



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

ANA CAROLINA BRITO DOS ANJOS

**ANÁLISE *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTITUMORAL DO CONJUGADO
LDE/PACLITAXEL COMPARADO À FORMULAÇÃO COMERCIAL TAXOL[®]
SOBRE LINHAGEM CELULAR C6 DE GLIOBLASTOMA DE RATO**

BELÉM

2022

ANA CAROLINA BRITO DOS ANJOS

**ANÁLISE *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTITUMORAL DO CONJUGADO
LDE/PACLITAXEL COMPARADO À FORMULAÇÃO COMERCIAL TAXOL®
SOBRE LINHAGEM CELULAR C6 DE GLIOBLASTOMA DE RATO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Neurociências

Orientador: Prof.º Dr. Wallace Gomes Leal

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Edna Cristina Santos Franco

BELÉM

2022

ANA CAROLINA BRITO DOS ANJOS

**ANÁLISE *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTITUMORAL DO CONJUGADO
LDE/PACLITAXEL COMPARADO À FORMULAÇÃO COMERCIAL TAXOL®
SOBRE LINHAGEM CELULAR C6 DE GLIOBLASTOMA DE RATO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará, como requisito para à obtenção do título de Mestre.

APROVADA EM: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr Wallace Gomes Leal
Orientador / Presidente da Banca
Universidade Federal do Pará

1º Examinador
Prof. Drª Bárbara do Nascimento Borges
Universidade Federal do Pará

2º Examinador
Prof. Drª Mariceli Baia Leão Barros
Faculdade Maurício de Nassau

Suplente
Prof. Dr. Samir Mansour Moraes Casseb
Instituto Evandro Chagas

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, e aos meus guias espirituais, por me manterem firme e forte ao longo desta árdua jornada, passando por uma pandemia mundial, e por hoje poder estar aqui entregando este trabalho ao qual me dediquei o quanto pude e entreguei o meu melhor.

Sou extremamente agradecida aos meus pais, por terem me sustentado nos momentos em que pensei em desistir, e em todas as outras dificuldades que surgiram ao longo deste caminho, à minha mãe em especial por se fazer presente ainda que distante fisicamente. Dedico também este trabalho ao meu irmão, o qual sem saber me deu motivação para buscar novas experiências e encontrar novas paixões na minha vida.

Aos meus amigos, que são poucos, porém são os mais fiéis que eu poderia pedir, por me incentivarem sempre que possível e estenderem a mão nas horas mais difíceis. Aqueles que estão ao meu lado, eu sei bem quem são, e serei para sempre grata.

Agradeço ao prof. Dr. Wallace Gomes Leal, orientador deste trabalho, por acolher minha proposta de trabalhar com um projeto envolvendo câncer, temática com a qual tenho muito apreço.

Agradeço à prof. Dr. Edna Cristina Santos Franco, por assumir a coorientação deste trabalho e por possibilitar a continuidade deste no Instituto Evandro Chagas.

Ao prof. Dr. Edivaldo de Oliveira, pela generosidade em me acolher mais uma vez em suas instalações no IEC, e por ceder o material necessário à realização dos experimentos.

Ao prof. Dr. Samir Casseb por me conduzir ao longo deste trabalho em todas as etapas, me permitindo finalizá-lo com sucesso. Minha eterna gratidão por toda sua contribuição, dedicação, empenho, e pela excelência profissional.

Aos meus colegas de laboratório Ijair dos Santos e Michelle Dias, sem a parceria de vocês eu não teria conseguido. Para sempre “os mikes do LNNE”.

Por fim, à agência de fomento Capes pela bolsa concedida para execução deste projeto.

In Memoriam de Walter Ferreira dos Anjos.

Acreditastes em mim quando nem eu sabia que podia, e talvez esse seja um dos motivos de eu ainda estar aqui de pé. Sem me rebaixar, reerguendo a cabeça a cada tropeço. Penso que assim tu gostarias que eu fizesse.

Se estivesses aqui hoje, me dirias para continuar lutando. Ser forte sempre, ainda que, dando pequenos passos. Me perguntarias se já resolvi torcer para o seu time favorito, e me abençoaria com tuas mãos calejadas pelos anos de sofrimento.

Mas a hora da tua partida um dia chegou, e em um dia de sol, alegre e feliz como o senhor era, seus olhos enfim se fecharam para o seu descanso eterno. Deixei as lágrimas escaparem exatamente como agora, mas eu sei que fostes embora com o sorriso de sempre. Afinal, assim sempre foi você, meu guerreiro.

Não te disse um adeus naquele dia em que fui te visitar, na esperança de que o veria novamente e sorriria para ti, meu querido amigo. Anos se passaram, e essa dor sempre me corroeu. Ingenuidade a minha, pois descobriria um tempo depois que a matéria se desfaz, mas o espírito permanece vivo em nós. Os laços de amor que nos uniram nesta encarnação, serão eternos, para além desta existência.

Infelizmente não era uma época de muitas fotos, para que hoje eu pudesse revisitar essas memórias e sanar um pouco dessa saudade que sempre terei em meu peito, mas durante todos esses anos, sei que sempre estivestes comigo e que me guias a cada passo. Sinto tua presença a todo instante, e quando meu corpo se enfraquecer, sei que estarás aqui para me sustentar.

Me ensina daí a viver um dia de cada vez por aqui. Querido amigo, como sinto tua falta! Mas sigo em paz, na certeza de que na hora certa nos reencontraremos. Para sempre te amarei meu querido, e eternizo aqui estas singelas palavras para honrar tudo aquilo que deixastes como legado.

Texto autoral.

RESUMO

ANJOS, A.C.B. **Análise *in vitro* do potencial antitumoral do conjugado LDE/Paclitaxel comparado à formulação comercial Taxol[®] sobre linhagem celular C6 de glioblastoma de rato.** Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, 2022.

O glioblastoma, também conhecido astrocitoma de grau IV, é um dos tipos mais comuns e agressivos de tumores do sistema nervoso central. Dentre as características desse tipo de tumor destacam-se: infiltração de células tumorais isoladas no tecido cerebral normal, proliferação celular, angiogênese e necrose intensa. Atualmente a abordagem terapêutica principal consiste na ressecção cirúrgica seguida de radioterapia e quimioterapia. No entanto, na maioria das vezes o tumor não é bem delimitado, se espalhando pela região cerebral, o que dificulta sua ressecção total. Além disso, a retirada de tecido dessa região pode deixar diversas sequelas. Como consequência, os pacientes apresentam altas taxas de recidivas e baixas taxas de sobrevida. Outra problemática no tratamento desse tipo tumoral deve-se ao revestimento da barreira hematoencefálica que restringe a entrada de moléculas e substâncias, incluindo fármacos. Deste modo, o presente projeto se propõe a analisar os efeitos antineoplásicos da associação de uma nanopartícula chamada de LDE de estrutura semelhante à lipoproteína de baixa densidade (LDL) que atuará como carreadora do fármaco paclitaxel (PTX), comercialmente conhecido como Taxol[®], um quimioterápico cuja ação antiproliferativa celular tem sido comprovada no tratamento de outros tipos de cânceres, tais como câncer de mama e câncer refratário de ovário. Utilizamos para tal, a linhagem celular C6 de glioblastoma de rato para as análises *in vitro* dos efeitos dos referidos tratamentos sobre os aspectos de viabilidade, citotoxicidade e morte celular por apoptose, utilizando o kit ApoTox-Glo[™] Triplex Assay (Promega Corporation), o qual desempenha as três análises citadas previamente, de maneira sequencial. Para avaliação do crescimento e do efeito do fármaco sobre os grupos de tratamento com PTX e LDE/PTX, cerca de 1×10^6 células foram cultivadas em microplacas de 96 poços, nas concentrações de 0,01; 0,1; 1 e 10 μM nos tempos de 24h, 48h e 72h. O controle experimental foi feito com células não expostas aos compostos, contendo apenas meio de cultivo DMEM. Os resultados obtidos após os tratamentos com PTX e LDE/PTX foram expressos como média \pm desvio padrão e analisados por ANOVA de uma via (citotoxicidade) e de duas vias (viabilidade e apoptose), seguido pelo teste pos hoc de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Palavras-chave: Efeito antitumoral; Glioblastoma; linhagem celular C6; Paclitaxel, LDE, Nanotecnologia.

ABSTRACT

ANJOS, A.C.B. *In vitro* analysis of the antitumor potential of the LDE/Paclitaxel conjugate compared to the commercial formulation Taxol® on rat glioblastoma cell line C6. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2020.

Glioblastoma, also known as grade IV astrocytoma, is one of the most common and aggressive types of tumors in the central nervous system. Among the characteristics of this type of tumor, the following stand out: infiltration of isolated tumor cells in normal brain tissue, cell proliferation, angiogenesis and intense necrosis. Currently, the main therapeutic approach consists of surgical resection followed by radiotherapy and chemotherapy. However, in most cases, the tumor is not well defined, spreading through the brain region, which makes it difficult to fully resection. In addition, the removal of tissue from this region can leave several sequels. Consequently, patients have high rates of recurrence and low rates of survival. Another problem in the treatment of this type of tumor is due to the lining of the blood-brain barrier that restricts the entry of molecules and substances, including drugs. Thus, this project aims to analyze the antineoplastic effects of the association of a nanoparticle called LDE with a structure similar to low-density lipoprotein (LDL) that will act as a carrier of the drug paclitaxel (PTX), commercially known as Taxol®, it is a chemotherapeutic drug whose cell antiproliferative action has been proven in the treatment of other types of cancer, such as breast and refractory ovarian cancers. For this purpose, the mouse glioblastoma cell line C6 was used for performing *in vitro* analysis regarding the effects of these treatments on aspects of viability, cytotoxicity and cell death by apoptosis, using the ApoTox-Glo™ Triplex Assay kit (Promega Corporation), which performs the three previously mentioned analyses, sequentially. To evaluate growth and drug effect on PTX and LDE/PTX treatment groups, approximately 1×10^6 cells were cultured in 96-well microplates at concentrations of 0.01; 0.1; 1 and 10 μM in the times of 24h, 48h and 72h. The control was not exposed to the compounds, containing only DMEM culture medium. Results obtained after treatments with PTX and LDE/PTX were expressed as mean \pm standard deviation and analyzed by one-way (cytotoxicity) and two-way (viability and apoptosis) ANOVA, followed by Tukey's post hoc test. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Keywords: Anti-tumor effect; Glioblastoma; C6 cell line; Paclitaxel, LDE, Nanotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado do processo de carcinogênese .	12
Figura 2. Tipos de cânceres mais incidentes na população brasileira	14
Figura 3. Esquema com alguns dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de diferentes tipos de câncer	15
Figura 4. Localização primária dos tumores na região Norte, divididas por sexo (masculino e feminino) e a porcentagem a cada 100 mil casos.	16
Figura 5. Imagens de um glioblastoma obtidas pela técnica de ressonância magnética.	19
Figura 6. Porcentagem de ocorrência dos glioblastomas de acordo com as subdivisões dos lobos cerebrais.	20
Figura 7. Mecanismo de ação do paclitaxel (PTX) no câncer.....	24
Figura 8. Esquema ilustrativo do uso de sistema de entrega de fármacos para célula cancerígena.....	27
Figura 9. Estrutura da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e da nanoemulsão (LDE) de estrutura semelhante.....	29
Figura 10. Protocolo para avaliação de apoptose com o kit Caspase-Glo® 3/7 da Promega.....	34
Figura 11. Viabilidade celular dada em porcentagem e em função das horas de experimentação (24h, 48h e 72h). Os grupos tratados correspondem ao PTX e ao LDE/PTX nas seguintes concentrações: 0,01 μM ; 0,1 μM ; 1 μM e 10 μM	35
Figura 12. Citotoxicidade expressa em log na base 10, para o tempo de 24h de exposição aos tratamentos com PTX e LDE/PTX nas concentrações de 0,01 μM ; 0,1 μM , 1 μM e 10 μM , comparados ao controle não exposto, contendo apenas meio DMEM + células.....	38
Figura 13. Citotoxicidade expressa em log na base 10, para o tempo de 48h de exposição aos tratamentos com PTX e LDE/PTX nas concentrações de 0,01 μM ; 0,1 μM , 1 μM e 10 μM , comparados ao controle não exposto, contendo apenas meio DMEM + células.....	40

Figura 14. Citotoxicidade expressa em log na base 10, para o tempo de 72h de exposição aos tratamentos com PTX e LDE/PTX nas concentrações de 0,01 μM ; 0,1 μM , 1 μM e 10 μM , comparados ao controle não exposto, contendo apenas meio DMEM + células.....41

Figura 15. Apoptose celular medida através da análise das caspases 3 e 7, dada em porcentagem e em função das horas de experimentação (24h, 48h e 72h). Os grupos tratados correspondem ao PTX e ao LDE/PTX nas seguintes concentrações: 0,01 μM ; 0,1 μM ; 1 μM e 10 μM42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estimativas do ano de 2020 das taxas brutas e ajustadas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária 16

Tabela 2. Graus dos gliomas segundo classificação de tumores do SNC. 18

Tabela 3. Dados de viabilidade provenientes da ANOVA expressos em LOG para PTX e LDE/PTX nas concentrações de 0,01 μM ; 0,1 μM ; 1 μM e 10 μM , nos tempos de exposição de 24h, 48h e 72h, comparados ao controle com meio DMEM, nos respectivos tempos. Letras diferentes na mesma linha representam que houve diferença estatística significativa calculada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)36

Tabela 4. Dados de citotoxicidade provenientes da ANOVA expressos em LOG para PTX e LDE/PTX nas concentrações de 0,01 μM ; 0,1 μM ; 1 μM e 10 μM , nos tempos de exposição de 24h, 48h e 72h, comparados ao controle com meio DMEM, nos respectivos tempos. Letras diferentes na mesma linha representam que houve diferença estatística significativa calculada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)39

Tabela 5. Dados de apoptose provenientes da ANOVA expressos em LOG para PTX e LDE/PTX nas concentrações de 0,01 μM ; 0,1 μM ; 1 μM e 10 μM , nos tempos de exposição de 24h, 48h e 72h, comparados ao controle com meio DMEM, nos respectivos tempos. Letras diferentes na mesma linha representam que houve diferença estatística significativa calculada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAF-R110	Substrato peptídico impermeável à célula fluorogênica
A/O	Substâncias diluídas água-óleo
BHE	Barreira hematoencefálica
C6	Linhagem celular de glioblastoma de rato
CO ₂	Gás carbônico
DDS	Sistema de entrega de drogas
DMEM	Meio de cultivo de linhagem celular <i>in vitro</i>
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção
GBM	Glioblastoma multiforme
GF AFC	Substrato peptídico fluorogênico e permeável às células
G2	Intervalo pré-mitótico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
LDE	Nanoemulsão similar a lipoproteína de baixa densidade
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
M	Mitose
NCI-USA	Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos
NE	Nanoemulsões
NF	Nanofibras
NP	Nanopartículas
O ₂	Gás oxigênio

O/A	Substâncias diluídas óleo-água
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Escala para indicar acidez ou basicidade de uma solução
PNP	Nanopartículas poliméricas
PTX	Paclitaxel
RM	Ressonância Magnética
SBF	Soro Bovino Fetal
SNC	Sistema Nervoso Central
TMZ	Temozolomida
tp53	Gene supressor tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
1.1. CÂNCER	12
1.1.1. Câncer do Sistema Nervoso Central (SNC)	14
1.2. GLIOMAS	17
1.2.1. Glioblastoma Multiforme (GBM)	19
1.3. MODELO EXPERIMENTAL DE ESTUDO	21
1.3.1. Cultura de Células	21
1.3.2. Vantagens e aplicações das análises in vitro	22
1.3.3. Linhagem de glioma de rato (C6)	22
1.4. AGENTES ANTICANCERÍGENOS DERIVADOS DE PLANTAS	23
1.4.1. Paclitaxel (PTX)	23
1.5. NANOMEDICINA	26
1.5.1. Nanoemulsão LDE	27
1.6. TRATAMENTO CONVENCIONAL DE TUMORES CEREBRAIS VERSUS TRATAMENTO COM USO DE NANOSSISTEMAS.....	29
2. OBJETIVOS	31
2.1. Objetivo geral	31
2.2. Objetivos Específicos	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Obtenções da Linhagem C6, PTX e conjugado LDE/PTX	32
3.2. Preparo do LDE e do Conjugado LDE/PTX	32

3.3. Cultura de células	.32
3.4. Ensaios de viabilidade, citotoxicidade e apoptose.....	33
3.5. Análise estatística.....	34
4. RESULTADOS	35
4.1. Viabilidade.....	35
4.2. Citotoxicidade.....	38
4.3. Apoptose.....	42
5.DISSCUSSÃO.....	44
6.CONCLUSÃO.....	49
7.REFERÊNCIAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÂNCER

O câncer envolve mais de 100 diferentes tipos de doenças malignas, cuja principal característica é o crescimento desordenado das células de um tecido ou órgão específico, apresentando uma série de alterações metabólicas que promovem sua sobrevivência, progressão e, por vezes, a invasão dos tecidos adjacentes. Os diferentes tipos de câncer vão ser nomeados de acordo com o tipo de célula do corpo onde se originam (HANAHAN & WEINBERG, 2011). O câncer surge a partir de uma alteração no DNA da célula, decorrente de mutações, causando alterações em seu funcionamento. Essas modificações podem ocorrer em genes denominados protooncogenes. Estes genes quando mutados se tornam oncogenes, e, portanto, capazes de transformar células normais em células cancerosas. O processo de formação do câncer é chamado de carcinogênese (Figura 1) ou oncogênese, e este pode ocorrer de forma lenta, podendo levar vários anos até que se possa ter um tumor visível. Isto ocorre devido à exposição a diversos agentes cancerígenos ao longo da vida de um indivíduo, e em alguns casos, devido a uma predisposição genética, fazendo com que a célula normal passe pelos estágios de iniciação, promoção, progressão (Figura 2) até que ocorra a manifestação de fato da célula tumoral (INCA, 2020).

Como surge o câncer?

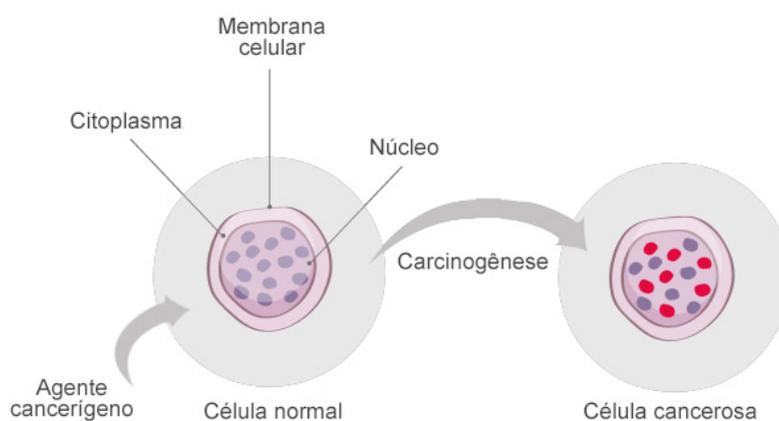


Figura 1: Esquema simplificado do processo de carcinogênese, onde uma célula normal sofre a ação de um agente cancerígeno, fazendo com que se torne uma célula cancerosa. INCA 2020 site <https://www.inca.gov.br/como-surge-o-cancer> acessado em 22.05.2022.

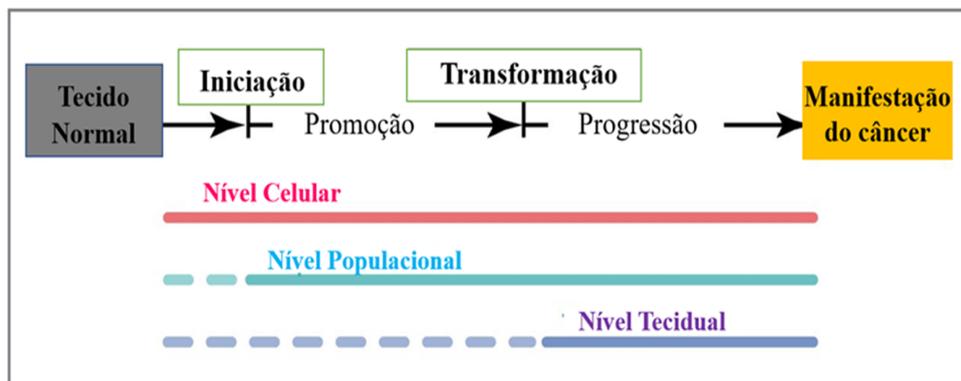


Figura 2. Além da célula cancerosa: os determinantes do nível de progressão destacam a natureza de múltiplas escalas do risco de carcinogênese. Hlatky & Hahnfeldt, 2013.

O câncer ainda se configura como um dos principais problemas de saúde pública no mundo, estando entre uma das quatro causas de morte prematura, antes dos 70 anos, na população de diversos países. A taxa de incidência e mortalidade tem aumentado devido a diversos fatores, como o crescimento e envelhecimento populacional e mudanças na distribuição e prevalência dos fatores de risco, especialmente aqueles que se associam ao desenvolvimento socioeconômico. Atualmente observa-se um declínio nos casos associados a infecções, e um aumento daqueles ligados à melhoria das condições socioeconômicas com a incorporação de hábitos sedentários, alimentação inadequada, dentre outros fatores (BRAY *et al.*, 2018).

No mundo o tipo de câncer mais incidente é o de pulmão, seguido pelos de mama, colorretal e próstata. O Brasil por sua vez, acompanha essa transição epidemiológica, tendo diminuição de casos associados a infecções que se relacionam com condições socioeconômicas desfavoráveis, como os de cavidade oral e colo uterino, expressando aumento nos casos relacionados a aspectos socioeconômicos mais favoráveis e provenientes da incorporação de hábitos e atitudes relativas à urbanização (INCA, 2019).

Dados apontam que somente no ano de 2018, ocorreram 18 milhões de novos casos de câncer no mundo (cerca de 17 milhões sem considerar os casos de câncer de pele não melanoma), com 9,6 milhões de óbitos (9,5 milhões excluindo os casos de câncer de pele não melanoma) (BRAY *et al.*, 2018). De acordo com informações do INCA do ano de 2019, para cada ano do triênio de 2020-2022, estimava-se cerca de 450 mil novos casos, (excluindo os novos cânceres de pele não melanoma). Tumores com maior estimativa de novos casos

(Figura 3) são os de mama e próstata, (cerca de 66 mil novos casos cada), seguidos pelo colorretal (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil).

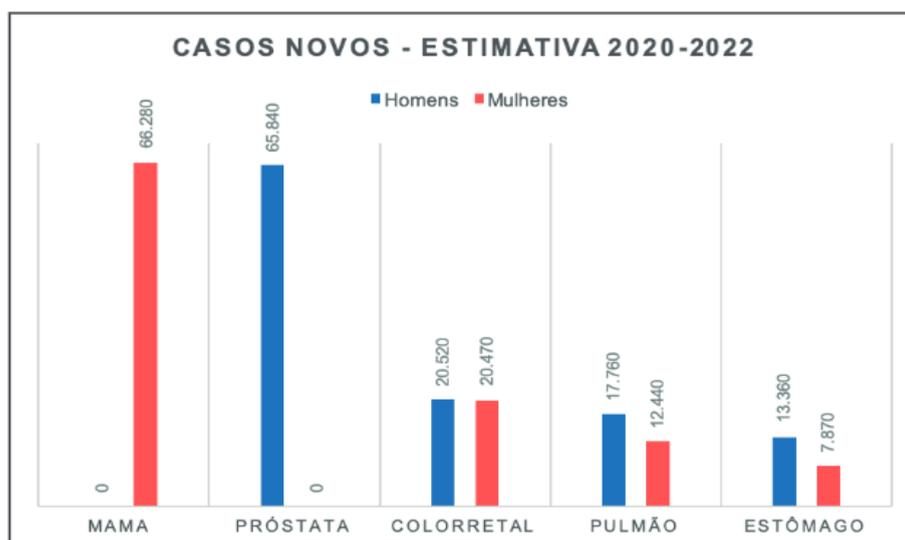


Figura 3: Tipos de cânceres mais incidentes na população brasileira. Fonte: INCA, 2019.

1.1.1. Câncer do Sistema Nervoso Central (SNC)

Os tumores do SNC são formados pelo crescimento anormal de células que ocorrem nos tecidos localizados em qualquer região cerebral ou medular, com maior ocorrência no cérebro (cerca de 88%). O câncer do SNC representa de 1,4 a 1,8% de todos os tumores malignos no mundo. As causas ainda vem sendo alvo de diversos estudos, no entanto, entende-se atualmente que ela é causada pela soma de diversas alterações epigenéticas, adquiridas durante a vida por predisposição ou exposição. Algumas se dão por causas hereditárias e associadas a síndromes familiares, como a neurofibromatose (INCA, 2019).

Dentre alguns fatores que conhecidamente aumentam o risco, temos: a exposição à radiação ionizante (profissionais que lidam com raio X, pacientes que realizam radioterapia, ou exposição a exames excessivos com radiação como tomografias), outro fator seria a deficiência do sistema imunológico (causada pelo vírus HIV por exemplo, ou mesmo pelo uso de medicamentos ou drogas responsáveis pela supressão do sistema imunológico). Entre as causas ambientais, tem-se a exposição a arsênico, chumbo, mercúrio, óleo mineral, radiação (X e gama) levando a um aumento do risco de desenvolvimento de gliomas, como consequência do tratamento de radioterapia para tumores primários, além de exposições ocupacionais (trabalhadores na indústria petroquímica, de borracha, plástico e gráfica) (figura

4). Outros possíveis fatores de risco já foram estudados, mas não se tem relação confirmada com a doença, como por exemplo, traumatismos na região da cabeça (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; INCA, 2019).

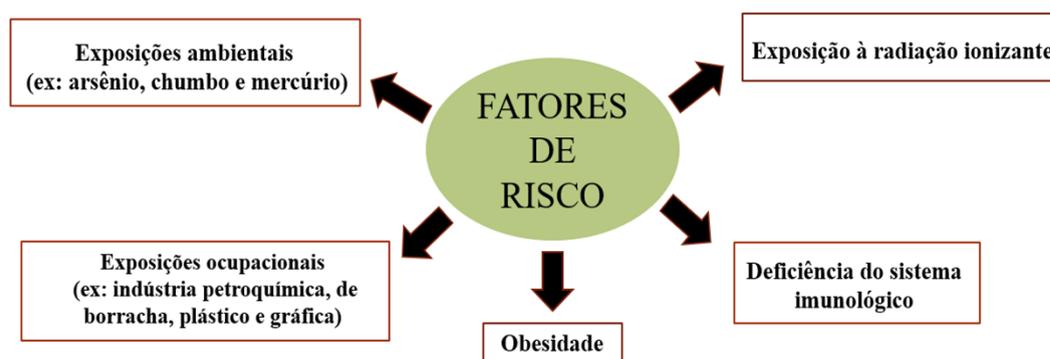


Figura 4: Esquema com alguns dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de diferentes tipos de câncer. Fonte: ANJOS, A.C.B (autoria própria), 2020.

Em termos de incidência, o câncer do SNC ocupa a décima terceira posição em homens e a décima sexta posição entre as mulheres no mundo. Somente em 2018, foram estimados 162 mil casos novos em homens e 134 mil em mulheres, o que corresponde a um risco estimado de 4,2/100 mil homens e 3,6/100 mil mulheres. As maiores taxas de incidência de câncer do SNC se concentram nos países do Centro-Norte Europeu, em homens, e nos países do Sul da Europa e na América do Norte, em mulheres (BRAY *et al.* 2018; FERLAY *et al.*, 2018). Para o Brasil, foram estimados cerca de 5.870 casos novos de câncer do sistema nervoso central em homens e 5.220 em mulheres, para cada ano do triênio 2020-2022. Esse valor corresponde a um risco estimado de 5,61 casos novos a cada 100 mil homens e de 4,85 casos novos a cada 100 mil mulheres (Tabela 1) (INCA 2020).

Tabela 1: Estimativas do ano de 2020 das taxas brutas e ajustadas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária*. Fonte: INCA, 2020.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos											
	Homens						Mulheres					
	Estados			Capitais			Estados			Capitais		
	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada
Próstata	65.840	62,95	50,78	13.640	60,53	57,33	-	-	-	-	-	-
Mama feminina	-	-	-	-	-	-	66.280	61,61	43,74	19.820	78,88	45,90
Colo do útero	-	-	-	-	-	-	16.590	15,43	12,60	4.180	16,55	10,13
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	16,99	16,19	3.180	14,17	16,11	12.440	11,56	9,24	3.760	14,96	11,32
Cólon e reto	20.520	19,63	18,80	5.320	23,59	21,26	20.470	19,03	13,36	6.260	24,90	15,59
Estômago	13.360	12,81	11,37	2.430	10,85	11,23	7.870	7,34	5,95	1.920	7,71	6,61
Cavidade oral	11.180	10,69	9,25	2.040	9,03	9,19	4.010	3,71	2,66	1.040	4,00	3,21
Laringe	6.470	6,20	5,75	1.150	5,00	4,97	1.180	1,06	0,92	360	1,06	0,79
Bexiga	7.590	7,23	4,61	1.800	7,87	7,12	3.050	2,80	2,03	900	3,44	2,61
Esôfago	8.690	8,32	6,48	1.160	5,00	6,27	2.700	2,49	1,76	460	1,60	1,42
Ovário	-	-	-	-	-	-	6.850	6,18	4,84	1.870	7,50	5,19
Linfoma de Hodgkin	1.590	1,52	1,33	450	1,71	1,93	1.050	0,95	0,88	430	1,35	1,04
Linfoma não Hodgkin	6.580	6,31	5,67	1.430	6,41	7,27	5.450	5,07	3,37	1.260	4,96	4,27
Glândula tireoide	1.830	1,72	1,52	1.090	4,52	1,81	11.950	11,15	8,13	4.650	18,47	8,13
Sistema nervoso central	5.870	5,61	5,22	1.150	5,07	6,27	3.220	4,85	4,17	1.440	5,69	4,35
Leucemias	5.920	5,67	5,55	1.210	5,43	5,93	4.890	4,56	3,95	1.180	4,69	4,64
Corpo do útero	-	-	-	-	-	-	6.540	6,07	5,22	1.930	7,61	6,14
Pele melanoma	4.200	4,03	2,01	790	3,36	3,40	4.250	3,94	1,78	870	3,28	2,49
Outras localizações	48.090	45,97	41,48	9.320	41,34	48,09	42.390	39,43	29,40	9.790	38,88	26,48
Todas as neoplasias, exceto pele não melanoma	225.460	215,65	215,86	46.160	204,92	238,47	222.980	207,36	145,00	62.120	247,24	159,85
Pele não melanoma	83.770	80,12	-	20.010	88,84	-	93.160	86,65	-	19.090	75,96	-
Todas as neoplasias malignas	309.230	295,78	-	66.170	293,75	-	316.140	294,00	-	81.210	323,22	-
Todas as neoplasias malignas, corrigidas para sub-registro	387.980	371,11	-	-	-	-	297.980	277,11	-	-	-	-

*População padrão mundial (1960) / *Números arredondados para múltiplos de 10.

Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer do sistema nervoso central em homens ocupa a sétima posição nas Regiões Norte (3,20/100 mil) (figura 4) e Centro-Oeste (6,05/100 mil). Na Região Sul, ocupa a oitava posição (8,63/100 mil); a nona posição na Região Nordeste (4,72/100 mil); e a décima segunda posição na Região Sudeste (5,59/100 mil). Para as mulheres, é o sétimo mais frequente na Região Sul (7,64/100 mil); oitavo na Região Norte (3,03/100 mil) (Figura 5); corresponde à nona posição nas Regiões Centro-Oeste (4,95/100 mil) e Nordeste (4,21/100 mil) e ocupa a décima primeira posição na Região Sudeste (4,69/100 mil) (INCA 2020).

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	2.770	28,7%			Mama feminina	1.970	21,0%
Estômago	1.110	11,5%			Colo do útero	1.940	20,6%
Traqueia, brônquio e pulmão	870	9,0%			Cólon e reto	590	6,3%
Cólon e reto	490	5,1%			Traqueia, brônquio e pulmão	590	6,3%
Leucemias	410	4,2%			Estômago	550	5,9%
Cavidade oral	340	3,5%			Leucemias	320	3,4%
Sistema nervoso central	300	3,1%			Sistema nervoso central	280	3,0%
Esôfago	250	2,6%			Ovário	310	3,3%
Laringe	240	2,5%			Glândula tireoide	260	2,8%
Linfoma não Hodgkin	210	2,2%			Corpo do útero	230	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 5: Localização primária dos tumores na região Norte, divididas por sexo (masculino e feminino) e a porcentagem a cada 100 mil casos. Fonte: INCA, 2020.

Os tumores cerebrais podem ser divididos em primários e secundários. Os primeiros possuem origem no tecido cerebral, enquanto que o restante é resultado do espalhamento de células cancerosas para outras regiões do organismo (metástases). Os primários, por sua vez, são classificados como: gliomas, linfomas do SNC (que se originam no parênquima cerebral), meningiomas e adenomas pituitários (tumores extra parenquimatosos) (TAPEINOS *et al.*, 2017).

1.2. GLIOMAS

Os gliomas podem se originar das células estaminais neuronais, células progenitoras ou células neuronais diferenciadas e adultas, que se transformam em células cancerosas, constituindo o tipo de tumor cerebral primário mais prevalente. São classificados de acordo com o tecido celular de onde se originam (Figura 6), podendo ser de origem astrocitária (astrocitomas), oligodendrogliar (oligodendrogliomas) e ependimárias (ependimomas), constituindo um grande espectro de tumores de diferentes tipos, de difícil tratamento e de mau prognóstico (WOENSEL *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2018).

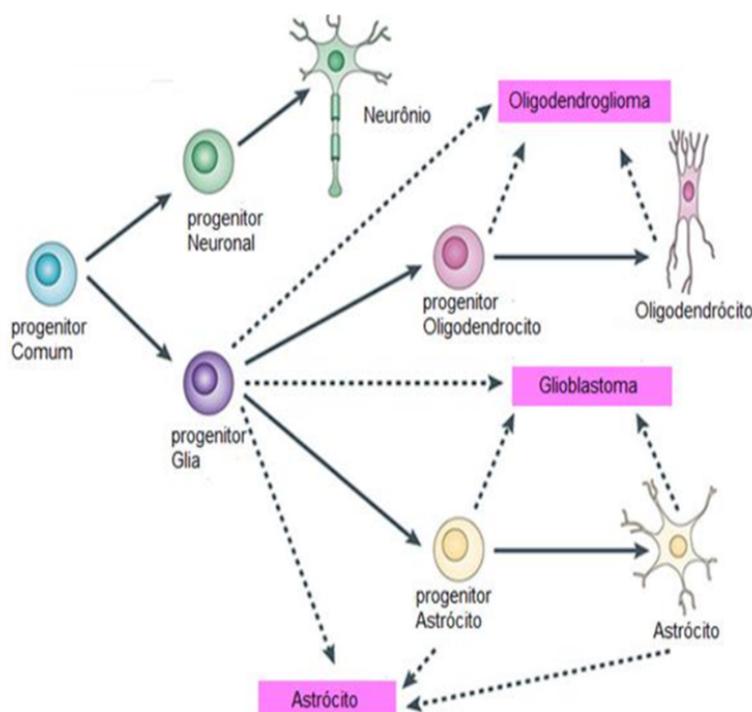


Figura 6: Células gliais maduras e seus precursores. Spatti, 2016 (adaptado de Huse e Holland, 2010.)

Histologicamente, os gliomas partilham características das células da glia normais e são normalmente classificados conforme essas semelhanças. Este tipo tumoral é classificado pela Organização Mundial da saúde (OMS) por graus de acordo com nível de gravidade, sendo assim classificados na ordem de I a IV (Tabela 2). Os graus I e II são tidos como menos graves, sendo, portanto, os gliomas de baixo grau (CHEN *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2020).

Tabela 2: Graus dos gliomas segundo classificação de tumores do SNC. Fonte: OMS, 2016 [adaptado de LOUIS *et al.*, 2016].

GRAUS DOS GLIOMAS	
Astrocitomas difusos e Oligodendrogliomas	
Astrocitoma difuso, IDH mutante	II
Astrocitoma anaplástico, IDH mutante	III
Glioblastoma, IDH <i>wildtype</i>	IV
Glioblastoma, IDH mutante	IV
Oligodendroglioma, IDH mutante e com a codeleção 1p/19q	II
Oligodendrogliomas anaplástico, IDH mutante e com a codeleção 1p/19q	III
Outros Astrocitomas	
Astrocitoma pilocítico	I
Astrocitoma subependimário de células gigantes	I
Xantoastrocitoma pleomórfico	II
Xantoastrocitoma pleomórfico anaplástico	III
Ependimonas	
Subependimonas	I
Ependimonas mixopapilar	I
Ependimona	II
Ependimonas anaplástico	III

Gliomas de graus III e IV costumam afetar mais a população adulta, representando cerca de mais de 50% dos casos de todos os tumores cerebrais intrínsecos. Entre os tumores primários mais comuns temos os astrocitomas de grau III e o glioblastoma de grau IV, em adultos, e o meduloblastoma, em crianças, sendo que estes se configuram como os tipos mais graves e considerados como gliomas de grau elevado (WOENSEL *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2018). O glioblastoma se configura como a forma mais maligna dentre os gliomas, e apresenta uma média de vida de 15 meses, após ser feito o diagnóstico, resultando em cerca de 3-4 % das mortes relacionadas ao câncer (CARLSSON *et al.*, 2014; LAH *et al.*, 2020).

Uma característica marcante dos gliomas é sua infiltração no parênquima cerebral, o que dificulta a ressecção cirúrgica completa, conseqüentemente, esses tumores apresentam uma maior reincidência, resultando em uma alta taxa de mortalidade. Os componentes extracelulares do cérebro, seus parceiros e moduladores associados, desempenham um papel crucial na invasão celular do glioma (FERRER *et al.*, 2018).

O diagnóstico destes tumores é baseado em estudos de imagem e, para que se tenha maior precisão, é requerida análise histológica do tecido tumoral, a qual pode ser obtida através de biópsia ou ressecção, o que pode apresentar risco elevado dependendo da zona em

que está localizado. Além disso, dependendo da zona, pode não ser possível realizar a remoção cirúrgica, ou até mesmo apresentar resistência à radio e quimioterapia (LIANG *et al.*, 2020).

As opções terapêuticas disponíveis no tratamento de gliomas, incluem basicamente a cirurgia, radioterapia e quimioterapia, porém ainda se mostram pouco eficazes no controle da doença. A melhor abordagem tem sido nos pacientes submetidos a ressecção total, seguida de radioterapia e quimioterapia adjuvante com temozolomida (Tmz), porém, ainda assim, a sobrevida continua sendo em torno de apenas 20 meses (WOLBERS, 2014).

Alves (2014) aborda inúmeros estudos e ensaios realizados, nos quais é unanimemente reconhecido que será necessária uma abordagem combinada para a obtenção de um prognóstico mais favorável e consequente aumento da sobrevida dos pacientes. Essa abordagem poderá passar pelo uso de nanopartículas para marcar as células tumorais seguido da radioterapia e quimioterapia convencionais.

1.2.1. Glioblastoma (GBM)

O glioblastoma é o tipo de tumor cerebral mais comum e maligno em adultos (Figura 7). A OMS o define como um tumor de grau IV, mitoticamente ativo e predisposto a necrose (CARLSSON *et al.*, 2014). O diagnóstico é feito através de um exercício multidisciplinar de avaliação de sintomas clínicos, dentre estes: ataques epiléticos, dores de cabeça, déficits neurológicos ou disfunção cognitiva associados ao local onde está o tumor (WOENSEL *et al.*, 2013).

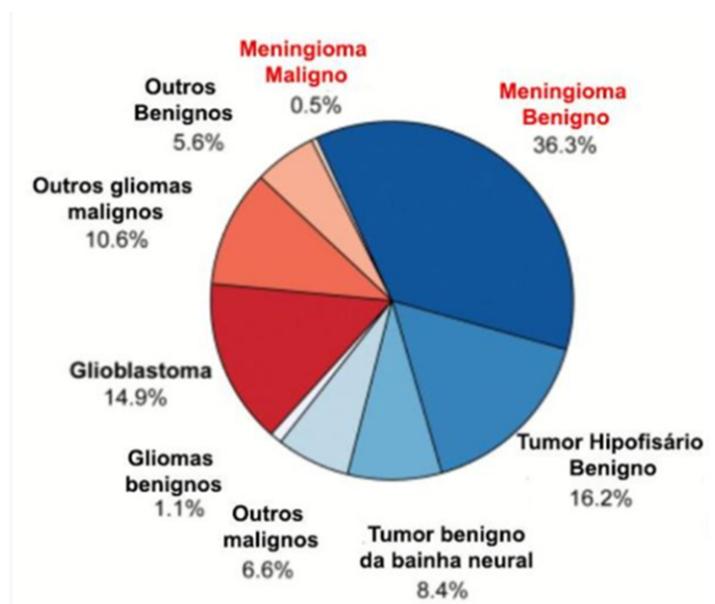


Figura 7: Distribuição de tumores malignos e benignos do sistema nervoso central dada em porcentagem. ACHEY et al., 2019).

Em caso de suspeita de tumor, é imprescindível a realização de uma ressonância magnética (Figura 8), com ou sem contraste, para obter uma avaliação exata da delimitação do tumor no cérebro (WOENSEL *et al.*, 2013). Depois do diagnóstico, a expectativa média de vida é estabelecida entre 12 a 15 meses, mesmo quando se utiliza uma abordagem de tratamento mais agressiva (JNAIDI *et al.*, 2020).

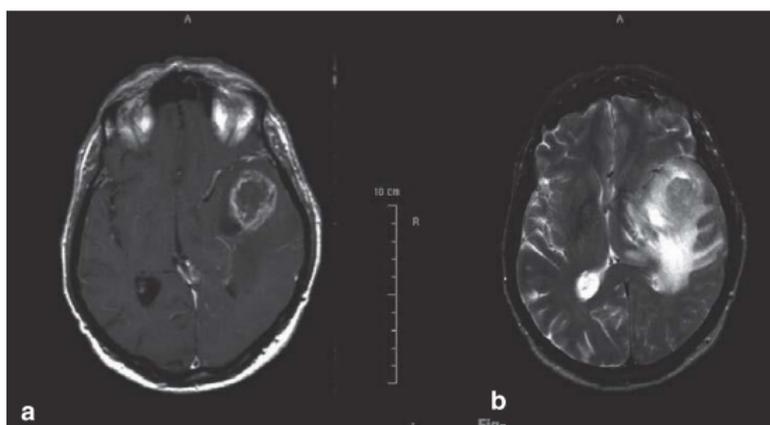
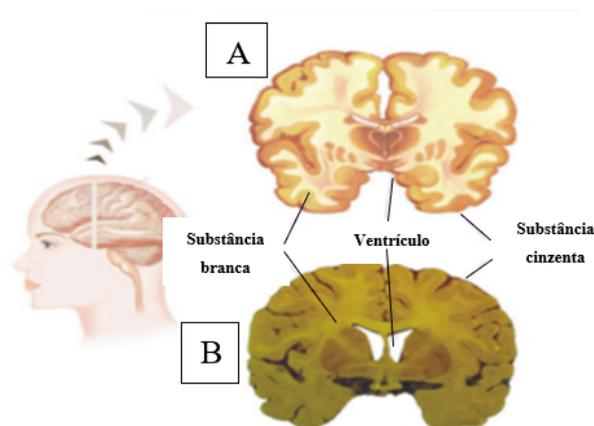
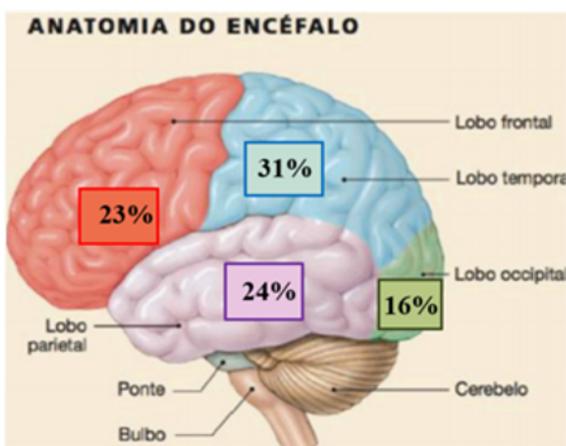


Figura 8: Imagens de um glioblastoma obtidas pela técnica de ressonância magnética: uma massa centralmente necrótica com um forte contraste periférico e um marcado edema perifocal. Fonte: Schneider *et al.*, 2010.

Anatomicamente, o GBM se localiza principalmente na substância branca subcortical. Em geral, acomete as seguintes regiões: lobo temporal (31%), parietal (24%), frontal (23%) e occipital (16%), vide abaixo (Figura 9). Raramente encontram-se lesões na região infratentorial e medula espinhal (KOUL *et al.*, 2012). Macroscopicamente observa-se que o GBM é bastante heterogêneo com hemorragia multifocal, necrose, áreas císticas e gelatinosas (SMITH & IRONSIDE, 2007; AGNIHOTRI *et al.*, 2013). Há uma variação na aparência do tumor dependendo da região em que se localiza. Algumas regiões aparentam uma coloração amarelada e são macias devido à necrose tecidual, outras partes do tumor já são



esbranquiçadas e firmes, com algumas regiões exibindo degeneração cística e hemorrágica (FROSCH, 2013).

Figura 9: À esquerda: localização dos lobos cerebrais [Prof. Raimundo Jr., Anatomia e Fisiologia do Sistema Nervoso. Pontifícia Universidade Católica de Goiás]. À direita: corte transversal do cérebro mostrando a localização das substâncias branca e cinzenta. Fonte: LENT, R. Cem bilhões de neurônios? Conceitos fundamentais de neurociência, 2ª ed. Editora Atheneu, 2010.

No entanto, apesar da sua agressividade local, as células tumorais raramente abandonam o SNC. Nesse sentido, devido à sua rápida progressão e aos danos provocados nos centros nervosos, os doentes morrem antes que se consigam detectar metástases sistêmicas. Por esse motivo, a incidência estimada de metástases extracranianas de glioblastoma é de 0,5% para todos os doentes (LAH *et al.*, 2020).

Este tipo de tumor apresenta um prognóstico desfavorável tendo em conta as limitações relacionadas com a idade avançada e a área cerebral onde surge. Embora este tipo de tumor apresente semelhanças ou fenótipos sobrepostos, as diferenças na progressão tumoral e nos mecanismos moleculares requerem mais que um perfil histológico para a sua caracterização, o que não se configura como algo viável, já que para se obter uma caracterização mais extensa, se faz necessária uma biópsia, a qual devido à fragilidade do tecido cerebral e localização, não é de fácil obtenção (CARLSSON *et al.*, 2014).

Existem vários subtipos de glioblastoma multiforme primário que foram identificados com base na histologia das células, tais como: gliossarcoma, glioblastoma multiforme de células gigantes e glioblastoma multiforme epitelióide (CHEN *et al.*, 2017). Apesar das diferentes formas de classificação, clinicamente todos os glioblastomas são semelhantes, sendo caracterizados por uma abundante necrose, pleomorfismo e vascularização.

O glioblastoma demonstra uma elevada taxa de reincidência, mesmo depois de tratamento combinado de remoção cirúrgica e quimioterapia. E isto ocorre, pois, a remoção cirúrgica é incompleta, devido à localização deste tumor ser de caráter invasivo em áreas cerebrais de funcionalidade importante, tais quais regiões que incluem o controle da fala, das funções motoras ou dos sentidos (WOENSEL *et al.*, 2013).

Além disto, outra dificuldade no tratamento deste tipo tumoral, se dá devido a existência da barreira hematoencefálica (BHE), a qual é responsável por limitar a passagem de moléculas para o SNC, incluindo fármacos anticancerígenos (Figura 10), sendo necessário, portanto, administrar elevadas doses afim de atingir ação terapêutica no cérebro, o qual por sua vez, afeta também as células normais do indivíduo gerando uma série de efeitos colaterais. Para ultrapassar essa dificuldade, várias estratégias terapêuticas foram propostas

para facilitar a chegada dos fármacos ao cérebro, considerando-se que a BHE é permeável apenas a moléculas pequenas e lipofílicas, com um peso molecular igual ou inferior a 400-500 Da (BRUINSMANN *et al.*, 2019).

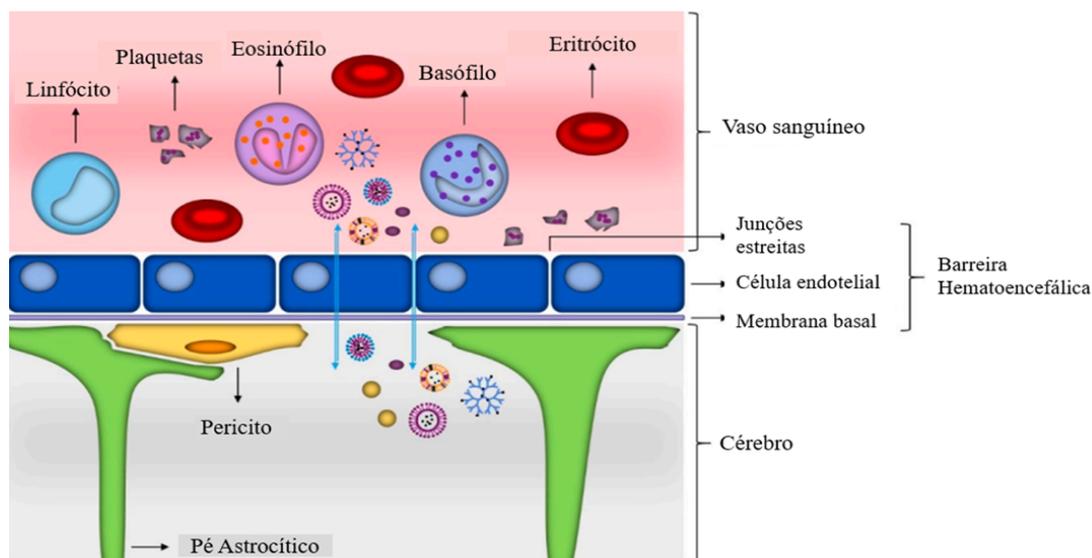


Figura 10: Barreiras que interferem com a veiculação de fármacos a células tumorais. Nakamura *et al.*, 2016.

Apesar de ainda se configurar como um desafio para a ciência, diversos grupos de pesquisa vêm desenvolvendo trabalhos utilizando-se de novas nanotecnologias para superar estes obstáculos. Uma das opções para se contornar essa limitação da BHE, seria, portanto, utilizar-se de nanocarreadores (PATEL *et al.*, 2012; AFTAB *et al.*, 2018), a qual será demonstrada ao decorrer do presente estudo através da utilização de uma nanoemulsão para fins de terapêuticos de células de GBM de rato cultivadas *in vitro*.

1.3. MODELO EXPERIMENTAL DE ESTUDO

1.3.1. Cultura de Células

O modelo de cultura de células, tanto sadias quanto tumorais consiste em uma importante ferramenta para o desenvolvimento de diversos protocolos experimentais para estudos farmacológicos, análise da ação de compostos, interação celular, entre outros. A cultura de células animais tem gerado importantes elucidações a respeito da biologia das células neoplásicas, processos patológicos e o desenvolvimento de novas estratégias contra o crescimento e a progressão de células tumorais (FRESHNEY, 2005).

Sendo o cultivo celular um importante modelo biológico *in vitro*, é preciso entender as condições artificiais na qual as células são submetidas e como as observações podem ser

aplicadas *in vivo* (GRESHOCK *et al.*, 2007). Trata-se de um modelo que pode ser empregado para avaliação de condições metabólicas, patofisiológicas, investigação de mecanismos de resistência às drogas, além do desenvolvimento de novos agentes antitumorais (LIMA, 2008).

Modelos utilizando culturas de células possibilitam a realização de estudos a nível molecular, com a vantagem de poder manipular as condições ambientais e pela facilidade de criopreservação. Além do mais, apresentam baixo custo e otimizam tempo para obtenção de resultados, considerando-se que diversas hipóteses podem ser testadas utilizando uma infinidade de linhagens celulares (LIMA, 2008).

1.3.2. Vantagens e Aplicações das Análises *in vitro*

As pesquisas *in vitro* possibilitam realizar ensaios de toxicidade e a busca de potenciais compostos com capacidade antitumoral, estabelecendo relação entre a concentração destes compostos e a resposta celular, sendo assim, desperta a possibilidade de novos alvos moleculares para o tratamento do câncer (CARVALHO *et al.*, 2014).

Além do mais, oferece inúmeras vantagens, dentre as quais: o controle das condições de pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de CO₂, tensão de O₂ e manutenção das condições fisiológicas quase constantes. Outra vantagem importante reside na possibilidade de se executar um maior número de replicatas e testar uma ampla variedade de compostos a um menor custo do que os testes realizados *in vivo*, reduzindo também as questões éticas e o impasse burocrático necessário para a pesquisa experimental em modelos animais (FRESHNEY, 2005). A avaliação da proliferação celular *in vitro* serve ao propósito de verificar a atividade de diferentes concentrações de compostos e qual papel desempenham na inibição das células tumorais. Em geral, esta é a primeira etapa para se avaliar candidatos a novos fármacos (ALBERTS *et al.*, 2008).

O aprimoramento das metodologias para execução da cultura de células tornou possível um estudo mais amplo de diversas neoplasias através de linhagens celulares tumorais. Possibilitando assim, uma maior análise de drogas com capacidade antitumoral, ampliando a especificidade das descobertas de novos alvos terapêuticos. Os estudos *in vitro* são importantes para a extrapolação para os modelos *in vivo*, de modo que a atividade antitumoral seja comprovada em ensaios clínicos, superando as limitações dos modelos *in vitro* (SHOEMAKER, 2006; HOGENESCH & NIKITIN, 2012).

1.3.3. Linhagem de Glioma de Rato (C6)

A linhagem C6 foi desenvolvida por Benda *et al.*, (1968) através da administração repetitiva de MNU (metilnitrosourea) em ratos Wistar-Furth adultos e compartilha várias características específicas do GBM humano. Em termos genéticos, a linhagem C6, assim como o GBM humano, apresenta altas taxas de mutação no gene supressor do tumor p16 (FURNARI *et al.*, 2007). A nível celular, apresenta necrose, polimorfismo nuclear e taxas de mitose elevadas (AUER *et al.*, 1981). Em termos histopatológicos, apresenta características como invasão focal semelhante à infiltração padrão difusa observada no GBM humano (CHICOINE e SILBERGELD, 1995) e expressão de marcadores histopatológicos como as proteínas S100B, e a vimentina (PFEIFFER *et al.*, 1970, CHOU *et al.*, 2003). Devido à essas características, esta linhagem vem sendo amplamente utilizada para investigação de diversos aspectos da biologia celular, tais quais: sinalização celular, estresse oxidativo, metabolismo, estrutura e função de biomembranas, dinâmica de citoesqueleto, e toxicidade de drogas.

Através do estudo *in vitro* de tumores cerebrais, tal qual o glioblastoma, é possível investigar a biologia destas células tumorais, bem como avaliar a toxicidade dos fármacos sobre as células cancerosas, visando no futuro sua utilização como alvos terapêuticos. A maior parte dos fármacos anticancerígenos utilizados atualmente exercem sua ação através da indução de apoptose. Alguns fármacos convencionais, por exemplo, flavopiridol, cisplatina, paclitaxel e doxorubicina induzem a apoptose em células tumorais *in vitro* (MIZUTANI *et al.*, 2005; BRENES *et al.*, 2007).

1.4. AGENTES ANTICANCERÍGENOS DERIVADOS DE PLANTAS

Produtos derivados de plantas tem uma longa história de uso no combate contra o câncer. Em 2011, Kaur e colaboradores listaram pelo menos 3000 espécies de plantas legalizadas utilizadas desde a medicina tradicional até drogas de uso clínico. Muitas delas já mostraram eficiência comprovada e segura no tratamento ou no controle de alguns tipos de tumores (SHUKLA & MEHTA, 2015). Polifenóis, flavonóides, alcalóides, terpenóides e compostos sulfrídilo representam um grupo amplo e diverso de agentes derivados de plantas usados contra o câncer (MILLIMOUNO *et al.*, 2014). Vários agentes antitumorais à base de

plantas, incluindo o paclitaxel estão em uso clínico em todo o mundo (SHUKLA & MEHTA, 2015).

1.4.1. Paclitaxel (PTX)

O fármaco paclitaxel (PTX), comercialmente conhecido como Taxol[®], é o precursor de uma classe de agentes estabilizantes de microtúbulos denominados taxanos. Foi descoberto em 1962 a partir da casca da planta *Taxus brevifolia* (Figura 11).

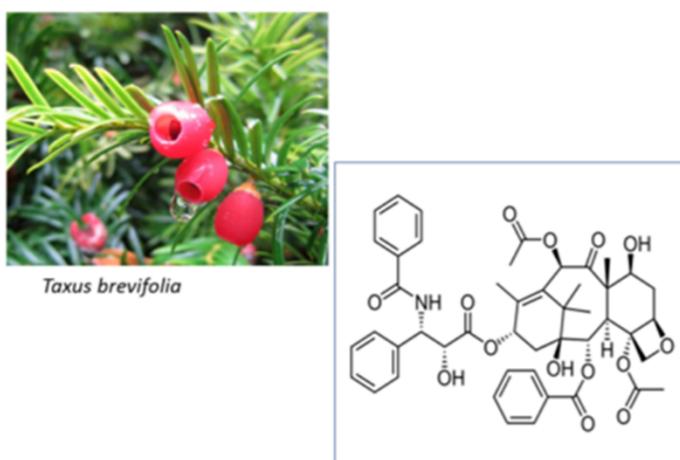


Figura 11: Planta de origem (*Taxus brevifolia*) e estrutura química do composto paclitaxel (PTX).

Fonte: <https://biopharmanotes.com/pharmacology-of-paclitaxel/>

Sua descoberta se deu a partir da investigação realizada pelo Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI-USA) de aproximadamente 12.000 compostos naturais testados contra um painel de tumores experimentais para seleção daqueles que demonstrassem melhores atividades, contudo, o PTX não teve sua importância reconhecida até o final dos anos 70, quando foi descoberto que possuía um mecanismo de ação único (ROWINSKY, 1990).

O mecanismo de ação deste fármaco difere da maior parte dos agentes que atuam sobre os microtúbulos provocando a despolimerização destes, como é o caso dos alcaloides da vinca e da colchicina. O PTX, por sua vez, promove a polimerização da tubulina e com isso há estabilização permanente dos microtúbulos tornando-os não funcionantes (BRANDÃO, 2010; BARKAT, BEG, POTTOO & AHMAD, 2019). Devido ao desequilíbrio promovido entre a formação de microtúbulos e a sua dissociação em tubulina, as fases G2 (intervalo pré-mitótico) e M (mitose) ficam comprometidas (Figura 12), portanto, ocorre o bloqueio da

divisão, proliferação e funções vitais celulares fazendo com que mecanismos de morte celular como a apoptose passem a ser ativados (PAZDUR *et al.*, 1993; CHABNER, 2012).

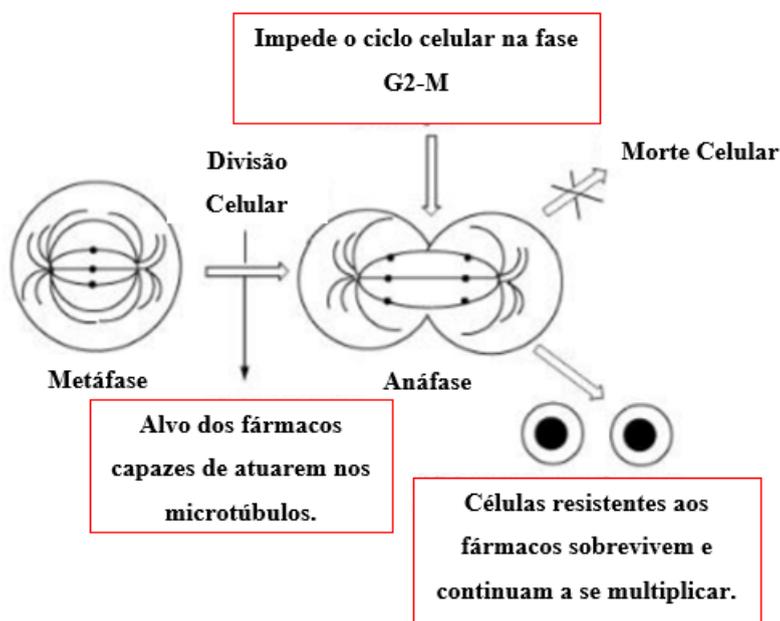


Figura 12: Mecanismo de ação do paclitaxel (PTX) no câncer. O fármaco agrega os microtúbulos, estabilizando-os, fazendo com que não ocorra a despolimerização. Com isso, há inibição da reorganização da rede de microtúbulos, a qual é essencial para a proliferação celular e transportes intracelulares dependentes de tubulina. Fonte: Adaptado de Sociedade Brasileira de Química (2014).

Sua ação antiproliferativa celular vem sendo demonstrada em diversos tipos de cânceres, tais como carcinoma epitelial de ovário, câncer de mama, câncer de colo uterino, câncer de células não-pequenas de pulmão e sarcoma de Kaposi (MICHA *et al.*, 2007; YARED & TKACZUK, 2012; MUSTACCHI, *et al.*, 2015;). Desde a década de 90, o PTX vem sendo utilizado no Brasil como tratamento de primeira linha em cânceres refratários de ovário e de segunda linha em cânceres de mama (ROWINSKY, 1997; SARTAJ; BABOOTA & ALI, 2020).

O PTX possui algumas características físico-químicas desfavoráveis, sendo a principal, sua baixa solubilidade em água (0,01 mg/mL), o que tornou difícil o desenvolvimento de uma forma de dosagem intravenosa. Esse medicamento apresenta problemas farmacológicos como a instabilidade da formulação após a diluição, pois, a reconstituição resulta em uma solução de concentração consideravelmente superior (0,3 – 1,2 mg/mL). Desta forma, a solubilidade aquosa do PTX pode ocasionar problemas de precipitação do fármaco após a diluição. Para contornar isto, a Bristol-Meyer Squib comercializou o Taxol como uma forma de solubilização do PTX em etanol desidratado e Cremophor® EL, um derivado polietoxilado do óleo de rícino, na proporção 1:1(v/v)

(DONYAI, 2006; SURAPANENI, 2012; MONTEIRO *et al.*, 2017; MONTEIRO, 2018). No entanto, esse veículo está associado com a indução da liberação de histamina levando a reações graves de hipersensibilidade. Devido a esse fator, há um comprometimento do tratamento quimioterápico. Assim, é necessário que sejam adotadas medidas profiláticas, tais como o uso de anti-histamínicos ou corticosteroides a fim de reduzidos os efeitos tóxicos (WEISS *et al.*, 1990; DIAS *et al.*, 2007).

A não seletividade dos compostos antitumorais, que atuam não somente sobre as células cancerosas mas também sobre as células normais do indivíduo, é responsável por inúmeros efeitos adversos, dentre estes: alopecia (perda temporária ou definitiva de pelos e cabelos); toxicidade gastrointestinal; toxicidade epitelial; mucosite (inflamação nas regiões internas da boca e garganta, levando a ulcerações) e neuropatia periférica (condição que afeta os nervos responsáveis por encaminhar informações provenientes do cérebro e da medula espinhal ao restante do corpo, podendo causar danos permanentes) (KIRSCH-VOLDERS, 1996; ATTARD *et al.*, 2006; HAIT *et al.*, 2007; CHABNER, 2012). Sintomas como perda da função motora, neurotoxicidade e mielossupressão frequentemente levam à interrupção do tratamento. Dentre os sintomas neuropáticos inclui-se dormência e formigamento nas extremidades, perda dos reflexos tendinosos profundos e fraqueza muscular distal. Já a mielossupressão decorre da estabilização dos microtúbulos mitóticos das células hematopoiéticas, causando a inibição da proliferação dessas células (HAIT *et al.*, 2007; CHABNER, 2012; SPATTI *et al.*, 2016).

Muitos alvos já foram identificados para tratamento dos gliomas, porém poucas terapias demonstraram eficácia e nenhuma foi aprovada, salientando a necessidade de um melhor conhecimento dos mecanismos de resistência deste tipo de tumor e a razão pela qual os ensaios clínicos falham (WEATHERS *et al.*, 2017). Os motivos para essas falhas são muitos, incluindo entre outros: falta de dependência do tumor em relação ao alvo proposto, falha na adequação da penetração no SNC dos fármacos através da BHE, falha da inibição adequada do alvo dos fármacos que penetram no SNC, heterogeneidade intratumoral, evolução clonal e escape do antígeno nos casos em que a inibição do alvo é eficaz (CHEN *et al.*, 2016; MILLER *et al.*, 2016). Consequentemente, o uso de novas nanotecnologias se torna de grande interesse para pesquisa, uma vez que apresentam resultados promissores no tratamento de GBM.

Devido aos inúmeros efeitos adversos já descritos anteriormente, se faz necessária a busca por medicamentos antitumorais que sejam ao mesmo tempo eficazes em sua ação farmacológica e menos tóxicos para os indivíduos. Isso pode ser alcançado através da

identificação de novos veículos para solubilização ou carreamento das drogas, de modo que sejam capazes de atingir seletivamente as células do tecido neoplásico, porém, sem causar tantos danos as células dos tecidos normais (LIANG *et al.*, 2010; JABIR *et al.*, 2012).

1.5. NANOMEDICINA

A categoria de tecnologia que se dedica ao emprego, produção e análise de materiais no tamanho nanométrico é conhecida como nanotecnologia. A nanotecnologia, associada a outros conceitos de estruturas e materiais, se tornou fonte de grande interesse para o meio científico, com o auxílio do desenvolvimento tecnológico. Com isso, a nanomedicina se associa a nanotecnologia na busca por novas terapias e para aprimoramento dos procedimentos terapêuticos já existentes (CANCINO *et al.*, 2014).

Os sistemas de administração de fármacos, do inglês “drug delivery systems” (DDS), baseados na nanotecnologia apresentam características farmacocinéticas melhoradas. Entre eles é possível citar elevada taxa de depuração, distribuição de grande volume de fármacos e elevada biodisponibilidade de fármacos no tumor, devido ao maior efeito de permeabilidade e retenção (EPR). Além disso, métodos baseados na nanomedicina podem transportar drogas através de barreiras biológicas (CHENG *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, tem sido crescente pesquisas com a abordagem da terapia dirigida ou direcionada, a qual abrange o desenvolvimento de fármacos confinados em escala nano. As formulações de nanocarreadores mais pesquisadas são emulsões, dendrímeros, micelas, lipossomas e polímeros. Os nanoprodutos poliméricos podem ser divididos em diferentes sistemas, incluindo nanoesferas, nanocápsulas, nanopartículas e nanofibras (LETCHFORD & BURT, 2007).

Inúmeros são os benefícios de se utilizar nanopartículas poliméricas (PNP), tais como: administração direcionada da droga, biodisponibilidade melhorada, diminuição dos efeitos colaterais dos medicamentos, proteção da droga contra degradação, melhoria da solubilidade da droga e liberação sustentada do fármaco. Isso tudo torna seu uso no diagnóstico e tratamento de doenças do SNC bastante vantajoso (ZHANG *et al.*, 2014).

Quanto ao direcionamento do agente terapêutico, pode ser realizado de forma passiva ou ativa (Figura 13). A forma passiva consiste no direcionamento dessas nanopartículas (NP) em dimensões reduzidas de modo que o fármaco seja entregue preferencialmente no local onde o tumor se encontra, caracterizado por distribuição sistêmica e acúmulo deste nos locais afetados, tendo como base uma maior permeabilidade e retenção. O direcionamento ativo, por outro lado, envolve a conjugação das NP com ligantes que são específicos à certos tipos de

células tumorais permitindo que as NP distribuam o fármaco apenas nestas células e não atinjam o restante das células normais do organismo (GROBMYER *et al.*, 2011).

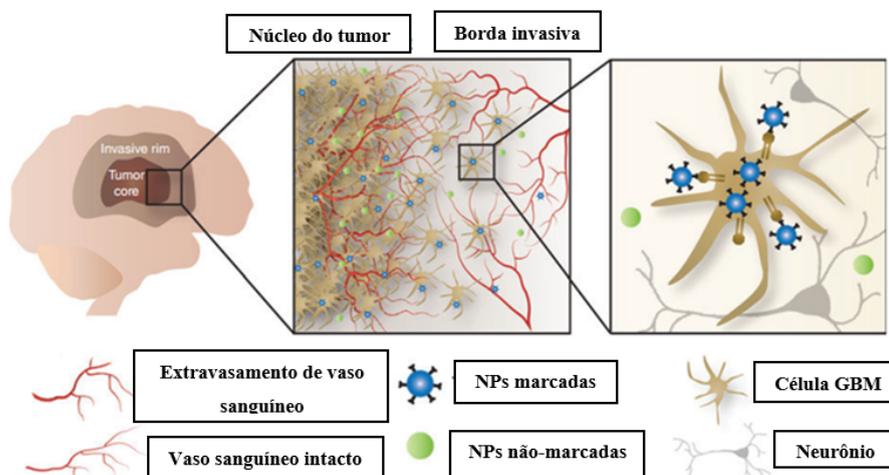


Figura 13: Em um esforço para superar as barreiras ao tratamento do glioblastoma (GBM), nanoterapêuticos projetados para direcionamento tumoral passivo ou ativo surgiram como uma abordagem promissora. Fonte: Adaptado de Tumor-targeted nanotherapeutics: overcoming treatment barriers for glioblastoma. Wadajkar *et al.*, 2017.

Deste modo, se torna possível a aplicação de terapias seletivas reduzindo os efeitos secundários dos compostos antitumorais. Esse perfil de toxicidade reduzida, juntamente com a capacidade dessas estruturas de ultrapassar a BHE, faz com que as NP sejam uma estratégia viável para terapias destinadas aos tumores cerebrais malignos.

1.5.1. Nanoemulsão LDE

As nanoemulsões (NE) são sistemas heterógenos, termodinamicamente instáveis, constituídos por gotículas de tamanhos nanométricos, podendo ser do tipo óleo-em-água (O/A) ou água-em-óleo (A/O). As NE O/A apresentam-se como uma opção promissora de veiculação de fármacos lipofílicos, protegendo-os de degradação enzimática, modulando a liberação e aumentando a biodisponibilidade. As NE podem ser produzidas por diferentes métodos: usando um lipídio, um tensoativo, um cotensoativo e água (BONFERONI *et al.*, 2019; BAHADUR *et al.*, 2020).

Neste sentido, a conjugação com alguns elementos demonstrou aperfeiçoar ainda mais a atividade citotóxica e de captação celular das formulações de nanocarreadores lipídicos quando comparados com as formulações sem modificações, principalmente naquelas contendo colesterol em sua composição, estando possivelmente relacionado a

biocompatibilidade que o colesterol possui quando comparado aos demais adjuvantes e agentes emulsificantes. Além disso, esse achado também pode ser devido ao fato de alguns cânceres super expressarem determinados receptores em sua superfície celular, como é o caso dos receptores de folato e de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (KRETZER, MARIA & MARANHÃO, 2012; O'SHANNESY *et al.*, 2012; CONTENTE *et al.*, 2014;), aumentando assim, a demanda e captação de nanopartículas que contenham em sua estrutura estes elementos. Ainda neste campo, outro aspecto que poderia estar por trás dos mecanismos que favorecem o uso de alguns tipos de nanocarreadores lipídicos se dá devido ao mimetismo molecular que alguns desses sistemas apresentam com receptores celulares de LDL, favorecendo a interação celular e os processos de internalização destas nanopartículas, e colaborando para um melhor direcionamento e seletividade dos quimioterápicos (PIRES, HEGG, FREITAS *et al.*, 2012).

Hungria *et al.* (2004) desenvolveram um modelo eficaz de entrega de drogas através do uso de uma nanopartícula lipídica artificial (LDE) de estrutura semelhante à do LDL (Figura 14), a qual seria capaz de se ligar aos receptores de LDL presentes nos tecidos tumorais malignos após injeção endovenosa em modelos experimentais.

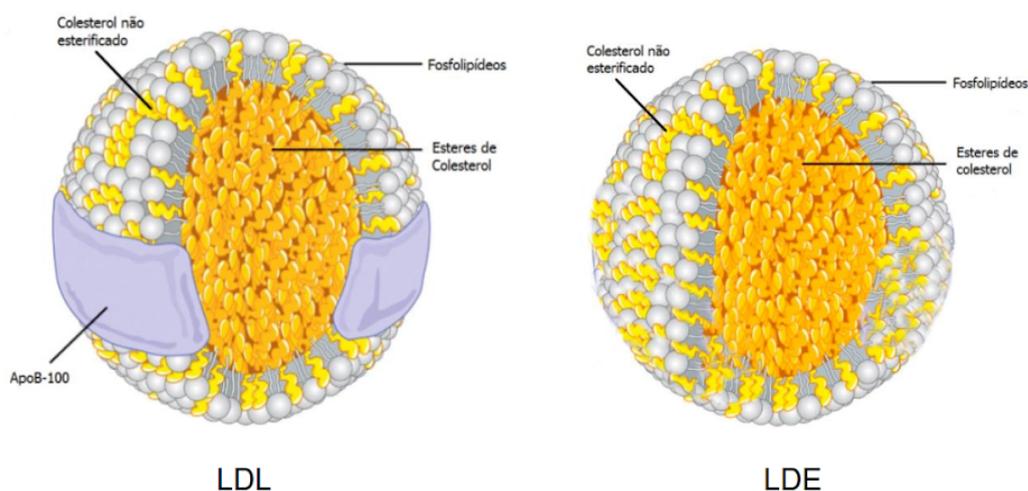


Figura 14: Estrutura da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e da nanoemulsão (LDE) de estrutura semelhante. Fonte: Spatti, 2016.

Ressalta-se dessa forma, a importância na condução de estudos pré-clínicos de alto rigor metodológico que envolvam triagens *in vitro* de atividade antitumoral e potencial de toxicidade, seguidos de estudos completos de segurança e eficácia antitumoral em modelos *in vivo*, e também a importância da realização de revisões da literatura sobre tecnologias no tratamento de condições de relevância mundial em termos de saúde pública com o propósito

de estabelecer um cenário dos resultados obtidos com o uso de tais tecnologias, de forma que se possa sintetizar as vantagens e desvantagens dessas abordagens como ferramentas terapêuticas e servir como instrumento para tomada de decisões clínicas e econômicas em termos de direcionamento de recursos, tanto nos setores públicos como nos setores privados, auxiliando assim nas avaliações dos benefícios dessas plataformas terapêuticas.

1.6. TRATAMENTO CONVENCIONAL DE TUMORES CEREBRAIS *VERSUS* TRATAMENTO COM USO DE NANOSSISTEMAS

Como método convencional mais utilizado temos a máxima ressecção cirúrgica da massa tumoral. Quando a ressecção total não é possível, a radioterapia em conjunto com a ressecção parcial tem sido utilizada. A terapia de radiação induz danos severos no ácido desoxirribonucleico (ADN), resultando em apoptose devido à quebra da dupla hélice. A terapia convencional consiste na aplicação de um feixe de radiação externo cinco vezes por semana, durante seis semanas. E além deste modelo, algumas técnicas de radiocirurgia são utilizadas para aumentar a eficácia da radioterapia em doentes que apresentam recorrência de GBM. A terapia com Gamma Knife, por exemplo, permite usar doses elevadas de radiação estereotáxicas que confinam o tratamento à área do glioblastoma, sendo esta técnica considerada ineficaz para o tratamento de tumores primários devido ao grande volume tumoral (CARLSON *et al.*, 2014; JNAIDI *et al.*, 2020).

A quimioterapia convencional atual para tratamento de glioblastoma multiforme é a temozolida. Quando combinada com a radioterapia, aumenta a expectativa média de vida em cerca de 26,5%, durante o primeiro ano, apresentando uma melhora em relação aos 10,4%, de quando é utilizada apenas radioterapia. A temozolida é um agente alcalino que metila as purinas no ADN e induz apoptose. A desvantagem do uso da temozolida é o risco significativo para as células saudáveis. Este risco combinado com a possível resistência das células cancerígenas à temozolida indica que existe a necessidade de se encontrar quimioterapia adicional para melhorar o tratamento (CARLSON *et al.*, 2014; JNAIDI *et al.*, 2020).

Uma das abordagens mais promissoras nesse sentido, é justamente a utilização de nanossistemas lipídicos. Estes nanossistemas, permitem um melhor direcionamento dos fármacos em direção às células tumorais, permitindo assim, que se ultrapasse os fatores de resistência citados anteriormente para o tratamento adequado do GBM. Assim se faz

necessário priorizar estudos que visem garantir uma nova abordagem de tratamento, para que seja possível aumentar a expectativa média de vida das pessoas que desenvolvem este tipo tumoral (CARLSON *et al.*, 2014; VIEIRA & GAMARRA, 2016).

Estudos com modelos animais, incluindo primatas não humanos seguidos de ensaios com pacientes apresentando câncer em estado avançado, utilizando distintos agentes antineoplásicos, dentre estes o PTX, demonstraram toxicidade reduzida quando transportados com LDE, preservando desta forma a ação farmacológica desta associação (DIAS *et al.*, 2007; PIRES *et al.*, 2009; MARANHÃO *et al.*, 2002; FEIO *et al.*, 2017).

Na literatura, ainda são escassos ensaios que descrevam este tipo de abordagem, bem como, a análise e descrição dos mecanismos farmacológicos e tóxicos advindos do tratamento de GBM com o conjugado LDE/PTX e a sua eficácia para tumores cerebrais. E como já mencionado previamente, os estudos *in vitro* são primordiais como etapa inicial para os ensaios de análise de toxicidade e a busca de potenciais compostos com capacidade antitumoral, possibilitando deste modo, o estabelecimento de uma relação entre a concentração destes compostos e a resposta celular, despertando a possibilidade de novos alvos moleculares para o tratamento do câncer (CARVALHO *et al.*, 2014).

Sendo assim, o presente projeto de pesquisa se propõe a realizar as análises desses fármacos, expondo as células C6 (modelo de glioblastoma de rato), de modo a verificar a atividade do PTX em sua formulação comercial e compará-la quando na forma conjugada LDE/PTX. Deste modo, seria possível ter uma maior compreensão de como essas células tumorais respondem aos tratamentos em termos de proliferação e morte celular, contribuindo assim, na busca por novas estratégias de tratamento e ampliando a eficácia do quimioterápico PTX sobre as células neoplásicas de gliomas malignos como o GBM.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos *in vitro* do fármaco Paclitaxel (PTX) em sua formulação comercial (Taxol ®) e na forma de nanoemulsão (conjugado LDE/PTX) sobre a linhagem celular C6 de glioblastoma de rato, de modo a verificar o potencial antitumoral e a eficácia terapêutica destes compostos no tratamento de glioblastomas.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Quantificar a viabilidade celular após a exposição ao PTX e ao conjugado LDE/PTX sobre a cultura celular de C6 nos intervalos de tempo de 24h, 48h e 72h nas concentrações de 0,01; 0,1; 1 e 10 μM .
- b) Avaliar a citotoxicidade após a exposição ao PTX e ao conjugado LDE/PTX sobre a cultura celular de C6 nos intervalos de tempo de 24h, 48h e 72h nas concentrações de 0,01; 0,1; 1 e 10 μM .
- c) Verificar a porcentagem de células que entraram em apoptose após a exposição ao PTX e ao conjugado LDE/PTX sobre a cultura celular de C6 nos intervalos de tempo de 24h, 48h e 72h nas concentrações de 0,01; 0,1; 1 e 10 μM .
- d) Comparar os dados obtidos entre as culturas tratadas com PTX e o conjugado LDE/PTX com as do grupo controle (sem tratamento), de modo a verificar qual apresentou maior potencial antitumoral e eficácia terapêutica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenções da Linhagem C6, PTX e conjugado LDE/PTX

Neste estudo, utilizamos a linhagem celular C6 de glioblastoma de rato. Esta linhagem foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e encontra-se disponível no banco de células do Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética da Seção de Meio Ambiente do Instituto Evandro Chagas (LCTC/SAMAM/IEC), local onde os experimentos foram realizados.

O fármaco PTX e seu conjugado LDE/PTX foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Raul Maranhão, do Laboratório de Metabolismo de Lipídios do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor/FMUSP).

3.2. Preparo do LDE e do Conjugado LDE/PTX

O composto foi preparado a partir de uma bateria de soluções contendo lipídios constituintes do LDE dissolvidos em clorofórmio e metanol, no qual foram adicionados também fosfolipídios, ésteres de colesterol e colesterol livre, sendo que esta composição está sujeita a modificações para fins terapêuticos. Em seguida, o material passou por um processo de emulsificação e purificação, sendo o tamanho das partículas monitorado por dispersão de feixe de laser. Então, a preparação foi centrifugada, filtrada em membrana 0,22 μm para esterilização e, por fim, armazenada em tubos estéreis e apirogênicos a 4 °C (MARANHÃO *et al.*, 1993). A partir de alíquotas de uma solução estoque na concentração de 4,7 mg/mL, tanto o PTX quanto o LDE/PTX passaram por etapa de diluição seriada de modo a se obter as concentrações de 0,01; 0,1; 1 e 10 μM .

3.3. Cultura de células

Todas as amostras foram cultivadas sob a temperatura de 37°C, com 5% de CO₂. Para manutenção dos cultivos, utilizamos o meio de cultivo DMEM suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (SBF), penicilina 50 U/mL, estreptomicina 50 $\mu\text{g/mL}$ e anfotericina B 2 $\mu\text{g/mL}$.

Os cultivos foram feitos em frascos de 25 cm². O acompanhamento do crescimento foi realizado através de observação sob microscópio óptico de inversão (ZEISS, modelo Axiovert 40C) a cada 48h. Quando necessário, as células foram repicadas em meio de cultura novo, na concentração aproximada de 0,5-1,0 x 10⁶ cél/mL. Para o desprendimento das células aderidas, utilizamos solução de tripsina-EDTA 0,5% (Gibco).

Para fins experimentais, as células da linhagem C6 foram plaqueadas em microplacas de 96 poços nos tempos de 24, 48 e 72h, de acordo com o ensaio biológico, e nas concentrações expressas anteriormente. Após o plaqueamento, as células permaneceram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO₂.

3.4. Ensaio de viabilidade, citotoxicidade e apoptose

A fim de avaliar o efeito dos tratamentos com PTX e LDE/PTX sobre o crescimento celular, cerca de 1×10^6 células foram plaqueadas em microplacas de 96 poços. Essas células foram expostas a concentrações de 0,01; 0,1; 1 e 10 μM das drogas em análise. Células incubadas apenas com meio de cultivo DMEM foram usadas como controle. Os tempos de incubação correspondem a 24h, 48h e 72h. Após os tempos de exposição, foi utilizado o kit ApoTox-Glo™ Triplex Assay (Promega Corporation) seguindo as instruções do fabricante para as respectivas análises de viabilidade, citotoxicidade e apoptose. A partir destes ensaios foram feitas as análises gráficas para avaliação da ação dos compostos PTX e LDE/PTX nas concentrações previamente descritas quando comparadas aos seus respectivos controles.

A primeira parte do ensaio, mede simultaneamente duas atividades de proteases, sendo um marcador de viabilidade celular e o outro um marcador de citotoxicidade. A atividade da protease de células vivas é restrita a células viáveis intactas e é medida usando um substrato peptídico fluorogênico e permeável às células (GF-AFC). O substrato entra nas células intactas onde é clivado pela atividade da protease da célula viva para gerar um sinal fluorescente proporcional ao número de células vivas. Esta protease de células vivas torna-se inativa após a perda da integridade da membrana celular e vazamento para o meio de cultura circundante. Um segundo substrato peptídico impermeável à célula fluorogênica (bis-AAF-R110) é usado para medir a atividade da protease de células mortas, que é liberada de células que perderam a integridade da membrana. Como o bis-AAF-R110 não é permeável às células, essencialmente nenhum sinal deste substrato é gerado por células viáveis intactas. As proteases de células vivas e de células mortas produzem diferentes produtos, AFC e R110, que possuem diferentes espectros de excitação e emissão, permitindo que sejam detectados simultaneamente na leitura em equipamento espectrofotométrico (PROMEGA BIOTECNOLOGIA DO BRASIL, 2020).

A segunda parte do ensaio utiliza um substrato luminogênico de caspase-3/7, que contém a sequência tetrapeptídica DEVD, em um reagente otimizado para atividade de caspase, atividade de luciferase e lise celular. A adição do Reagente Caspase-Glo® 3/7 em um formato “add-mix-measure” resulta em lise celular, seguida de clivagem de caspase do substrato e geração de um sinal luminescente “tipo brilho” produzido pela luciferase. A luminescência é proporcional à quantidade de atividade de caspase presente (figura 10). O ensaio de atividade da caspase foi projetado para uso em formatos de placas de múltiplos poços usando enzima purificada ou células em cultura e pode ser multiplexado com outros ensaios baseados em células (PROMEGA BIOTECNOLOGIA DO BRASIL, 2020).

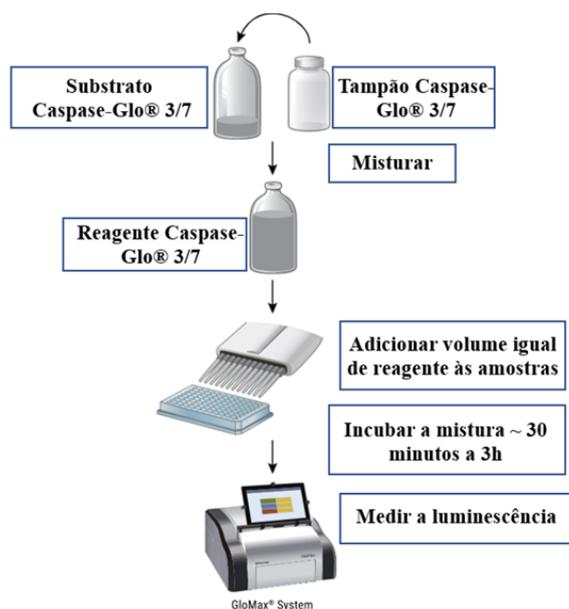


Figura 10: Protocolo para avaliação de apoptose com o kit Caspase-Glo® 3/7 da Promega. Adaptado de https://www.promega.com.br/products/cell-health-assays/apoptosis-assays/caspase_glo-3_7-assay_system/?catNum=G8090.

3.5. Análise estatística

Os resultados obtidos após os tratamentos com PTX e LDE/PTX foram expressos como média \pm desvio padrão e analisados por ANOVA utilizando o software Graphpad Prisma 7.00, sendo os dados de citotoxicidade expressos em termos de uma via e os demais de duas vias, seguido pelo teste pos hoc de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Viabilidade

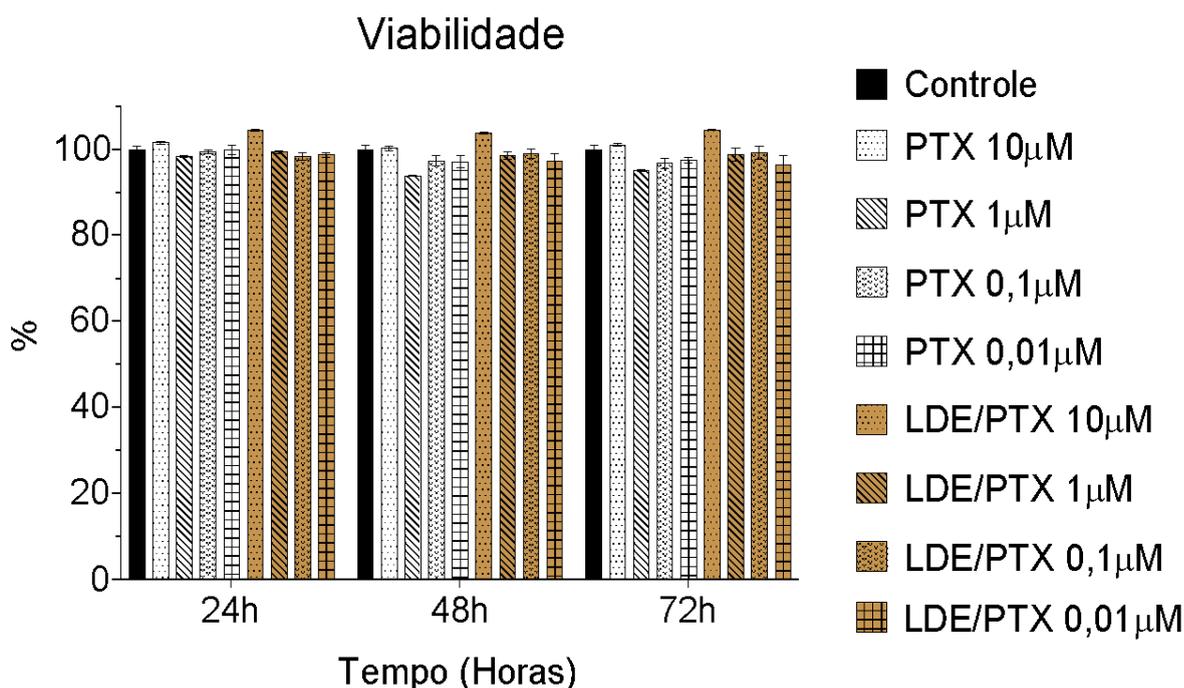


Figura 11: Viabilidade celular dada em porcentagem e em função das horas de experimentação (24h, 48h e 72h). Os grupos tratados correspondem ao PTX e ao LDE/PTX nas seguintes concentrações: 0,01 μ M; 0,1 μ M; 1 μ M e 10 μ M.

O PTX 10 μ M e 1 μ M no tempo de 24h mostrou alteração significativa quando comparado ao controle, porém com valores bem próximos, o que pode ser melhor observado na (tabela 3) ao observarmos em termos dos dados de log. Visualmente neste gráfico podemos observar que o PTX 10 μ M está um pouco mais alto que o controle, significando que nesta concentração e neste tempo em específico a droga não afetou de forma drástica a viabilidade celular, no entanto na concentração de 1 μ M já observamos um decaimento discreto na porcentagem de células viáveis quando comparadas ao controle não exposto, que se acentua após o tempo de 24h. Já nas concentrações de 0,1 μ M e 0,01 μ M não observamos diferença estatística significativa (vide tabela 3) quando comparado ao controle no tempo de 24h, e confirmamos isto pelo gráfico já que ambos estão bem próximos do valor de 100% de células viáveis dado pelo controle.

Nos tempos de exposição de 48h e 72h do PTX, observamos que não houve diferença significativa quando comparado ao controle na concentração de 10 μ M sobre a viabilidade celular, no entanto, nas concentrações de 1 μ M, 0,1 μ M e 0,01 μ M observamos um

decaimento na porcentagem de células viáveis quando comparadas ao controle, sendo mais significativo na concentração de 1 μM .

Em termos do conjugado LDE/PTX, observamos que na concentração de 10 μM e no tempo de 24h, a porcentagem de células viáveis se mostrou um pouco maior que 100% quando comparada tanto com o controle, quanto com o PTX na mesma concentração e no mesmo tempo de exposição, sendo estatisticamente significativa (vide tabela 3) em ambos os casos. Na concentração de 1 μM no mesmo intervalo de tempo descrito anteriormente, não se observa modificação significativa na porcentagem de células tanto quando comparado ao controle, quanto em relação ao PTX na mesma concentração e no mesmo intervalo de tempo.

Para a concentração de 0,1 μM de LDE/PTX no intervalo de 24h, visualizamos que essa se localiza um pouco inferior quando comparada ao controle graficamente, e esta alteração se mostrou significativa quando analisado o log por meio da ANOVA (dados expressos na tabela 3 abaixo), porém não se mostrou significativo quando comparado apenas com o PTX na mesma concentração e no mesmo intervalo de tempo. A menor concentração de 0,01 μM também não demonstra alteração significativa em termos de viabilidade quando comparada ao controle e ao PTX na mesma concentração no tempo de 24h.

Tabela 3: Dados de viabilidade provenientes da ANOVA expressos em LOG para PTX e LDE/PTX nas concentrações de 0,01 μM ; 0,1 μM ; 1 μM e 10 μM , nos tempos de exposição de 24h, 48h e 72h, comparados ao controle com meio DMEM, nos respectivos tempos. Letras diferentes na mesma linha representam que houve diferença estatística significativa calculada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

	CONTROLE	PTX (log)				LDE/PTX (log)			
		10 μM	1 μM	0,1 μM	0,01 μM	10 μM	1 μM	0,1 μM	0,01 μM
24H	5,5 \pm 0,05ae	5,6 \pm 0,02b	5,4 \pm 0,02c	5,5 \pm 0,02ac	5,5 \pm 0,06a	5,7 \pm 0,01d	5,5 \pm 0,02ec	5,4 \pm 0,05c	5,4 \pm 0,03ac
48H	5,4 \pm 0,07af	5,4 \pm 0,03a	5,0 \pm 0,01b	5,2 \pm 0,07c	5,2 \pm 0,08d	5,6 \pm 0,01e	5,3 \pm 0,05fc	5,3 \pm 0,06a	5,2 \pm 0,09cd
72H	5,4 \pm 0,07af	5,4 \pm 0,02a	5,1 \pm 0,02b	5,2 \pm 0,06c	5,2 \pm 0,04c	5,6 \pm 0,01e	5,3 \pm 0,08f	5,3 \pm 0,08f	5,2 \pm 0,11bc

Analisando a viabilidade no intervalo de 48h, na concentração de 10 μM observamos que o PTX ficou praticamente na mesma linha do controle, ou seja, próximo do valor de 100% de células viáveis, no entanto, em relação ao conjugado LDE/PTX na mesma concentração e no mesmo intervalo de tempo, verificamos que a porcentagem de células viáveis é maior que os 100% observados no controle não exposto. Essa diferença foi considerada estatisticamente significativa (tabela 3 acima), tanto quando comparada em termos do controle, quanto em relação ao tratamento somente com o PTX.

Para a concentração de 1 μM no intervalo de 48h, verificamos que com o tratamento apenas com PTX, a viabilidade ficou em torno de 90% quando comparada ao controle com 100% de células. Já o conjugado LDE/PTX nesta mesma concentração e intervalo de tempo

se mostrou bem próximo do valor de 100% do controle. Estes dados são confirmados pela tabela 3, aonde o PTX expressa diferença estatística significativa quando comparado ao controle, expresso pelo $\log 5,00 \pm 0,01b$, enquanto o controle é dado por $5,4 \pm 0,07$ af. Enquanto isso, para o conjugado LDE/PTX temos o $\log 5,3 \pm 0,05$ fc, se assemelhando, portanto, ao controle, confirmando o que vimos no gráfico na figura 11.

Verificamos para a concentração de $0,1 \mu\text{M}$ no tempo de 48h, que o tratamento com PTX demonstra estar abaixo do controle, com viabilidade reduzida em cerca de 5%. Enquanto que o tratamento com LDE/PTX se manteve semelhante ao controle, tendo pouca ação sobre as células viáveis, apresentando algo aproximado a 99% de células vivas mesmo após a exposição no referido intervalo de tempo. Estes dados se confirmam quando se analisa a tabela 3 e vemos que o log do PTX é dado por log de $5,2 \pm 0,07$ c, enquanto que o controle se deu em log de $5,4 \pm 0,07$ af. Esta presença de letras diferentes entre eles, demonstra que foi significativo estatisticamente. Já o conjugado LDE/PTX expressou log de $5,3 \pm 0,06$ a. Esses dados corroboram com a semelhança do tratamento com o conjugado em relação ao controle e expressa também a diferença significativa quando comparado com o tratamento apenas com PTX.

Em relação a menor concentração, de $0,01 \mu\text{M}$ dos grupos tratados no intervalo de 48h, observamos que tanto o PTX quando o LDE/PTX provocaram discreta redução na porcentagem de células viáveis quando comparadas ao controle (figura 11), as quais foram estatisticamente significativas nesse caso, já que o log do controle é dado por $5,4 \pm 0,07$ af, enquanto que para o PTX verificamos o log em $5,2 \pm 0,08$ d e para o LDE/PTX temos o log em $5,2 \pm 0,09$ cd, o que evidencia que apesar de ambos serem diferentes do controle, são estatisticamente semelhantes entre si (representado pela letra d). Além disso podemos afirmar a partir destes valores que o LDE/PTX na concentração de $0,01 \mu\text{M}$ é semelhante estatisticamente ao PTX na concentração de $0,1 \mu\text{M}$ ($\log 5,2 \pm 0,07$ c), pois letras iguais indicam que não há diferença entre os valores observados.

No tempo de exposição de 72h, tivemos resultados condizentes com o que foi observado e descrito no tempo de exposição de 48h. Para o PTX a $10 \mu\text{M}$ temos que não há diferença significativa quando comparado ao controle, o que é visto tanto na figura 11 quanto na tabela 3 a partir dos dados expressos. O conjugado LDE/PTX mais uma vez se mostra acima dos 100% de células viáveis comparado ao controle sem exposição, diferença essa considerada significativa expressa também em termos do log. Para o LDE/PTX nesta concentração o log foi de $5,6 \pm 0,01$ e, valor idêntico ao que foi visto no tempo de exposição

de 48h, se diferenciando, portanto, apenas do controle que foi de $5,4 \pm 0,07$ af, onde as letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

Para as concentrações de $1 \mu\text{M}$ e $0,1 \mu\text{M}$ no tempo de 72h, também verificamos resultados que corroboram o que foi descrito para o tempo de exposição de 48h. Novamente o PTX demonstrou redução sobre a viabilidade celular em torno de 5% quando comparadas ao controle. O LDE/PTX mais uma vez mostrou pouca alteração sobre a viabilidade quando comparada ao controle, apresentando valores próximos ao 100%. No caso apenas o PTX se mostrou diferente estatisticamente do controle, enquanto que o LDE/PTX se mostrou semelhante, conforme pode ser verificado na tabela 3.

Com relação à menor concentração, de $0,01 \mu\text{M}$ tanto PTX quanto LDE/PTX atuaram reduzindo a viabilidade de maneira semelhante, algo entre 5% - 6%, diferindo de modo significativo apenas quando comparado ao controle (tabela 3 e figura 11).

4.2. Citotoxicidade

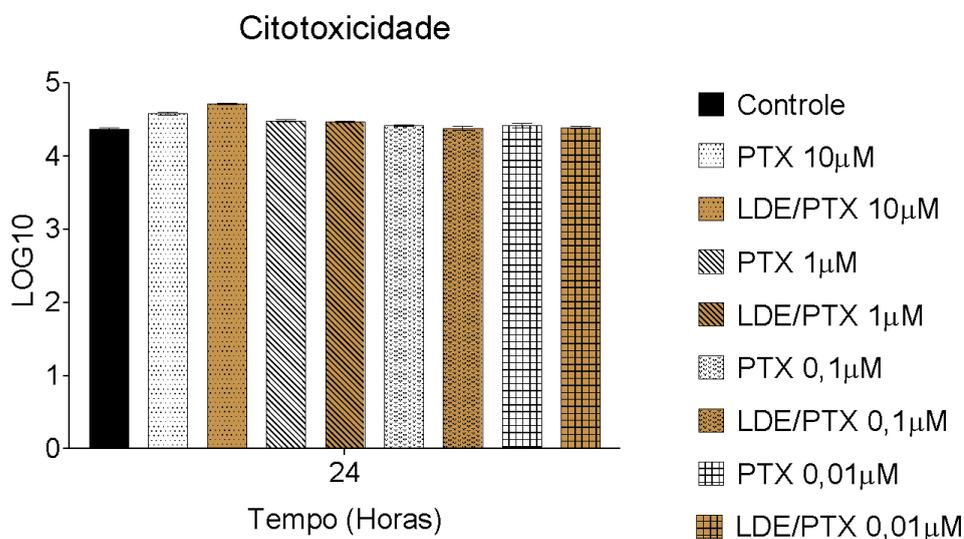


Figura 12: Citotoxicidade expressa em log na base 10, para o tempo de 24h de exposição aos tratamentos com PTX e LDE/PTX nas concentrações de $0,01 \mu\text{M}$; $0,1 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$ e $10 \mu\text{M}$, comparados ao controle não exposto, contendo apenas meio DMEM + células.

Tabela 4: Dados de citotoxicidade provenientes da ANOVA expressos em LOG para PTX e LDE/PTX nas concentrações de $0,01 \mu\text{M}$; $0,1 \mu\text{M}$; $1 \mu\text{M}$ e $10 \mu\text{M}$, nos tempos de exposição de 24h, 48h e 72h, comparados ao controle com meio DMEM, nos respectivos tempos. Letras diferentes na mesma linha representam que houve diferença estatística significativa calculada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

	CONTROLE	PTX (log)				LDE/PTX (log)			
		10µM	1 µM	0,1 µM	0,01 µM	10µM	1 µM	0,1 µM	0,01 µM
24H	4,4±0,02a	4,5±0,02b	4,5±0,02bc	4,4±0,01d	4,4±0,03e	4,7±0,01f	4,4±0,01c	4,3±0,02a	4,3±0,02ade
48H	4,2±0,02ab	4,2±0,03b	4,0±0,01c	4,2±0,02a	4,2±0,05a	4,4±0,01d	4,2±0,04a	4,2±0,03a	4,2±0,05a
72H	4,2±0,04abf	4,2±0,03b	4,1±0,02c	4,2±0,05ab	4,2±0,03ab	4,5±0,01e	4,2±0,04abf	4,3±0,06ab	4,2±0,11f

Analisando os dados expressos na figura 12 e na tabela 4 acima, com relação ao tempo de exposição de 24h, temos que com relação ao PTX, em todas as concentrações pode-se verificar que houve alteração da citotoxicidade celular quando comparada ao controle ($\log 4,4 \pm 0,02a$) e apresentam diferença estatística significativa com relação ao mesmo. Dado que em ordem decrescente das concentrações (figura 12 e tabela 4), vemos que o log dos grupos tratados com PTX foi respectivamente, $4,5 \pm 0,02b$; $4,5 \pm 0,02 bc$ (indicando um pequeno aumento dessa citotoxicidade comparada ao controle nas concentrações de 10 μM e 1 μM) seguido de $4,4 \pm 0,01d$; $4,4 \pm 0,03e$ (nas concentrações de 0,1 μM e 0,01 μM), porém neste caso apesar dos valores próximos aos do controle, letras diferentes expressam diferença estatística das referidas concentrações em relação ao controle e também dentre todas as concentrações utilizadas, não havendo equivalência entre elas.

Para o LDE/PTX observamos que na concentração de 10 μM houve um maior aumento da citotoxicidade tanto comparada ao controle quanto com relação ao tratamento com PTX na mesma concentração, sendo mais elevada que ambos. Já a concentração de 1 μM de LDE/PTX teve valor de citotoxicidade próxima à de PTX no tempo de 24h, sendo ambas estatisticamente semelhantes e diferentes apenas quando comparas ao controle (figura 12 e tabela 4). Assim, é possível verificar que a concentração de 1 μM de LDE/PTX no tempo de 24h se assemelha estatisticamente à concentração de 1 μM do PTX isoladamente e ambas diferem do controle (tabela 4).

Nas menores concentrações de 0,1 μM e 0,01 μM de LDE/PTX não há diferença significativa quando comparado ao controle o que pode ser visualizado tanto graficamente (figura 12) quanto nos dados da tabela 4. Além disso, a concentração de 0,01 μM de LDE/PTX se assemelha às concentrações de 0,1 μM e 0,01 μM do PTX em termos de citotoxicidade no intervalo de tempo de 24h.

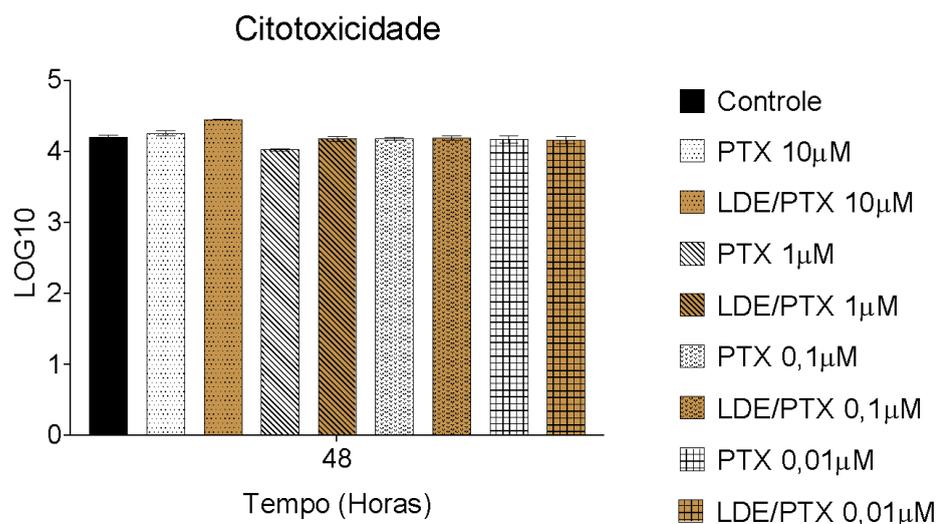


Figura 13: Citotoxicidade expressa em log na base 10, para o tempo de 48h de exposição aos tratamentos com PTX e LDE/PTX nas concentrações de 0,01 µM; 0,1 µM, 1µM e 10 µM, comparados ao controle não exposto, contendo apenas meio DMEM + células.

De acordo com o gráfico acima, para as análises da exposição após 48h, verificamos que a concentração de PTX 1 µM apresentou uma menor citotoxicidade quando comparada ao controle e as demais concentrações tanto de PTX quanto de LDE/PTX, o que é confirmado pelo valor do log de $4,0 \pm 0,01c$. A concentração de 10 µM por sua vez ($\log 4,2 \pm 0,03b$), se mostrou estatisticamente semelhante ao controle ($\log 4,2 \pm 0,02 ab$). As menores concentrações, tanto de 0,1 µM quanto a de 0,01 µM, se mostraram também estatisticamente semelhantes ao controle ($\log 4,2 \pm 0,02a$; $4,2 \pm 0,05a$, respectivamente), não demonstrando assim nem aumento e nem diminuição da citotoxicidade.

Com relação ao LDE/PTX, apenas a concentração de 10 µM ($\log 4,4 \pm 0,01d$) demonstrou aumento na citotoxicidade quando compara ao controle e ao PTX, apresentando diferença estatística significativa quando comparada ao controle ($\log 4,2 \pm 0,02ab$) e foi idêntica à concentração de 0,1 µM de PTX no tempo de 24h, sendo assim podemos inferir que mesmo a concentração mais alta de LDE/PTX, ainda é menos citotóxica quando comparada à uma concentração mais baixa de PTX, no intervalo de um dia de exposição. As demais concentrações não apresentaram diferença significativa entre si, tampouco com relação com ao controle.

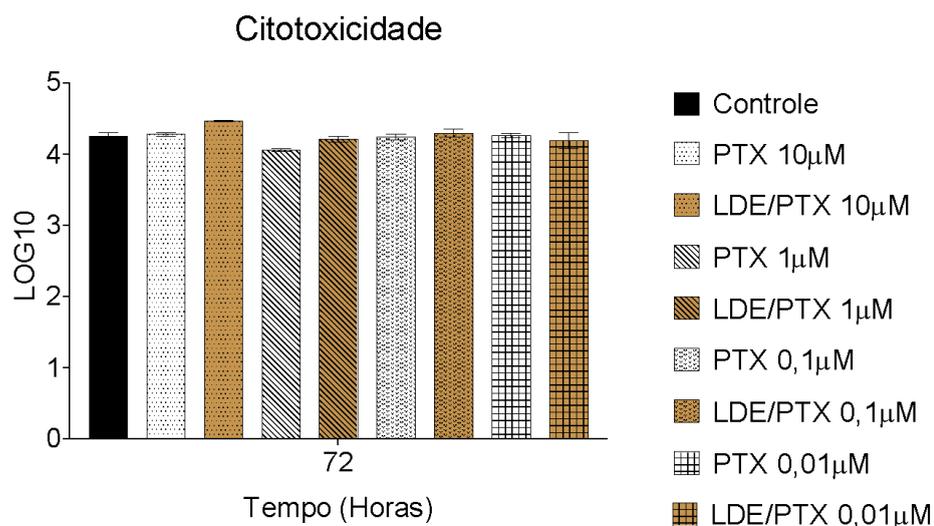


Figura 14: Citotoxicidade expressa em log na base 10, para o tempo de 72h de exposição aos tratamentos com PTX e LDE/PTX nas concentrações de 0,01 µM; 0,1 µM, 1µM e 10 µM, comparados ao controle não exposto, contendo apenas meio DMEM + células.

De forma semelhante ao que foi exposto acima, no tempo de 72h, também foi possível verificar que apenas a citotoxicidade na concentração de 1 µM de PTX foi mais baixa, apresentando diferença significativa quando comparada ao controle. A citotoxicidade nesta concentração foi dada pelo log de $4,1 \pm 0,02$, valor este que se assemelha estatisticamente ao que foi observado nos tempos anteriores de 24h e 48h (tabela 4) e também à concentração de 1 µM de LDE/PTX no intervalo de 24h após exposição. As demais concentrações se assemelham ao controle, não podendo assim afirmar que houve aumento ou diminuição da citotoxicidade em função da exposição ao PTX.

Mais uma vez a concentração de 10 µM de LDE/PTX foi a única a demonstrar citotoxicidade elevada em relação ao controle, como evidenciado na figura 14 e na tabela 4 (log $4,5 \pm 0,01$), sendo este valor estatisticamente semelhante ao encontrado na concentração de 0,01 µM de PTX no tempo de exposição de 24h, o que nos indica novamente que uma concentração baixa de PTX consegue ser mais tóxica que a máxima concentração utilizada para LDE/PTX.

4.3. Apoptose

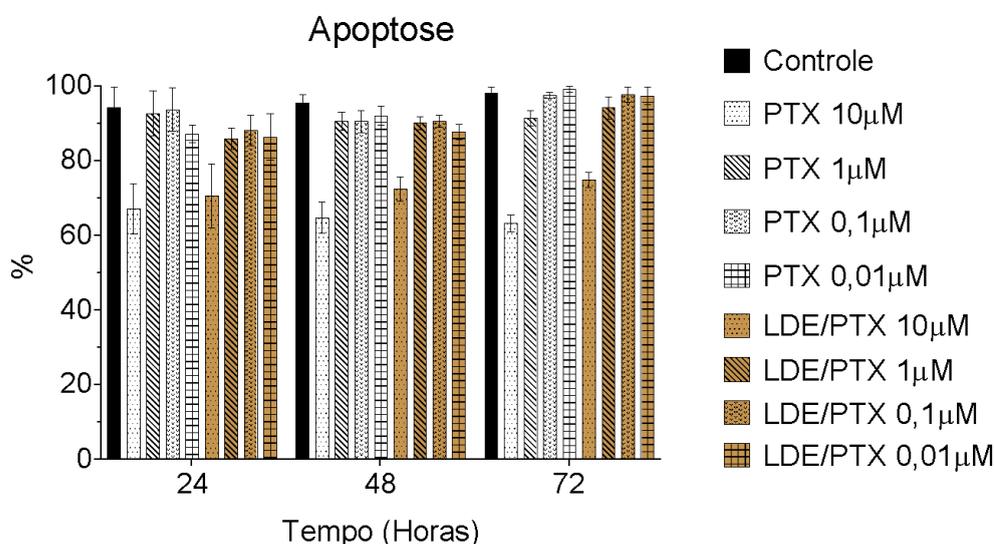


Figura 15. Apoptose celular medida através da análise das caspases 3 e 7, dada em porcentagem e em função das horas de experimentação (24h, 48h e 72h). Os grupos tratados correspondem ao PTX e ao LDE/PTX nas seguintes concentrações: 0,01 µM; 0,1 µM; 1 µM e 10 µM.

Em relação ao processo de morte celular induzido por apoptose, visualizamos que para os três tempos de exposição do PTX a 10 µM houve um elevado decréscimo na porcentagem de células vivas quando comparadas ao controle, uma redução em torno de 24%. Já com relação à concentração de 1 µM observamos que houve uma indução de porcentagem pequena de células entrando em apoptose (figura 15 acima), no entanto foi considerada estatisticamente semelhante ao controle (tabela 5 abaixo), o que se reproduziu em todos os três tempos observados.

Tabela 5: Dados de apoptose provenientes da ANOVA expressos em LOG para PTX e LDE/PTX nas concentrações de 0,01 µM; 0,1 µM; 1 µM e 10 µM, nos tempos de exposição de 24h, 48h e 72h, comparados ao controle com meio DMEM, nos respectivos tempos. Letras diferentes na mesma linha representam que houve diferença estatística significativa calculada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

	CONTROLE	PTX (log)				LDE/PTX (log)			
		10µM	1 µM	0,1 µM	0,01 µM	10µM	1 µM	0,1 µM	0,01 µM
24H	5,4±0,30a	4,0±0,54b	5,5±0,34acd	5,2±0,65ad	5,0±0,14e	4,1±0,49b	4,9±0,16ef	5,1±0,23ec	4,9±0,36ec
48H	5,2±0,13ad	3,9±0,98c	4,9±0,14ad	4,9±0,16ad	5,0±0,14d	3,9±0,18e	4,9±0,09ad	4,9±0,09ad	4,7±0,11d
72H	5,4±0,11ac	3,4±0,11b	4,9±0,11c	5,3±0,19ac	5,3±0,05a	4,3±0,85d	5,1±0,16ac	5,4±0,14ac	5,3±0,14ac

Para a concentração de 0,1 µM PTX houve igualmente um menor percentual (≈ 8 a 10%) de células entrando em apoptose no intervalo de 24h a 48h, seguida de um aumento no percentual de células viáveis (≈ 98 -99%) ao tempo final de observação dado por 72h (figura

15). Porém em todos estes tempos de exposição, este aumento e redução das células em apoptose se manteve estatisticamente semelhante ao observado para o controle, também sendo próximos ao observado na concentração de 1 μM PTX no intervalo de 24h a 48h (tabela 5). Já a concentração de 0,01 μM PTX mostrou um percentual um pouco maior de células entrando em apoptose nas primeiras 24h de tratamento (≈ 10 a 12 %) quando comparada à concentração de 0,1 μM e ao controle, e se estabilizando em valor bem próximo no tempo de 48h, demonstrando assim diferença estatística relevante comparada ao controle, enquanto que no tempo de 72h demonstra atuação sobre as células em apoptose semelhantes ao controle (tabela 5).

Analisando os dados obtidos para o LDE/PTX percebemos também um decréscimo significativo no percentual de células vivas na concentração de 10 μM nos tempos de 24h, 48h e 72h quando comparadas ao controle. Porém essa redução é mais drástica nas primeiras 24h do tratamento, algo em torno de 28% das células entrando no processo de apoptose. Apesar da diferença em relação ao controle, observamos que este percentual não é significativo quando comparado com o tratamento somente com PTX na mesma concentração de 10 μM , e no mesmo intervalo de tempo de 24h, como podemos observar na tabela 5, onde o log de PTX a 10 μM é dado por $4,0 \pm 0,54b$ e o de LDE/PTX é de $4,1 \pm 0,49 b$, sabendo-se que letras iguais representam que são semelhantes estatisticamente.

Observamos que diferente do PTX a 10 μM em que o percentual de células vivas se localiza abaixo dos 70% e se mantém assim para os três intervalos de exposição, no caso do LDE/PTX, variam de $\approx 70\%$ em 24h, para cerca de $\approx 72\%$ em 48h, até algo em torno de 78% de células vivas em 72h, o que demonstra que apesar das concentrações serem equivalentes, o PTX atua de forma mais drástica sobre as células vivas, causando maior processo apoptótico, do que quando as células são tratadas apenas com LDE/PTX. Fenômeno semelhante é observado para as menores concentrações de LDE/PTX, afetando a célula no primeiro intervalo de 24h com uma redução gradual da porcentagem de células vivas e um aumento do índice de apoptose nas concentrações de 1 μM e 0,1 μM , com recuperação celular a partir das menores concentrações de 1 μM , 0,1 μM e 0,01 μM no período de 48h, chegando até mesmo a se igualarem ao controle no tempo de 72h (figura 15 e tabela 5).

5. DISCUSSÃO

Para a grande maioria dos tumores cerebrais, é utilizado o tratamento convencional de ressecção cirúrgica seguida de radioterapia, sendo eficaz mesmo quando não é possível a retirada total, como no caso dos adenomas pituitários, meningiomas e gliomas de baixo grau, tipos I e II (ROGERS *et al.* 2015, MEHTA & LONSER, 2017; RUDÀ *et al.*, 2018; MAIR *et al.*, 2021). Porém, este prognóstico favorável não se enquadra para todos os tipos de tumores cerebrais. Este é o caso em particular dos gliomas de alto grau, tipos III e IV, o último sendo objeto do estudo em questão (o GBM), os quais exigem outros tipos de abordagens terapêuticas, bem como resultam em prognósticos desfavoráveis (CARLSON *et al.*, 2014; WESSELING *et al.*, 2015; RUDÀ *et al.*, 2018; HIRTZ & RECH, 2020).

Atualmente, o tratamento convencional do GBM consiste na máxima ressecção cirúrgica tumoral, a qual pode ser classificada em total bruta ou subtotal que é quando não é possível remover completamente a massa tumoral. Após isto, são feitos os ciclos de quimioterapia associados à radioterapia (CARLSON *et al.*, 2014; VIEIRA & GAMARRA, 2016). No entanto, para se obter êxito neste tipo de ressecção, se faz necessário ultrapassar algumas barreiras, relativas às especificidades de cada tumor, precisando atender critérios relativos a tamanho, forma e localização dos vasos sanguíneos, artérias ou regiões sensíveis do cérebro. Sendo assim, o aumento da sobrevivência do doente está diretamente correlacionado com a capacidade de remover a maior parte possível do tumor (CARLSON *et al.*, 2014; JNAIDI *et al.*, 2020).

O tratamento do GBM, portanto, é bastante difícil, pois este subtipo tumoral apresenta uma vasta diversidade, tanto inter quando intratumoral, favorecendo assim, com que subpopulações de células resistentes se proliferem e haja recorrência, mesmo após tratamento com agentes citotóxicos. Alguns fatores são preponderantes para determinação dessa heterogeneidade, tais quais: a origem celular do tumor, que a princípio se assume que provém de células da glia; alterações genéticas e epigenéticas causando uma elevada quantidade de mutações, boa parte dessas no gene *tp53* que codifica o supressor tumoral *p53*; alterações no gene responsável por codificar a neurofibromina, e elevados níveis de receptores de fator de crescimento epidérmico. Quanto às modificações intratumorais temos mutações a isocitrato desidrogenase e nos receptores de fatores de crescimento, dentre outras. Tendo tudo isto em vista, temos um cenário no qual um único fármaco quimioterápico é ineficaz para abarcar toda essa variedade de alterações possíveis, pois estes atingem muitas vezes apenas a camada externa da massa tumoral, enquanto que o núcleo da massa tumoral contém células inativas

em ambiente de hipóxia ácida que irão sobreviver ao tratamento quimioterápico, pois a maioria destes é dirigido para células em elevado estado de proliferação. Todos estes fatores revelam que o ideal seria a obtenção de um tratamento personalizado que conseguisse englobar essas questões (SILVA *et al.*, 2019; JNAIDI *et al.*, 2020).

Além de todos os fatores acima mencionados se configurarem como uma dificuldade para o tratamento eficaz do GBM, outro que podemos destacar, é a necessidade de se ultrapassar a BHE, a qual bloqueia boa parte dos fármacos de passarem para o SNC. Portanto precisamos investir no desenvolvimento de sistemas de transporte de fármacos que sejam eficientes para aumentar a concentração do fármaco na região cerebral, e consequentemente tratar o tumor de maneira mais eficaz. (CARLSON *et al.*, 2014; VIEIRA & GAMARRA, 2016).

Alguns medicamentos são utilizados como profiláticos para evitar, ou pelo menos diminuir, os efeitos adversos causados pela quimioterapia, como, por exemplo, os anti-inflamatórios esteroidais, antieméticos e anti-histamínicos (MCDONALD, CLARK, TCHOU *et al.*, 2016), sendo este o caso do PTX e do etoposide, que já vem sendo utilizados no tratamento do câncer de mama (SARTAJ, BABOOTA & ALI, 2020).

O PTX por sua vez, é um fármaco pertencente a classe dos taxanos, atuando diretamente na estabilização dos microtúbulos durante as fases de metáfase/anáfase levando a interrupção do ciclo celular e indução a morte celular. Por conta de sua estrutura, apresenta baixa solubilidade em meio aquoso necessitando de veículos para a sua solubilização e infusão, contribuindo para o surgimento de diversos efeitos adversos relacionados aos próprios veículos, como por exemplo reações de hipersensibilidade e neuropatia (BARKAT, BEG, POTTOO & AHMAD, 2019).

Nesse sentido, estudos vêm demonstrando alternativas para solucionar os efeitos tóxicos do PTX seja promovendo alterações em sua própria molécula ou através da utilização de outros solventes. Destacam-se entre estes, veículos de administração tanto por via intravenosa quanto oral, incluindo lipossomas, ciclodextrinas, micelas poliméricas, emulsões e nanopartículas (NP) (LUNDBERG, 2003; MUSTEATA & PAWLISZYN, 2006; YONCHEVA *et al.*, 2012; CALLEJA *et al.*, 2014; KIM & PARK, 2017).

Em nossos ensaios, observamos que PTX atua reduzindo a viabilidade celular nas concentrações de 1 μM , 0,1 μM e 0,01 μM após 48h, especialmente na concentração de 1 μM e que se assemelhou à LDE/PTX apenas na menor concentração de 0,01 μM . Na concentração de 10 μM , PTX atuou sobre a viabilidade celular de forma semelhante ao LDE/PTX, ambos expressaram inclusive valores até mesmo um pouco maiores que o controle nas primeiras 24h,

sendo que de 48h em diante, o PTX obteve índices mais próximos do controle, enquanto que o LDE/PTX exibiu porcentagem de células viáveis até mesmo mais elevadas do que o controle.

Comparando nossos dados, com os de SPATTI (2016), o qual serviu de modelo inicial para o desenvolvimento deste estudo, destacam-se o seguinte: tanto PTX quanto LDE/PTX atuam reduzindo a proliferação celular na concentração de 10 μM , no entanto em seus experimentos é registrado um pico de crescimento após 48h, seguido de uma posterior queda após 72h e se estendendo até 96h sendo que, seus valores quando comparados ao controle são bem inferiores. Porém convergimos no sentido que a 1 μM nos tempos de 24h à 72h, o LDE/PTX demonstrou maior quantidade de células viáveis do que o PTX.

Este resultado foi diferente do observado em nossos experimentos, já que como citado anteriormente, nesta concentração em específico a atuação de PTX e LDE/PTX sobre o índice de células viáveis foi pequena e até mesmo com valores próximos ao controle para PTX e maiores para LDE/PTX. Dito isto, podemos expressar alguns possíveis fatores para estas diferenças tais como, o tipo celular utilizado, em nosso caso utilizamos a linhagem C6 de glioblastoma de rato, enquanto que SPATTI (2016) utilizou GL261 que se trata de glioblastoma murino, além disso o meio de cultivo utilizado para nossas células foi o DMEM enquanto que o seu foi o R10, além da quantidade de células incubadas que em seu caso ficou em torno de 10^5 , enquanto utilizamos para nossos ensaios 10^6 de células, e o fator mais relevante que foi o método utilizado, no qual para suas análises foi utilizado o método do azul de tripan enquanto utilizamos o kit ApoTox-Glo™ Triplex Assay da Promega.

Em termos de citotoxicidade, analisando os dados expressos na figura 12 e na tabela 4 determinamos que o PTX no tempo de exposição de 24h, em todas as concentrações observadas teve influência significativa principalmente para a concentração de 10 μM , em seguida se estabilizando nos tempos seguintes de 48h e 72h e se aproximando do controle, o que corrobora com o que foi observado em nosso ensaio de viabilidade. Nos três tempos de tratamento apresentados, PTX foi menos citotóxico quando comparado ao LDE/PTX na concentração de 10 μM . PTX 1 μM por sua vez, apresentou maior citotoxicidade em relação ao controle nas primeiras 24h de exposição e menor citotoxicidade quando comparado ao controle nos tempos de 48h e 72h, sendo estatisticamente semelhante à concentração de 10 μM nos tempos descritos.

A partir de 48h apesar de o LDE/PTX demonstrar maior citotoxicidade quando comparada ao PTX, ainda assim, seus valores se mantêm próximos aos do controle, sendo estatisticamente considerados semelhantes. Nas concentrações menores de 0,1 μM e 0,01 μM

observamos que o PTX continua atuando sendo ligeiramente mais citotóxico do que o LDE/PTX no intervalo de 24h, e que depois entre 48h e 72h, ambos se estabilizam, com valores aproximados do controle.

Nesse sentido, nossos resultados de citotoxicidade são próximos ao de SPATTI (2016) para a concentração de 10 μM , o qual demonstram também que o conjugado de LDE/PTX é mais citotóxico do que o PTX, porém nas demais concentrações apresentaram resultados similares em termos de citotoxicidade. Diferenças entre as linhagens celulares utilizadas, podem justificar as variações nas observações experimentais.

Em relação ao processo de morte celular induzido por apoptose, visualizamos que para os três tempos de exposição do PTX a 10 μM houve um elevado número de células entrando em apoptose tanto quando comparada ao controle quanto em relação ao tratamento com LDE/PTX e que inclusive no caso da droga conjugada com a nanoemulsão citada, houve uma maior recuperação das células no tempo de 48h e principalmente no de 72h, o que indicaria fortemente que enquanto PTX continua a ser extremamente tóxico em todos os tempos observados, promovendo a rápida morte celular, o LDE/PTX por outro lado apesar de também promover um processo de morte celular considerável, com o passar do tempo este se estabiliza e dá espaço para que as células que continuaram viáveis no microambiente se proliferem novamente. Já no caso da concentração de 1 μM o LDE/PTX é quem atua mais sobre as células promovendo a apoptose nas primeiras 24h, porém novamente verificamos esse processo de estabilização, onde o percentual de células entrando em apoptose se aproxima dos valores de PTX e do controle, processo semelhante ocorrendo para as demais concentrações.

Neste estudo como parte do mecanismo de atuação do kit ApoTox-Glo™ Triplex Assay da Promega, um substrato peptídico fluorogênico, impermeável às células (substrato bis-AAF-R110) é usado simultaneamente para medir a atividade de protease de células mortas que foi liberada de células que perderam a integridade da membrana. Isso resulta em medidas ratiométricas e inversamente correlacionadas de viabilidade celular e citotoxicidade. A proporção de células viáveis para células mortas é independente do número de células e, portanto, pode ser usada para normalizar os dados (PROMEGA BIOTECNOLOGIA DO BRASIL, 2020). Processos de proliferação celular desregulada e morte celular por apoptose suprimida constituem suporte para a progressão neoplásica, comum a todos os tipos de câncer e ambos devem ser explorados para que se obtenha maiores conhecimentos sobre a terapêutica dos cânceres (BERTRAM, 2001; EVAN & VOUSDEN, 2001).

Ainda há muito o que ser estudado para que se conheça profundamente não só os mecanismos das vias sinalizadoras envolvidas na apoptose, mas também descoberta de novos genes relacionados à morte celular, bem como, mecanismos intrínsecos aos diferentes subtipos tumorais que fazem com que estes escapem aos tratamentos convencionais. Pesquisas básicas como essa são extremamente necessárias, principalmente se tratando de um tumor do SNC, com prognóstico desfavorável e ainda com uma gama muito ampla de questões para se abordar em termos de superar não só os mecanismos intrínsecos ao microambiente tumoral. Cada vez mais, também há necessidade de se compreender melhor os mecanismos de defesa do nosso próprio corpo, como o foco deste projeto que foi o de usar a nanotecnologia para superar também uma barreira física imposta pela BHE. O entendimento sobre aspectos morfológicos, bioquímicos, neurológicos e patológicos, são essenciais para se ter maior conhecimento sobre o que somos capazes de agregar em termos de novas terapias para o câncer cerebral, nesse caso em particular, o glioblastoma multiforme.

6. CONCLUSÃO

A diminuição da toxicidade dos fármacos associados à LDE deve-se ao fato de que há uma competição por esses receptores de LDL, apresentando uma maior afinidade com a nanopartícula artificial do que na sua forma natural do LDL presente na circulação. Deste modo a especificidade do fármaco carregado é aumentada, obtendo-se assim, maior êxito ao se deslocar para as células-alvo (MARANHÃO *et al.*, 1993; HIRATA *et al.*, 1999; HUNGRIA *et al.*, 2004). A eficácia desse composto nanométrico já foi demonstrada em estudos com grupos de pacientes que apresentavam doença coronária; carcinomas do ovário; câncer de mama e em outros tipos de carcinomas ginecológicos (ADES *et al.*, 2001; COUTO *et al.*, 2007; DIAS *et al.*, 2007; GRAZIANI *et al.*, 2002).

Acreditamos, portanto, que os resultados demonstrados corroboram a necessidade de fomento de mais iniciativas como esta, que tratem das vantagens e desvantagens do uso de nanocarreadores lipídicos, que podem ser utilizadas como ferramenta não só para o tratamento de tumores cerebrais como o glioblastoma, mas também para outros tipos de cânceres. Para que se transforme em aplicação prática na clínica e em modelos animais, é necessário que se esgote exaustivamente ensaios que demonstrem sua segurança, eficácia, e vantagens *in vitro* para que se possa posteriormente extrapolar para os modelos *in vivo*.

7. REFERÊNCIAS

ADES, A. et al. Uptake of a protein free lipid emulsion by normal and neoplastic ovarian tissue. **Gynecologic Oncology**, v. 82, n. 1, p. 84 – 87, 2001.

AFTAB, S.; SHAH, A.; NADHMAN, A. et al. Nanomedicine: An effective tool in cancer therapy, *Int J. Pharm.* 540, pp. 132–149, 2018. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.02.007.

AGNIHOTRI, S., BURRELL, K.E., WOLF, A., et al. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. **AITE**, v. 61, p. 25-41, 2013.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the cell**. 5th. New York: Garland science, Taylor & Francis Group, p.1725, 2008.

ALVES, P.M.G. Abordagem Terapêutica de Gliomas Cerebrais de Alto Grau. **Dissertação** (Mestrado em Medicina) – Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2014.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts & figures 2019**. Atlanta: American Cancer Society, 2019.

AMINABHAVI, T.M. & DESHMUKH, A.S. Polysaccharide-based hydrogels as biomaterials, In: *Polymeric Hydrogels as Smart Biomaterials*. **Springer**, pp. 45–71. 2016.

AMINABHAVI, T.; DHARUPANEEDI, S. & MORE, U. The role of nanotechnology and chitosan-based biomaterials for tissue engineering and therapeutic delivery. *Chitosan Based Biomater. Tissue Eng Therap.* 2, pp. 1–29. 2017.

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

BAHADUR, S. et al. Intranasal nanoemulsions for direct nose-to-brain delivery of actives for cns disorders. **Pharmaceutics**, 12(12), pp. 1–27. 2020.

BARKAT, M.A.; BEG, S.; POTTOO, F. H. & AHMAD, F.J. Nanopaclitaxel therapy: an evidence-based review on the battle for next-generation formulation challenges. *Nanomedicine, India*, v. 10, n. 14, p. 1-19, fev. 2019.

BENDA, P.; LIGHTBODY, J.; SATO, G. et al.; Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*, 161 (839): 370- 371.

BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. *Mol. Asp. Med.*, n. 21, p. 167-223, 2001.

BONFERONI, M.C. et al. Nanoemulsions for «nose-to-brain» drug delivery. *Pharmaceutics*, 11(2), pp. 1–17. 2019.

BRANDÃO, H.N., DAVID, J.P., COUTO, R.D., NASCIMENTO, J.A.P., DAVID, J.M. Química e Farmacologia de Quimioterápicos Antineoplásicos Derivados de Plantas. *Quim. Nova*. v. 33, p. 1359-1369, 2010.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians, Hoboken*, v. 68, n. 6, p. 394-424, nov. 2018.

BRENES, O. et al. Characterization of cell death events induced by anti-neoplastic drugs cisplatin, paclitaxel and 5-fluorouracil on human hepatoma cell lines: Possible mechanisms of cell resistance. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. v. 61, p. 347-355, 2007.

BRUINSMANN, F.A.; VAZ, G.R.; ALVES, A.C.S. et. Nasal drug delivery of anticancer drugs for the treatment of glioblastoma: Preclinical and clinical trials. *Molecules*, 24 (23). 2019.

CALLEJA, P., ESPUELAS, S., CORRALES, L., PIO, R., IRACHE, J.M. Pharmacokinetics and antitumor efficacy of paclitaxel–cyclodextrin complexes loaded in mucus-penetrating nanoparticles for oral administration. *Nanomedicine*, v. 9, n. 14, p. 2109–2121, 2014.

CANCINO, J., MARANGONI, V.S. & ZUCOLOTTO, V. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. *Quim. Nova*, v. 37, n. 3, p. 521-526, 2014.

CARLSON, S.K.; BROTHERS, S.P & WAHLESTEDT, C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. **EMBO Molecular Medicine**, 6(11), pp. 1359–1370. 2014.

CARVALHO, J.E.; RUIZ, A.L.T.G.; COSTA, D.V.C.; MONTEIRO, K.M. Modelos experimentais para estudo de substâncias com atividade anticâncer. In: SAN FELICIANO, A.; CECHINEL FILHO, V. Descoberta, desenho e desenvolvimento de novos agentes anticâncer no âmbito do programa Iberoamericano **CYTED**. Itajaí: UNIVALI, p. 313-345, 2014.

CHABNER, A. B. et. al – cap: 61 p. 1677-1724 in: Brunton, L. L. et al - Goodman E Gilman: As Bases Farmacológicas da terapêutica 12º ed. AMGH Ltda, Porto Alegre RS; 2012.

CHENG, Y. et al. Deep penetration of a PDT drug into tumors by noncovalent drug-gold nanoparticle conjugates, **J Am Chem Soc.** 133, pp. 2583–2591. 2011.

CHEN, R.; COHEN, A.L. & COLMAN, H. Targeted Therapeutics in Patients With High-Grade Gliomas: Past, Present, and Future. Current Treatment Options **Oncol.** 17(8):42. 2016. doi:10.1007/s11864-016-0418-0.

CHEN, R.; COHN, M. S.; COHEN, A.L. & COLMAN, H. Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. **Neurotherapeutics**, 14(2), pp. 284–297, 2017.

CHEN, T.C.; DA FONSECA, C.O & SCHONTHAL, A.H. Intranasal perillyl alcohol for glioma therapy: Molecular mechanisms and clinical development. **International Journal of Molecular Sciences**, 19(12), pp. 1–21, 2018.

CONTENTE, T. C; KRETZER, I. F; FILIPPIN-MONTEIRO, F.B et al. Association of daunorubicin to a lipid nanoemulsion that binds to low-density lipoprotein receptors enhances the antitumour action and decreases the toxicity of the drug in melanoma-bearing mice. *Journal Of Pharmacy And Pharmacology*, [S.L.], v. 66, n. 12, p. 1698-1709. Oxford University Press (OUP). 2014. <http://dx.doi.org/10.1111/jphp.12296>.

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.

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, 2007.

DING, S. & ZHANG, H. Improved antitumor efficacy of paclitaxel with nano-formulation in breast cancer. *Nanotechnology Reviews*, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 291-299. 2017. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/ntrev-2016-0059>. FISUSI, Funmilola A.; AKALA, Emmanuel O..Drug Combinations in Breast Cancer Therapy. *Pharmaceutical Nanotechnology*, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 3-23, 10 maio 2019. Bentham Science Publishers Ltd.

DONYAI, P. et. al. - Physcal and chemical stability of paclitaxel infusions and different container types. *Journal of Oncology Pharmacy Prattice*, v. 12, p.211-222, 2006.

EVAN, G. I. & VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, n. 411, p. 342-348, 2001.

FEIO, D.C.A., OLIVEIRA, N.C.L., PEREIRA, E.L.R., MORIKAWA, A.T., MUNIZ, J.A.P.C., MONTENEGRO, R.C., ALVES, A.P.N.N., LIMA, P.D.L., MARANHÃO, R.C., BURBANO, R.R. Organic effects of associating paclitaxel with a lipid-based nanoparticle system on a nonhuman primate, *Cebus apella*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 3827 – 3837, 2017.

FERLAY, J. et al. (ed.). *Cancer today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2018. (IARC Cancer Base, n. 15). Available at: <https://publications.iarc.fr/Databases/Iarc-Cancerbases/Cancer-Today-Powered-By> **GLOBOCAN**, 2018.

FERRER, V.P.; NETO, V.M & MENTLEIN, R. Glioma infiltration and extracellular matrix: key players and modulators. Review Article. **Glia**. V. 66, n. 8, p. 1542-1565, 2018.

FRESHNEY, I.R. Culture of animal cells. **A manual of basic technique**. 5 ed. New York: Wiley-Liss. 2005.

FROSCH, M.P. Central nervous system in Robbins basic pathology. Kumar V, Abbas AK, Astor JC. 9th ed. **Elsevier Saunders, Philadelphia**, p. 842, 2013.

GANGULY, K. et al. Polysaccharide-based micro/nanohydrogels for delivering macromolecular therapeutics, **J Control Release** 193, pp. 162–173. 2014.

GRAZIANI, S.R. et al. Uptake of a cholesterol rich emulsion by breast cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 85, n. 3, p. 493 – 497, 2002.

GRESHOCK, J., NATHANSON, K.; MARTIN A.M. Cancer cell lines as genetic models of their parent histology: analyses based on array comparative genomic hybridization. **Cancer Research**. v. 67, n. 8, p. 3594- 3600, 2007.

GROBMYER, S.R. et al. The promise of nanotechnology for solving clinical problems in breast cancer. **J. Surg. Oncol.**, v. 103, n. 4, p. 317-325, 2011.

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

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**. v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HIRATA, R.D., HIRATA, M.H., MESQUITA, C.H., CESAR, T.B., MARANHÃO, R.C. Effects of apolipoprotein B-100 on the metabolism of a lipid microemulsion model rats. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1437, p. 53–62, 1999.

HIRTZ, A.; RECH, F, DUBOIS, P.S.H. & DUMOND, H. Astrocytoma: A Hormone-Sensitive Tumor? **Int J Mol Sci**. 21(23):9114. 2020. doi: 10.3390/ijms21239114. PMID: 33266110; PMCID: PMC7730176.

HOGENESCH, H. & NIKITIN, A.Y. Challenges in pre-clinical testing of anti-cancer drugs in cell culture and in animal models. **Journal of controlled release**. v. 164, n. 2, p. 183-186, 2012.

HUNGRIA, V.T.M., LATRILHA, M.C., RODRIGUES, D.G. et al. Metabolism of a cholesterol-rich microemulsion (LDE) in patients with multiple myeloma and a preliminary clinical study of LDE as a drug vehicle for the treatment of the disease. **Cancer Chem. Pharmacol.** v. 53, p. 51–60, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Tipos de câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. <https://www.inca.gov.br/como-surge-o-cancer> acessado em 22.05.2022.

JABIR, N.R., TABREZ, S., ASHRAF, G.M., SHAKIL et al. Nanotechnology-based approaches in anticancer research. **Int. J. Nanomed.** v. 7, p. 4391–4408, 2012.

JAIN, N.K.; MISHRA, V. & MEHRA, N.K. Targeted drug delivery to macrophages. **Expert Opin. Drug Deliv.** 10, pp. 353–367. 2013.

JNAIDI, R.; ALMEIDA, A.J. & GONÇALVES, L.M. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as smart drug delivery systems in the treatment of glioblastoma multiforme. **Pharmaceutics**, 12(9), pp. 1–19. 2020.

KIM, J.E. & PARK, Y.J. Improved Antitumor Efficacy of Hyaluronic Acid-Complexed Paclitaxel Nanoemulsions in Treating Non-Small Cell Lung Cancer. **Biomol Ther** (Seoul). 25(4):411-416. 2017. doi: 10.4062/biomolther.2016.261. PMID: 28208014; PMCID: PMC5499620.

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

KOUL, R.; DUBEY, A.; TORRI, V. et al. Glioblastoma multiforme in elderly population. **The Internet Journal of Neurosurgery**. v.8, n. 1: DOI:10.5580/2b2b. Disponível em: <<http://yester.ispub.com/journal/the-internet-journal-of-neurosurgery/volume-8-number-1/1881432761glioblastoma-multiformein-elderly-population.html#sthash.WJODb9ge.dpbs>>. 2012.

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. **Cell Oncol**. v. 35, n. 6, p. 451- 460, 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s13402-012-0104-6>.

LAH, T.T.; NOVAK, M. & BREZNIK, B. Brain malignancies: Glioblastoma and brain metastases. **Seminars in Cancer Biology**, 60, pp. 262–273.2020.

LAMPRECHT, A. et al. Nanomedicines in gastroenterology and hepatology. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol**. 12, pp. 195–204. 2015.

LENT, R. Cem bilhões de neurônios? Conceitos fundamentais de neurociência, 2ª ed. Editora Atheneu, 2010.

LETCHFOR, K. & BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes, **Eur J Pharm Biopharm**. 65, pp. 259-269. 2007. doi:10.1016/j.ejpb.2006.11.009.

LI, J.; ZHAO, J.; TAN, T.; et al. Nanoparticle drug delivery system for glioma and its efficacy improvement strategies: A comprehensive review. **International Journal of Nanomedicine**, 15, pp. 2563–2582. 2020.

LIANG, J.; LV, X.; LU, C. et al. Prognostic factors of patients with Gliomas– an analysis on 335 patients with Glioblastoma and other forms of Gliomas. **BMC Cancer** (2020) 20:35, 2020.

LIANG, X.J.; CHEN, C.; ZHAO, Y.; WANG, P.C. Circumventing tumor resistance to chemotherapy by nanotechnology. **Methods Mol. Biol.** v. 596, p. 467–488, 2010.

LIMA, R.M.F. Estudo sobre a citotoxicidade do catecol, um metabólito do benzeno, na linhagem n2a de neuroblastoma murino. Salvador: UFBA, p.97. **Dissertação** (Mestrado em Patologia Experimental) – Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2008.

LOUIS, D.N.; PERRY, A.; REIFENBERGER, G. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathol.** 131(6):803-20. 2016.

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

MAIR, M.J. et al. A basic review on systemic treatment options in WHO grade II-III gliomas. **Cancer Treatment Reviews.** Elsevier Ltd, 92, p. 102124. 2021.

MANGOURA, D.; SAKELLARIDIS, N.; JONES, J.; VERNADAKIS, A. Early and late passage C-6 glial cell growth: similarities with primary glial cells in culture. **Neurochem Res** 14 (10): 941- 947. 1989.

MARANHÃO, R.C., CESAR, T.B., PEDROSO-MARIANI, S.R., HIRATA, M.H., MESQUITA, C.H. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low-density lipoprotein. **Lipids.** v. 28, n. 8, p. 691 – 696, 1993.

MARANHÃO, R.C., GRAZIANI, S.R., YAMAGUCHI, N., MELO, R.F., LATRILHA, M.C., RODRIGUES, D.G., COUTO, R.D., SCHREIER, S., BUZAID, A.C. Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in cancer patients. **Cancer Chemother. Pharmacol.** v. 49, n. 6, p. 487- 498, 2002.

MCDONALD, E.S.; CLARK, A.S.; TCHOU, J. et al. Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. **J Nucl Med.** 57 Suppl 1:9S-16S. doi: 10.2967/jnumed.115.157834. 2016. PMID: 26834110.

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, p. 1-11, 2013.

MEHTA, G.U & LONSER, R.R. Management of hormone-secreting pituitary adenomas. **Neuro-Oncology**, 19(6), pp. 762–773. 2017.

MICHA, J.P., GOLDSTEIN, B.H., GRAHAM, C., RETTENMAIER, M.A., BROWN, J.P., consolidation/maintenance therapy in advanced ovarian carcinoma. **Oncology**, v. 71, n. 1-2, p. 49-53. 2007.

MILLER, J.J. & WEN, P.Y. Emerging targeted therapies for glioma. **Expert Opinion Emerging Drugs.** 21(4):441-452. 2016. doi:10.1080/14728214.2016.1257609

MILLIMOUNO, F.M., DONG, J., YANG, L., LI, J., LI, X. Targeting apoptosis pathways in cancer and perspectives with natural compounds from mother nature. **Cancer Prev. Res.** v. 7, n. 11, p. 1081-1107, 2014.

MIZUTANI, H., TADA-OIKAWA, S., HIRAKU, Y., KOJIMA, M., KAWANISHI, S. Mechanisms of Apoptosis Induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. **Life Sciences.** v. 76, p. 1439-1453, 2005.

MONTEIRO, F. O. L. - Encapsulação do Paclitaxel em Lipossomas Recobertos com Folato Aumenta a Captação Celular e o Efeito Antitumoral em modelo Experimental de Tumor de Mama (**Tese de Doutorado** em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais 2018.

MONTEIRO, L. O. F. et al. Technetium-99m radiolabeled paclitaxel as an imagin probe for breast cancer in vivo. **Biomedicine Pharmacotherapy**, v. 89, p. 146-151, 2017.

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 – 4318, 2015.

MUSTEATA, F.M. & PAWLISZYN. Determination of free concentration of paclitaxel in liposome formulations. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.** v. 9, n. 2, p. 231-237, 2006.

O'SHANNESY, D.J; SOMERS, E. B; MALTZMAN, J. et al. Folate receptor alpha (FRA) expression in breast cancer: identification of a new molecular subtype and association with triple negative disease. Springerplus, [S.L.], v. 1, n. 1, 28. Springer Science and Business Media LLC. 2012. <http://dx.doi.org/10.1186/2193-1801-1-22>.

PARKER, K.K.; NORENBERG, M.D & VERNADAKIS, A. “Transdifferentiation” of C6 glial cells in culture. **Science** 208 (4440): 179-181. 1980.

PATEL, T.; ZHOU, J.; PIEPMEIER, J.M. & SATLZAMN, W.M. Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system, **Adv Drug Deliv Rev.**15, pp. 701-705. 2012. doi: 10.1016/j.addr.2011.12.006.

PAZDUR, R., KUDELKA, A.P., KAVANAGH, J.J et al. The taxoids: paclitaxel (Taxol ®) and docetaxel (Taxotere ®). **Cancer Treatment Reviews**, v. 19, p. 351- 386, 1993.

PEER, D. et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nat. Nanotechnol.** 2, 751–760. 2007.

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.

PIRES, L.A.; HEGG, R.; FREITAS, F.R. et al. Effect of neoadjuvant chemotherapy on low-density lipoprotein (LDL) receptor and LDL receptor-related protein 1 (LRP-1) receptor in locally advanced breast cancer. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, [S.L.], v. 45, n. 6, p. 557-564. FapUNIFESP (SciELO). 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-879x2012007500068>.

PROMEGA BIOTECNOLOGIA DO BRASIL. **Promega**, 2020. Produto Caspase-Glo® 3/7 Assay System. Disponível em: https://www.promega.com.br/products/cell-health-assays/apoptosis-assays/caspase_glo-3_7-assay-systems/?catNum=G8090. Acesso em: 14 fev. 2020.

ROGERS, L. et al. Meningiomas: Knowledge base, treatment outcomes, and uncertainties. A RANO review. **Journal of Neurosurgery**, 122(1), pp. 4–23. 2015.

ROWINSKY, E.K. The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agentes. **Annual Review of Medicine**, v. 48, p. 353- 374, 1997.

ROWINSKY, E.K., CAZENAVE, L.A. & DONEHOWER, R.C. Taxol: A Novel Investigational Antimicrotubule Agent. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 15, p. 1247–1259, 1990.

RUDÀ, R. et al. EANO guidelines for the diagnosis and treatment of ependymal tumors. **Neuro-Oncology**, 20(4), pp. 445–456. 2018.

SARTAJ, A.; BABOOTA, S. & ALI, J. Nanomedicine: a promising avenue for the development of effective therapy for breast cancer. *Current Cancer Drug Targets*, [S.L.], v. 20, n. 8, p. 603-615. **Bentham Science Publishers Ltd**. 2020.

SCHNEIDER, T.; MAWRIN, C.; SCHERLACH, C. et al. Gliomas in adults. **Dtsch Arztebl Int**. 107(45):799-807. doi:10.3238/arztebl.2010.0799, 2010.

SHOEMAKER, R.H. The NCI60 human tumor cell line anticancer drug screen. **Nature Reviews Cancer**. v. 6, p. 813-823, 2006.

SHUKLA, S. & MEHTA, A. Anticancer potential of medicinal plants and their phytochemicals: a review. **Braz. J. Bot**. v. 38, n. 2, p. 199-210, 2015.

SILVA, C.O. et al. Current trends in cancer nanotheranostics: Metallic, polymeric, and lipid-based systems. **Pharmaceutics**, 11(1). 2019.

SMITH, C. & IRONSIDE, J.W. Diagnosis and pathogenesis of gliomas. **Current Diagnostic Pathology**. v. 13, p. 180-92, 2007.

SOHAIL, M.F. et al. Folate grafted thiolated chitosan enveloped nanoliposomes with enhanced oral bioavailability and anticancer activity of docetaxel. **J Mater Chem. B**. 4, pp. 6240–6248. 2016.

SPATTI, M.C. **Efeito de nanoemulsão contendo oleato de paclitaxel em glioblastoma murino: estudos in vivo e in vitro**. São Paulo: USP. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Universidade de São Paulo, São Paulo. **2016**.

SURAPANENI, M.S. et. al - Desining Paclitaxel Dru Delivery Systems Aimed at Improved Patients Outcomes: Current Status and Challengs. International Scholarly Research Network **ISRN Pharmacology**, v. 2012, p. 1-15, 2012.

TAPEINOS, C., BATTAGLINI, M., & CIOFANI, G. Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases. **Journal of Controlled Release**, 264, pp. 306–332, 2017.

VERT, M. et al. Terminology for biorelated polymers and applications (IuPAC Recommendations 2012). **Pure Appl Chem**. 84, pp. 377–410. 2012.

VIEIRA, D.B. & GAMARRA, L.F. Getting into the brain: Liposome-based strategies for effective drug delivery across the blood–brain barrier. **International Journal of Nanomedicine**, 11, pp. 5381–5414. 2016.

WEATHERS, S.S. & GILBERT, M.R. Toward Personalized Targeted Therapeutics: An Overview. **Neurotherapeutics**, 14(2):256-264. 2017. doi:10.1007/s13311-016-0496-5.

WEISS, R.B., DONEHOWER, R.C., WIERNIK, P.H. et al. Hypersensitivity reactions from taxol. **J. Clin. Oncol**. v. 8, p. 1263-1268, 1990.

WESSELING, P.; VAN DEN BENT, M. & PERRY, A. Oligodendroglioma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathologica*. Springer Berlin Heidelberg, 129(6), pp. 809–827. 2015.

WILHELM, S. et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumors. **Nat. Rev. Mater.** 1, 16014. 2016.

WOENSEL, M.; WAUTHOZ, N.; ROSIÈRE, R. et al. Formulations for intranasal delivery of pharmacological agents to combat brain disease: A new opportunity to tackle GBM? **Cancers**, 5(3), pp. 1020–1048. 2013.

WOLBERS, J.G. Novel strategies in glioblastoma surgery aim at safe, supra-maximum resection in conjunction with local therapies. **Chinese Journal of Cancer Research**. 33(1): p. 8-15, 2014.

XIA, X.X. et al. Hydrophobic drug-triggered self assembly of nanoparticles from silk-elastin-like protein polymers for drug delivery, **Biomacromolecules**. 15, pp. 908–914. 2014.

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., AGÜEROS, M., PETROV, P., MILADINOVA, I., TSVETANOV, C., IRACHE, J.M. Stabilized micelles as delivery vehicles for paclitaxel. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 436, n. 1-2, p. 258–264, 2012.

ZHANG, X. et. al. Peg-Farnesylthiosalicylic Acid Telodendrimer Micells as an Improved Formulation for Target Delivery of Paclitaxel. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, p. 2807-2814, 2014.