possuem semelhante ação antiproliferativa em células GL261, causando morte celular por apoptose, mas não por necrose, e não exercendo influência sobre as fases do ciclo celular em células GL261.

A LDE- OPTX e solução comercial de PTX diminuem a expressão de MCP-1 em células GL261, podendo influenciar na redução do desenvolvimento tumoral.

O tratamento com LDE-OPTX é eficaz, diminuindo o tamanho do tumor cerebral em camundongos, sem alterar a permeabilidade da Barreira Hematoencefálica.

Dessa forma, podemos concluir até o momento que LDE-OPTX é possível de terapia para tratamento do glioblastoma multiforme, mas estudos envolvendo esquema terapêutico menos agressivo devem ser empregados.

7. REFERÊNCIAS

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, 2010.

ALVES, G.M.; BARAO, M.A.; ODO, L.N.; GOMES, G.N.; FRANCO, M.C.; NIGRO, D. L-Arginine effects on blood pressure and renal function of intrauterine restricted rats. **Pediatric Nephrology**, v. 17, p. 856 – 862, 2002

ANTUNES, A.; FIERRO, I.; GUERRANTE, R.; MENDES, F.; ALENCAR, M.S.M. Trends in Nanopharmaceutical Patents. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, p. 7016-7031, 2013.

ATTARD, G.; GREYSTOCK, A.; KAYE, S.; DE BONO, J. Update on tubulin – binding agents. **Pathologies**, v. 54, p. 72 – 84, 2006.

BERNARDI, D.S.; PEREIRA, T.A.; MACIEL, N.R.; BERTOLOTO, J.; VIEIRA, G.S.; OLIVEIRA, G.C.; ROCHA-FILHO, P.A formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, p. 44, 2011.

BERTOLINI, F. Contribuição dos precursores endoteliais do tecido adiposo no câncer de mama: A relação da gordura progressão do tumor para a cirurgia reconstrutiva. **Journal of Endocrinology**, v. 74, n. 2, p. 106 –107, 2013.

BLEEHEN, N.M.; STENNING, S.P. A Medical Research Council trial of two radiotherapy doses in the treatment of grades 3 and 4 astrocytoma. **British Journal Of Cancer**, v.64, p. 769-774, 1991.

BONECCHI, R.; LOCATI, M.; MANTOVANI, A. Chemokines and Cancer: A Fatal Attraction, **Cancer Cell**, v. 19, n. 12, 2011.

BUXTON, D.B.; STEPHEN, C.L.; SAMUEL A. W.; FERRARI, M. Working group members recommendations of the national, Hart, lung, and blood institute Nanotechnology. **Working Group Circulation**, v. 108, p. 2737 – 42, 2003.

CALLEJA, P.; ESPUELAS, S.; CORRALES, L.; PIO, R.; IRACHE, J.M. Pharmacokinetics and antitumor efficacy of paclitaxel – cyclodextrin complexes loaded in muscus-penetrating nanoparticles for oral administration. **Nanomedicine**, v. 14, p. 2109 – 21, 2014.

CARDOSO, M.G.M. Paclitaxel potência a hipernocicepção inflamatória: evidencias da participação de citocinas e do receptor TOLL tipo 4 (TLR-4). Fortaleza. 2009. **Tese (Doutorado em Ciências)**, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.

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.

CONSTANTINIDES, P.P.; LAMBERT, K.J.; TUSTIAN, A.K.; SCHNEIDER, B.; LALJI, S.; MA, W.; WENTZEL, B.; KESSLER, D. WORAH, D.; QUAY, S.C. Formulation Development and Antitumor Activity of a Filter- Sterilizable Emulsion of Paclitaxel. **Pharmaceutical Research**, v.17, n. 2, p. 175 – 182, 2000.

COUTO, R.D.; DALLAN, L.A.; LISBOA, L.A.; MESQUITA, C.H.; VINAGRE, C.G, MARANHÃO, R.C. Deposition of free cholesterol in the blood vessels of patients with coronary artery disease: a possible novel mechanism for atherogenesis. **Lipids**, v. 42, n. 5, p. 411-876, 2007.

CRUSZ, S.M.; BALKWILL, F.R. Inflammation and cancer: advances and new agents. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, p. 584 – 596, 2015.

CUNHA & SILVA, R.M. Um breve relato sobre nanotecnologia no Brasil. Nova Odessa, Disponível em: <http://201.77.115.89:8080/ojs2009/index.php/technologies/article/viewFile/99/9>. Acesso em: abr de 2013.

DA CUNHA, M.L.V.; ARAUJO, F.A.; VERÍSSIMO, D.C.A.; REHDER, R.; MAINQUE, J.A. SILVA, P.E.C.; BARK, S.A.; BORBA L.A.B. Gliomas múltiplos: relato de caso e

revisão de literatura: *Multiple gliomas: case report and literature review*. **Jornal Brasileiro Neurocirurgia**, v. 21, ed. 2, p. 107-110, 2010.

DESHMANE, S.L.; KREMLEV, S.; AMINI, S.; SAWAYA, B.L. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An overview. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 29, n. 6, p. 313 – 326, 2009.

DIAS, M.L.N.; CARVALHO, J.P.; RODRIGUES, D.G.; GRAZIANI, S.R.; MARANHÃO, R.C. Pharmacokinetics and tumor uptake of a derivatized form of paclitaxel associated to a cholesterol-rich nanoemulsion (LDE) in patients with gynecologic cancers. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 59, n. 1, p. 105 – 111, 2006.

DOOLITTLE, N.D. State of science in brain tumor classification. **Seminars in Oncology Nursing Journal**, v.20, n. 4, p. 224 – 230, 2004.

DUCOBU, J. [LDL receptor]. **Revue medicale de Bruxelles Journal**, v. 11, n. 10, p. 481 – 92, 1990.

DUNCAN, R. The dawning era of polymer therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 347 – 360, 2003.

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, n. 3, p. 430 – 7, 2006.

FARINA, P.; LOMBARDI, G.; BERGO, E.; ROMA, A.; ZAGONEL, V. Treatment of Malignant Gliomas in Elderly Patients: A Concise Overview of the Literature. **BioMed Research International Journal** 2014.

FERLINI, C.; RASPAGLIO, M.; MOZZETI, S.; DISTEFANO, M.; FILIPPETTI, F.; MARTINELLI, E.; FERRANDINA, G.; GALLO, D.; MARTINELLI, F. O.; SCAMBIA, G. Bcl-2 down – regulation is a novel mechanism of paclitaxel resistance. **Molecular Pharmacology Journal**, v. 64, n. 1, p. 51 – 8, 2003.

FULLHER, G.N.; SCHSITHAUER, B.W. The 2007 revised entities. **Brain Pathology**, v.17, n. 3, p. 304 – 307, 2007.

GALLEGO, O. Nonsurgical treatment of recurrent glioblastoma. **Current Oncology Reports**, v. 22, p. 273 – 281, 2015.

GOBLE, S.; BEAR, H.D. Emerging role of taxanes in adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer The potential and the questions. **Surgical Clinics of North America**, v. 83, p. 943–971, 2003.

GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. The LDL Receptor. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, n. 29, p. 431-438, 2009.

GRACE, P.M.; HUTCHINSON, M.R.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R. Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 4, p. 217 – 31, 2014.

GRIVENNIKOV, S.I.; GRETEN, F.R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 19, n. 11, p. 883–899, 2010.

GRIVENNIKOV, S.I.; KARI, F.R. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-Kappa collaboration and crosstalk in cancer. **Cytokine Growth Factor Review**, v.21, n. 1, 2010.

GROBMYER, S.R.; MORSE, D.L.; FLETCHER, B.; GUTWEIN, L.G.; PARVESH, S.; KRISHNA, V.; FROST, S.C.; MOUDGIL, B.M.; BROWN, C.C. The Promise of Nanotechnology for Solving Clinical Problems in Breast Cancer. **Journal of Surgical Oncology REVIEW**, v. 103, p. 317 – 325, 2011.

GROSSMAN, R.; RUDEK, M.A.; BRASTIANOS, H.; ZADNIK, P.; BREM, H.; TYLER, B.; BLAKELY, J.O. The impact of bevacizumab on temozolomide concentrations in intracranial U87 gliomas. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 70, p. 129 – 139, 2012.

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

HAIT, W.N.; RUBIN, E.; ALLI, E.; GOODIN, S. Tubulin targenting agents. **Update on Cancer Therapeutics**, v. 2, p. 1 – 18, 2007.

HERMES, E.G.C.; DE OLIVEIRA BASTOS, P.R.H. Nanotechnology: Scientific, material, global and ethic progress. **The American Journal of Bioethics**, v. 18, n. 2, 2014.

HOOK, S.S.; PTAK, K.; FARRELL, D.; HINKAL, G.; PANARO, N.; GRODZINSKI, P. Office of cancer nanotechnology research center for strategic scientific initiatives (CSSI) national cancer institute/ nihnovember 2010. **Office of Cancer Nanotechnology Research, CSSI, National Cancer Institute, NIH, Bethesda, MD**

HOUBEN, M.P.W.A.; ABEN, K.K.H.; TEEPEN, J.L.J.M.; SCHOUTEN VAN AMEETEREN, Y.N.; TIJSSEN, C.C.; VAN-DUIJN, C.M.; COEBERGH, J.W.W. Stable incidence of childhood and adult glioma in the Netherlands, 1989/2003. **Acta Oncologica**, v. 45, p. 272 – 279, 2006.

HUBBS, A.F.; MERCER, R.R. ; BENKOVIC, S.A.; HARKEMA, J.; SCHWEGLER-BERRY K.D.; GORAVANAHALLY M.P. ; NURKIEWICZ, T.R.; CASTRANOVA, V.; SARGENT, L.M. Nanotoxicology — A Pathologist's Perspective. **Toxicologic Pathology**, v. 39, p. 301-324, 2011.

HUSE, J.T.; HOLLAND, E.C. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant gliomas and medulloblastoma. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, p. 319 – 331, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2014** – Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014. Disponível em: http://www.inca.gov.br/rbc/n_60/v01/pdf/11-resenha-estimativa-2014-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf). Acesso em: 26 ago. 2015.

JABR-MILANE, L.S.; VAN VLERKEN L.E.; YADAV, S.; AMIJI, M.M. Multi-functional nanocarriers to overcome tumor drug resistance. **Cancer Treatment Reviews**, v. 34, n. 7, p. 592 – 602, 2008.

JIANG, Y.; UHRBOM, L. On the origin of glioma. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 117, p. 113 – 121, 2012.

KABAT, G.C.; ETGEN, A.M.; ROHAN, T.E. Do steroid hormones play a role in the etiology of glioma? **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 19, n. 10, p. 2421 -7, 2010.

KAJA, U.; JUSTYNA, S.; MACIEJ, S.; PAWEL, S. Glioblastoma multiforme – an overview. **Contemporary Oncology**, v. 18, n. 5, p. 307 – 312, 2014.

KALECHMAN, Y.; LONGO, D.L.; CATANE, R.; SHANI, A.; ALBECK, M.; SREDNI, B. Synergistic anti-tumoral effect of paclitaxel (taxol) 1AS101 in a murine model of b16 melanoma: association with ras-dependent signal-transduction pathways. **International Journal of Cancer**, v. 86, p. 281 – 288, 2000.

KIRSCH-VOLDERS, M.; PARRY, E.M. Genetic toxicology of mitotic spindle inhibitions used as anticancer drugs. **Mutation research**, v. 355, p. 103 – 108, 1996.

KRETZER, I.F.; MARIA, D.A.; MARANHÃO, R.C. Drug-targeting in combined cancer chemotherapy: tumor growth inhibition in mice by association of paclitaxel and etoposide with a cholesterol-rich nanoemulsion. **Cellular Oncology**, v. 35, p. 451 – 461, 2012.

KURASHY, A.; KARIN, M.; GRIVENNIKOV, S.I. Tumor Promotion via Injury – and Death – Induced Inflammation. **Immunity**, v. 35, n. 4, p. 467 – 477, 2011.

LI, C.I., ed. **Breast Cancer Epidemiology**. New York: Springer, 2010. 417p.

LI, D.; YANG, K.; LI, J.S.; KE, X.Y.; DUAN, Y.; DU, R.; SONG, P.; YU, K.F.; REN, W.; HUANG, D.; LI, X.H.; HU, X.; ZHANG, X.; ZHANG, Q. Antitumor efficacy of a novel CLA-PTX microemulsion against brain tumors: in vitro and in vivo findings. **International Journal Nanomedicine**, v. 7, p. 6105 – 14, 2012.

LIMA, R.S.; KAHN, S.A.; SOLETTI, R.C.; BIASOLI, D.; ALVES, T.; FONSECA, A.C. C.; GARCIA, C.; ROMÃO, L.; BRITO, J.; AFONSO, R.H.; FARIA, J.; BORGES, H.; NETO, M.V. Glioblastoma: Therapeutic challenges, what lies ahead. **Biochemical Biophysical**, p. 338–349, 2012.

LIU, H.; HUA, M.; CHEN, P.; CHU, P.; PAN, C.; YANG, H.; HUANG, C.; WANG, J.; YEN, T.; WEI, K. Blood-Brain Barrier Disruption with Focused Ultrasound Enhances

Delivery of Chemotherapeutic Drugs for Glioblastoma Treatment. **Radiology**, v. 255, n. 2, p. 415 – 25, 2010.

LIU, R.; CHEN, J.; KUNAG, Q.; TANG, J.; MEI, L.; ZHANG, Q.; GAO, H.; ZHANG, Z.; HE, Q. Paclitaxel loaded liposomes decorated with a multifunctional tandem peptide for glioma targeting. **Biomaterials**, v. 35, N. 17, P. 4835 – 47, 2014.

LIU, Y.; FANG, S.; ZHAI, J.; ZHAO, . Construction of antibody-like nanoparticles for selective protein sequestration in living cells. **Nanoscale**, v.7, n. 16, p. 7162 – 7, 2015.

LOPES, T.G.; FERNANDES – CASTILHO, A.; TEDESCO, A.C. Ampla caracterização do Glioblastoma e abordagens terapêuticas. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 2, p. 12-25, 2012.

LOUIS, D. N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O.D.; CAVENEE, W.K.; BURGER, P. C.; JOUVET, A.; SCHEITHAUER, B.W.; KLEIHUES, P. A Classificação da OMS de 2007, de Tumores do Sistema Nervoso Central, **Acta Neuropathologica**, v. 114, p. 97 – 109, 2007.

LOURENÇO-FILHO, D.; MARANHÃO, R.C.; MENDEZ-CONTRERAS, C.A.; TAVARES, E.R.; FREITAS, F.R.; STOLF, N.A. An artificial nanoemulsion carrying paclitaxel decreases the transplant heart vascular disease: A study in a rabbit graft model. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 141, p. 1522-8, 2011.

LUNDBERG, B.B. Preparation and characterization of polymeric pH- sensitive STEALTH® nanoparticles of tumor delivery of a lipophilic prodrug of paclitaxel. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 408, n. 1-2, p. 208 – 12, 2011.

LUNDBERG, B.B.; RISOVIC, V.; RAMASWAMY, M.; WASAN, K.M. A lipophilic paclitaxel derivative incorporated in a lipid emulsion for parenteral administration. **Journal of Controlled Release**, v. 86, n. 1, p. 93 – 100, 2003.

MAEDA, H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumors selective macromolecular drug targeting. **Advances in Enzyme Regulation**, v.41, n. 1, p. 189 – 207, 2001.

MALETINSKA, L.; BLAKELY, E.A.; BJORNSTAD, K.A.; DEEN, D.F.; KNOFF, L.J.; FORTE, T.M. Human glioblastoma cell lines: levels of low-density lipoprotein receptor and low-density lipoprotein receptor-related protein. **Cancer Research**, v. 60, n. 8, p. 2300 – 2303, 2000.

MANFREDI, J.J.; HORWITZ, S.B. Taxol: an antimitotic agent with a new mechanism of action. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 25, n. 1, p. 83 – 125, 1984.

MARANHÃO, R. C.; GARICOCHEA, B.; SILVA, E. L.; DOLHIAC – LLACER, P.; PILEGGI, F. J .C.; CHAMONE, D. A. F. Increased plasma removal of microemulsions resembling the lipid phase of low-density lipoproteins (LDL) in patients with acute myeloid leukemia: a possible new strategy for the treatment of the disease. **Brazilian Journal Medical and Biological**, v. 25, p. 1003 – 1007, 1993.

MARANHÃO, R.C.; GARICOCHEA, B.; SILVA, E.L.; DORLHIAC-LLACER, P.; CADENA, S.M.S.; COELHO, I.J.C.; MENEGHETTI, J.C.; FILEGGI, F.J.C.; CHAMONE, D.A.F. Plasma Kinetics and Biodistribution of a Lipid Emulsion Resembling Low-Density Lipoprotein in Patients with Acute Leukemia. **Cancer Research**, n. 54, p. 4660-4666, 1994.

MARANHÃO, R.C.; TAVARES, E.R.; PADOVEZE, A.F.; VALDUGA, C.J.; RODRIGUES, D.G.; PEREIRA, M.D. Paclitaxel associated with cholesterol-rich nanoemulsions promotes atherosclerosis regression in the rabbit. **Atherosclerosis**, v. 197, p. 959, 966, 2008.

MATTHEOLABAKIS, G.; RIGAS, B.; CONSTANTINIDES, P.P. Nanodelivery strategies in cancer chemotherapy: biological rationale and pharmaceutical perspectives. **Nanomedicine**, v.7, n. 10, p. 1577 – 1590, 2012.

MCFARLAND, B.C.; HONG, S.W.; RAJBHANDARI, R.; TWITTY JR, G.B.; GRAY, K.; YU, H.; BENVENISTE, E.N.; NOZELL, S.E. NF- κ B – Induced IL-6 Ensures STAT3 activation and tumor aggressiveness in glioblastoma. **Plos one**, v. 8, n.11, 2013.

MENDES, S.; GRAZIANI, S.R.; VITÓRIO, T.S.; PADOVEZE, A.F.; HEGG, R.; BYDLOWSKI, S.P.; MARANHÃO, R.C. Uptake by breast carcinoma of a lipidic nanoemulsion after intralesional injection into the patients: A new strategy for neoadjuvant chemotherapy. **Gynecologic Oncology**, v.112, p. 400 – 404, 2008.

MICHA, J.P.; GOLDSTEIN, B.H.; GRAHAM, C.; RETTENMAIER, M.A.; BROWN, J.P.; HU, J.C.; MARKMAN, M. Improved survival with single – agent paclitaxel consolidation/maintenance therapy in advanced ovarian carcinoma. **Oncology**, v. 71, n.1-2, p. 49 – 53, 2007.

MUSTACCHI, G.; DE LAURENTIIS, M. The role of taxanes in triple negative breast-cancer: literature review. **Drug Design Development and Therapy**, v. 5, n. 9, p. 4303 – 18, 2015

MUSTEATA, F.M.; PAWLISZYN, J. Determination of free concentration of paclitaxel in liposome formulation. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutic Sciences**, v. 9, n.2, p. 231 – 237, 2006.

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

NAJMAN, H.; GADELHA, M.I.P. Temozolamida. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, N. 3, P. 439 – 445, 2002.

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.

NANO.gov. National Nanotechnology Initiative. <http://www.nano.gov/about-nni/what/funding>. Acesso em: outubro 2015.

NATURE NANOTOXICOLOGY. v. 6, 2011. The dose makes the poison: The detailed characterization of the materials is essential in all areas of nanotoxicology. www.nature.com/naturenanotechnology.

NEWCOMB, E.W.; LUKYANOV, Y.; SCHNEE, T.; ESENCAY, M.; FISCHER, I.; HONG, D.; SHAO, Y.; ZAGZAG, D. The geldanamycin analogue 17-allylamino-17-

demethoxygeldanamycin inhibits the growth of GL261 glioma cells in vitro and in vivo. **Anticancer Drugs**. V. 18, n. 8, p. 875 – 82, 2007.

NEWCOMB, E.W.; ZAGZAG, D. The murine GL261 glioma experimental model to assess novel brain tumor treatments. In: VAN MEIR, E.G., ed. **Cancer Drug Discovery and Development**, p. 227–241, 2009.

NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health). <http://www.cdc.gov/nioshi/topics/nanotech/>. Acessado em Fevereiro de 2016.

O'ROURKE, E.; MORRISON, M. Working Party on Nanotechnology. 2012. Disponível em: http://www.nano.gov/sites/default/files/dsti_stp_nano201212.pdf Acesso em: maio 2013.

OBERDÖRSTER, G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. **Journal Internal Medicine**, p. 89–105, 2009.

OECD, Working Party of National Experts on Science and Technology Indicators. **DSTI/EAS/STP/NESTI (2006)19/FINAL**, 2006.

PASCHOALINO, M.P.; MARCONE, G.P.S.; JARDIM, W.F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 421 – 430, 2010.

PASSARELLA, R.J.; SPRATT, P.E.; VAN DER ENDE, A.E.; PHILLIPS, J.G.; WU, H.; SATHIYAKUMAR, V.; ZHOU, L.; HALLAHAN, D.E; HARTH, E.; DIAZ, R. Targeted nanoparticles that deliver a sustained specific release of paclitaxel to irradiated tumors. **Cancer Research**, v. 70, n. 11, p. 4550 – 9, 2010.

PIRES, L.; HEGG, R.; VALDUGA, C.J.; GRAZIANI, S.; RODRIGUES, D.; MARANHÃO, R.C. Use of cholesterol-rich nanoparticles that bind to lipoprotein receptors as a vehicle to paclitaxel in the treatment of breast cancer: pharmacokinetics, tumor uptake and a pilot clinical study. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 63, p. 281 – 287, 2009.

PREUSSER, M.; LIM, M.; HAFLER, D.A.; REARDON, D A.; SAMPSON, J.H. Prospects of immune checkpoint modulators in the treatment of glioblastoma. **Nature Reviews Neurology**, 2015.

REARDON, D.A.; WEN, P.Y. Glioma in 2014: Unraveling tumor heterogeneity—implications for therapy, **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12 p. 69-70, 2015.

REYNOL, F. Nanotransportes de Medicamentos. Agencia FAPESP. 2010. Disponível em: http://agencia.fapesp.br/nanotransporte_de_medicamentos/12692/. Acesso em: dezembro de 2015.

ROBERT, M.C.; WASTIE, M.L. Glioblastoma multiforme: a rare manifestation of extensive liver and bone metastases. **Biomedical Imaging and Intervention Journal**, v. 4, n. 1, 2008.

RODRIGUES, D.G.; MARIA, D.A.; FERNANDES, D.C.; VALDUGA, C.J.; COUTO, R.D.; IBAÑEZ, O.C.M.; MARANHÃO, R.C. Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: in vitro and in vivo studies. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 55, p. 565 – 576, 2005.

RODRIGUES, S.F.; FIEL, L.A.; SHIMADA, A.L.B.; PEREIRA, N.R.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A. R. 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 Biomed Nanotechnonology**, v. 12, p. 986 – 1000, 2016.

ROWINSKY, E.K. The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. **Annual Review of Medicine**, v. 48, p. 353 – 74, 1997.

ROWINSKY, E.K. Update on the antitumor activity of paclitaxel in clinical trials. **Annual Pharmacotherapy**, v. 28, p. 18 – 22, 1994.

SHARIFI S.; BARAR J.; HEJAZI M.S.; SAMADI, N. Roles of the bcl-2/bax ratio, caspase-8 and 9 in resistance of breast cancer cells to Paclitaxel. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 20, p. 8617 – 22, 2014.

SHI, J.; ZUO, H.; NI, L.; XIA, L.; ZHAO, L.; GONG, M.; NIE, D.; GONG, P.; CUI, D.; SHI, W.; CHEN, J. An IDH1 mutation inhibits growth of glioma cells via GSH depletion and ROS generation. **Neurology Sciences**, v. 35, p. 839 – 845, 2014

SOLLOTT, S. J.; CHENG, L.; PAULY, R. R.; JENKINS, G. M.; MONTICONE, R. E.; KUZUYA, M. Taxol inhibits neointimal smooth muscle cell accumulation after angioplasty in the rat. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. 4, p. 1869 – 76, 1995.

SOUSA, J.F.; CRISTOFARO, L.F.; SERAFIM, R.B.; NETTO, R.P.; SOUZA, F.O.; SOARES, C.P.; VALENTE, V. A resistência das células T98G e U87MG à temozolamida estão correlacionadas com a expressão de genes de reparo de DNA. **Revista Ciência Farmaceutica Básica Aplicada**, v. 36, n. 2, p. 213-218, 2015.

STIEBER, V.W. Low-grade gliomas. **Current Treatment Options Oncology**, v. 2, n. 6, p. 495 – 506, 2001.

STUPP, R.; TONN, J.C.; BRADA, M.; PENTHEROUDAKIS, G. High-grade malignant glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 190, n. 21, p. 193, 2010.

SUN, T.M.; DU, J.Z.; YAO, Y.D.; MAO, C.Q.; DOU, S.; HUANG, S.Y.; LEONG, K.W.; SONG, E.W.; WANG, J. Simultaneous delivery of siRNA and paclitaxel via “two – in – one” micelleplex promotes synergistic tumor suppression. **ACS Nano**, v. 5, n. 2, p. 1483 – 94, 2011.

SURAPANENI, M.S.; DAS, S.K.; DAS, N.G. Designing Paclitaxel drug delivery systems aimed at improved patient outcomes: current status and challenges. **ISRN Pharmacology**, v. 2012, p. 15, 2012.

TAVARES, E.R.; FREITAS, F. R.; DIAMENT, J.; MARANHÃO, R.C. Reduction of atherosclerotic lesions in rabbits treated with etoposide associated with cholesterol-rich nanoemulsions. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 2297 – 2304, 2011.

TEEGUARDEN, J.G.; HINDERLITER, P.M.; ORR, G.; THRALL, B.D.; LIBRAS, J.G. Particokinetics in vitro: dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. **Toxicology Sciences**, v. 95, n. 2, p. 300 – 12, 2006.

TEIXEIRA, R.S.; VALDUGA, C.J.; BENVENUTTI, L.A.; SCHREIER, S.; MARANHÃO, R.C. Delivery of daunorubicin to cancer cells with decreased toxicity by association

with a lipidic nanoemulsion that binds to LDL receptors. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, p. 1287 – 1295, 2008

THEEK, B.; GREMSE, F.; KUNJACHAN, S.; FOKONG, S.; POLA, R.; PECHAR, M.; DECKERS, R.; STORM, G.; EHLING, J.; KIESSLING, F.; LAMMERS, T. Characterizing EPR – mediated passive drug targeting using contrast – enhanced functional ultrasound imaging. **Journal Controlled Release**, v. 182, p. 83 – 89, 2014.

TORCHELIN, V. Targeted Pharmaceutical Nanocarriers for Cancer Therapy and Imaging. **The AAPS Journal**, v. 9, n. 2, p. 15, 2007.

TRUDEAU, M.E. Docetaxel: a review of its pharmacology and clinical activity. **Canadian Journal of Oncology**, v. 6, p. 443 – 457, 1996.

ULASOV, I.V.; 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 Oncology**, v. 31, n. 5, p. 1177 – 85, 2007.

VANCE, M.E.; KUIKEN, T.; VEJERANO, E.P.; MCGINNIS, S.P.; HOHELLA, M.F.; REJESKI, D. HULL, M.S. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. **Beilstein Journal Nanotechnology**, v. 6, p. 1769–1780, 2015.

VERSLUIS, A.J.; VAN GEEL, P.J.; OPPELAAR, H.; VAN BERKEL, T.J.; BIJSTERBOSCH, M.K. Receptor-mediated uptake of low-density lipoprotein by B16 melanoma cells in vitro and in vivo in mice. **British Journal of Cancer**, v. 74, n. 4, p. 525 – 532, 1996.

WANG, H.; ZHANG, L.; ZHANG, I.Y.; CHEN, X.; FONSECA, A. DA.; WU, S.; REN, W.; BADIES, S.; SADEGHI, S. OUYANG, M.; WARDENS, D.; BADIES, B. S100B Promotes Glioma Growth through Chemoattraction of Myeloid-Derived Macrophages. **Clinical Cancer**, v. 19, n. 14, 2013

WANI, M.C; TAYLOR, H.L; WALL, M.E; COGGON, P.; MCPHAIL, A.T. Plant antitumor agents VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and

antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal American Chemical Society**, v. 93, n. 9, p. 2325 – 7, 1971.

WELLER, M. Novel diagnostic and therapeutic approaches to malignant gliomas. **Swiss Medical Weekly**, v. 13210, p. 141, 2011.

WELLER, M.; WICK, W.; ALDAPE, K.; BRADA, M.; BERGER, M.; PFISTER, S.M.; NISHIKAWA, R.; ROSENTHAL, M.; WEN, P.Y.; STUPP, R.; REIFENBERGER, G. Glioma. **Nature Reviews**, n. 15017, 2015.

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

YARED, J.A.; TKACZUK, K.H.R. Update on taxane development: new analogs and new formulations. **Drug Design Development Therapy**, v. 6, p. 371 – 384, 2012.

YONCHEVA, K.; CALLEJA, P.; AGUEROS, M.; PETROV, P.; MELADINOVA, I.; TSUETANOV, C.; IRACHE, J.M.; Stabiled micelles as auivery vehicles or paclitaxel. **International Journal Pharmaceutical**, v. 436, n 1-2, p. 258 – 64, 2012.

ZHAI, H.; HEPPNER, F.L.; TSIRKA, S.E. Microglia/Macrophages Promote Glioma Progression. **Glia**, v. 59, n. 3, p. 472 – 485, 201.

ZHANG, P.; HUANG, Y.; MAKHOV, A. M.; GAO, X.; ZHANG, P.; LI, S.Characterization of Spherulites as a Lipidic Carrier for Lowand High Molecular Weight Agents. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 6, p. 1525- 1535, 2013.

ZHU, X.; FUJITA, M.; SNYBER, L.A.; OKADA, H. Systemic delivery of neutralizing antibody targeting CCL2 for glioma therapy. **Journal Neurooncol**, v. 104, n. 1, p. 83 – 92, 2011.

Anexo A: Informações para os Membros de Banca Julgadoras de Mestrado/Doutorado.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.
2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.
 - 2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.
3. A sessão de defesa será aberta ao público.
4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.
 - 4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.
 - 4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.
5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

Anexo B: Pareceres da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Ofício CEUA/FCF n. 23.2014 – P450)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 23.2014-P450

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa "**Efeitos da nanoemulsão de oleato de paclitaxel em glioblastoma murino: estudos in vivo e in vitro**" (Protocolo CEUA/FCF/450), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Marina Cecilia Spatti**, sob orientação do(a) **Dr. Stephen Fernandes de Paula Rodrigues**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de **21 de fevereiro de 2014**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 18 de março de 2014.

Prof. Dr. Jollson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

Anexo C: Ficha do Aluno
Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 8723241/1 - Marina Cecília Spatti

Email:	mspatti@usp.br
Data de Nascimento:	30/07/1987
Cédula de Identidade:	RG - 41.394.514-5 – SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutica - Centro Universitário Hermínio Ometto - São Paulo - Brasil - 2011
Curso:	Mestrado
Programa:	Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula:	04/12/2013
Início da Contagem de Prazo:	04/12/2013
Data Limite para o Depósito:	06/06/2016
Orientador Acadêmico:	Prof(a). Dr(a). Ernani Pinto Junior - 04/12/2013 até 11/02/2014. Email: ernani@usp.br
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Stephen Fernandes de Paula Rodrigues - 12/02/2014 até 31/03/2015. Email: stepfarm@usp.br
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Sandra Helena Poliselli Farsky - 01/04/2015 até o presente. Email: sfarsky@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 04/12/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 12/02/2015
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 04/12/2013

9141 - 8723241/1 - Marina Cecília Spatti

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5780-2/2	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	10/03/2014	20/04/2014	90	6	94	A	N	Concluída
FBC5803-3/3	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	11/03/2014	24/03/2014	30	2	100	A	N	Concluída
EDM5791-6/1	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	11/03/2014	03/06/2014	120	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBC5802-3/4	Tópicos Avançados em Toxicologia I	11/03/2014	23/06/2014	15	1	90	A	N	Concluída
FBA5728-3/10	Aprimoramento Didático	19/08/2014	15/09/2014	60	4	88	A	N	Concluída
FBF5813-1/1	Tecnologias de Caracterização de Sistemas Nanoestruturados	04/09/2014	15/10/2014	90	0	-	-	N	Pré-matrícula recusada
FBC5772-2/1	Conexões das Vias de Ativação dos Processos Inflamatórios Periféricos e Centrais	22/09/2014	12/10/2014	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5761-6/2	Tópicos Avançados em Bioquímica Clínica	02/02/2015	04/03/2015	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC 0522 - Fisiologia do sistema hematopoiético, ministrada por	27/02/2015	03/07/2015	-	3	100	A	-	-

	alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)									
FBC5784-3/6	Tópicos Avançados em Toxicologia II	03/03/2015	16/06/2015	15	1	100	A	N	Concluída	
FBC5814-6/1	Toxicologia Aplicada aos Alimentos	15/09/2015	05/10/2015	75	5	100	A	N	Concluída	

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	10	25	26
Estágios:			
Total:	10	25	26