

Universidade Federal de Pelotas
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

Investigação do potencial terapêutico do cetoprofeno em nanocápsulas para o
tratamento de gliomas

Elita Ferreira da Silveira

2013

Elita Ferreira da Silveira

Investigação do potencial terapêutico do cetoprofeno em nanocápsulas para o
tratamento de gliomas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Profa. Dra. Elizandra Braganhol

Co-orientadora: Profa. Dra. Rosélia M. Spanevello

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

S587i Silveira, Elita Ferreira da

Investigação do potencial terapêutico do cetoprofeno em nanocápsulas para o tratamento de gliomas / Elita Ferreira da Silveira ; orientador Elizandra Braganhol; co-orientador Rosélia M. Spanevello.- Pelotas,2013.-89f. : il. -Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

1.Gliomas 2.Nanocápsulas 3.Cetoprofeno 4.Inflamação
5.COX I.Braganhol, Elizandra(orientador) II .Título.

CDD 615.5

Banca Examinadora:

Prof^a . Dra. Francieli Moro Stefanello

Prof^a . Dra. Gabriele Cordenonzi Ghisleni

Prof^a . Dra. Giovana D. Gamaro (Suplente)

Dedico

Aqueles que sempre estão ao meu lado:

meus pais Erion e Luísa

minha filha Amanda

Agradecimentos

Importante não é somente construir algo, mas ter com quem compartilhar nossos feitos, pois esses, raramente se constituem mérito exclusivo. Por isso, dedico esse momento a todos aqueles que comigo se empenharam na concretização desse trabalho. Em especial:

Aos meus pais, Erion e Luísa, agradeço por me proporcionarem a oportunidade de estudar, por não economizarem esforços para a minha formação pessoal e profissional, priorizando sempre meus estudos e me apoiando nas minhas escolhas. Ainda, gostaria de agradecer por serem pessoas corretas e admiráveis, por todo amor e paciência, por me mostrarem todos os dias o quanto sou amada e por juntos até hoje cuidarem para que nada nunca me falte. Essa é mais uma conquista, nossa!

A minha filha Amanda, que desde cedo aprendeu a necessidade de se priorizar o estudo, muitas vezes suportando minha ausência e meus momentos difíceis. Que essa conquista te sirva de exemplo de esforço e dedicação para que juntas possamos dizer que tudo valeu a pena. O meu amor por ti é maior que tudo, é por ti que diariamente persisto na busca do melhor.

A minha amiga Mariana, que me orientou nessa escolha e que certamente contribuiu não só para a realização desta conquista, como me serve de exemplo de determinação em muitos momentos da minha vida. Obrigada pela amizade, por sempre estar ao meu lado, me escutando e tentando entender e ajudar com minhas angústias, por me lembrar de que a cada dia podemos recomeçar e por me estender a mão sempre que preciso de ti. Agradeço também a tua família, por sempre me acolher e comemorar minhas conquistas.

Um agradecimento especial e sincero à minha orientadora, Prof^a. Dr^a Elizandra Braganhol! Obrigada pela pessoa que és, por ter me acolhido e ensinado tudo que precisei com paciência e carinho, pelo otimismo que você sempre me passou e pela confiança depositada em mim. Sou grata por ganhar sua amizade e por ter sido orientada por uma pessoa tão competente, exemplo do que espero ser no futuro.

À minha co-orientadora Rosélia Spanevello por estar sempre atenta e disposta a ajudar as pessoas que estão a sua volta e pelas contribuições nos experimentos e durante o desenvolvimento do meu trabalho.

A amiga e colega de laboratório, Fernanda, pela ajuda em todos os experimentos realizados e pelas horas dedicadas a execução dos experimentos desta dissertação, por me fazer presente quando não pude executar minhas funções, pelos finais de semana dedicados ao trabalho, pelo companheirismo nos momentos de angústia e pela amizade e paciência durante esse ano de convivência. Tua ajuda foi fundamental.

Ao amigo Rodrigo pela colaboração, na realização de análises importantes para este trabalho. Pela amizade e pelo carinho sincero.

Aos colegas de laboratório, em especial à Juliana, pelas horas incansáveis dedicadas a realização deste trabalho, pela paciência e persistência nos experimentos que realizamos juntas, pela competência com que desenvolveste todas as funções o qual te pedi ajuda. À Gabriela, pelo profissionalismo, pela disposição e interesse nos experimentos, pela disponibilidade em sempre me ajudar e mesmo ensinar quando foi preciso e pela amizade recebida. Ao Carlus, por toda ajuda no laboratório, pela pessoa que és e por fazer do nosso ambiente de trabalho, mais divertido e saudável.

A Prof^a Dr^a Letícia Cruz e sua aluna Janaíne, pela parceria na preparação das formulações de Cetoprofeno em nanocápsulas utilizadas neste trabalho.

A Prof^a Dr^a Ana Horn e às técnicas, Carol, Mirian e Sabrina, do laboratório de Histologia da Furg, pelos ensinamentos e pela ajuda no preparo das lâminas que foram essenciais para análise dos resultados deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção pelos ensinamentos.

A UFPEL pela estrutura onde eu tive a oportunidade de realizar meus estudos desde a graduação até o Mestrado. E que me proporcionou diversas experiências acadêmicas.

A CAPES, que pelo período de 12 meses me proporcionou apoio financeiro.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, seja com uma colaboração, uma explicação, um material emprestado, ou mesmo, uma palavra de conforto nas horas difíceis. Meus sinceros agradecimentos!

“Não importa onde você parou... Em que momento da vida você cansou... O que importa é que sempre é possível e necessário recomeçar. Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo... É renovar as esperanças na vida e, o mais importante, acreditar em você de novo. Sofreu muito nesse período? Foi aprendizado... Chorou muito? Foi limpeza da alma... Ficou com raiva das pessoas? Foi para poder perdoá-las um dia... Sentiu-se só por diversas vezes? É porque fechou as portas até para os anjos... Acreditou que tudo estava perdido? Era o início da sua melhora. Aonde você quer chegar? Ir alto? Sonhe alto, queira o melhor do melhor. Se pensarmos pequeno, coisas pequenas teremos, mas se desejarmos fortemente o melhor e, principalmente, lutarmos pelo melhor, o melhor vai se instalar em nossa vida. Porque sou do tamanho daquilo que vejo e não do tamanho da minha altura.”

Carlos Drummond de Andrade

Resumo

SILVEIRA, Elita Ferreira da.. **Investigação do potencial terapêutico do cetoprofeno em nanocápsulas para o tratamento de gliomas**. 2013.89f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Os gliomas são considerados os tumores cerebrais primários mais comuns e devastadores do sistema nervoso central devido a sua rápida progressão e seus elevados índices de recorrência. Além disso, a barreira hematoencefálica limita a entrada de quimioterápicos no SNC, de modo que apenas fármacos altamente lipofílicos possam ser utilizados. A utilização de formulações de nanocápsulas de cetoprofeno torna-se uma estratégia promissora para uma nova modalidade terapêutica devido à sua alta lipofilicidade e sua ação anti-inflamatória, que possivelmente controla a superexpressão da enzima ciclo-oxigenase-2 que está associada à gliomas clinicamente mais agressivos e controlam a modulação das células imunes no microambiente inflamatório. Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do cetoprofeno em formulação de nanocápsulas sobre a proliferação *in vitro* e *in vivo* de gliomas. Primeiramente foi avaliado o efeito antiproliferativo das formulações de cetoprofeno em nanocápsulas em linhagens de glioma de rato C6, de glioma humano U138MG e U251MG. O experimento demonstrou uma redução na progressão e viabilidade celular e a ocorrência de morte celular via processo de necrose. As formulações de cetoprofeno em nanocápsulas foram seletivas para as células tumorais como evidenciado pela ausência de toxicidade sobre culturas primárias de astrócitos de ratos. A seguir foi investigado o efeito das formulações de cetoprofeno em nanocápsulas *in vivo*, onde através do modelo de implante de glioma e posterior análise histológica verificamos que as mesmas possivelmente foram capazes de vetorizar o cetoprofeno ao cérebro, reduzindo o volume do tumor e suas características de malignidade. O tratamento com cetoprofeno em nanocápsulas evitou o declínio da atividade locomotora dos animais implantados com glioma, parâmetro que foi avaliado pelo teste do campo aberto e que está relacionado a uma maior sobrevida dos pacientes. A avaliação da atividade nucleotidásica em linfócitos revelou que o tratamento com cetoprofeno, tanto na forma livre como nanoencapsulada, aumentou a hidrólise de ATP e ADP, enquanto que a atividade da adenosina deaminase diminuiu. As alterações na atividade das ectonucleotidases sugerem um acúmulo de adenosina, molécula imunossupressora, que pode estar envolvida na diminuição da ativação dos linfócitos, controlando o processo inflamatório pró-tumoral. As formulações de cetoprofeno em nanocápsulas também não causaram dano sistêmico como verificado através da análise das enzimas sorológicas ALT, AST e dos níveis de creatinina e uréia, as quais são marcadores de dano hepático e renal. Nossos resultados sugerem que o cetoprofeno em formulação de nanocápsula pode ter uma função importante no controle da proliferação tumoral, podendo contribuir no tratamento adjuvante de gliomas.

Palavras Chave: Gliomas. Nanocápsulas. Cetoprofeno. Inflamação. COX.

Abstract

SILVEIRA, Elita Ferreira da.. **Investigação do potencial terapêutico do cetoprofeno em nanocápsulas para o tratamento de gliomas.** 2013.89f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Gliomas are the most common and devastating primary brain tumors characterized by rapid progression and high recurrence rate. Moreover, the blood-brain barrier (BBB) limits the delivery of chemotherapeutic the CNS, restricting the glioma therapy.

The use of nanocapsules formulations of ketoprofen become a promising tool for a new therapeutic modality to glioma treatment. Nanocapsules have been shown to cross the BBB and the ketoprofen, a well known COX inhibitor, may be an interesting alternative to glioma treatment, since the inflammatory environment and the COX-2 overexpression are associated to increased tumor malignity. Therefore the aim of this study was to evaluate the effect of ketoprofen in nanocapsules on the *in vitro* and *in vivo* glioma proliferation. We first evaluated the antiproliferative effect of ketoprofen innanocapsules in rat (C6) and human (U138MG, U251MG) glioma cell lines. Indeed, ketoprofen in nanocapsules reduced the glioma cell viability and increased the PI incorporation, an indicative of cell death by necrosis. The cell death induced by ketoprofen in nanocapsules was selective for tumor cells as evidenced by the lack of toxicity on primary cultures of rat astrocytes. Next, the antitumor effect of ketoprofen in nanocapsules was evaluated in the *in vivo* rat glioma model. The histological analysis revealed that ketoprofen in nanocapsules reduced the glioma size as well as the characteristics of tumor malignity. As evaluated by the open field paradigm, the ketoprofen in nanocapsules treatment promoted an improvement of the locomotion activity of animals, which is related to increased survival of patients. In addition, ketoprofen free and in nanocapsules increased the ATPase and ADPase activity in lymphocytes, while the adenosine deaminase activity was decreased. The alterations on extracellular nucleotide metabolism by lymphocytes may be related to an increase of the immunessuppressive, which can control the lymphocyte activation reducing the process of cancer-related inflammation. The formulations of ketoprofen in nanocapsules also did not cause systemic damage as verified through analysis of ALT, AST, creatinine and urea, markers of hepatic and nephrotoxicity. Our results suggest that the formulation of ketoprofen in nanocapsules can play an important role in controlling the proliferation tumor, contributing in the adjuvant treatment of gliomas.

Keywords: Gliomas. Nanocapsules. Ketoprofen. Inflammation. COX

Lista de Figuras

Figura 1	Teoria atual sobre a origem dos gliomas.....	20
Figura 2	Principais vias de sinalizações envolvidas na patogênese dos gliomas.....	25
Figura 3	Possíveis interações entre células neoplásicas, macrófagos e microglia nos tumores cerebrais.....	27
Figura 4	Demonstração das vias de liberação do ATP para o meio extracelular.....	30
Figura 5	Estrutura química do cetoprofeno(ácido [2-(3-benzoilfenil)propanóico]).....	34
Figura 6	Nanopartículas. Ilustração representativa de nanoesferas e nanocápsulas.....	36

Lista de Tabelas

Tabela 1	Classificação dos gliomas quanto ao tipo celular.....	21
Tabela 2	Receptores Purinérgicos (Purinas e Pirimidinas).....	31

Lista de Abreviaturas

ADP – Adenosina difosfato

AMP – Adenosina monofosfato

ATP - Adenosina trifosfato

AINES – Antiinflamatório não esteroidais

AKT - Proteína quinase B

BHE – Barreira Hematoencefálica

CDKN2A- Inibidor da ciclina dependente de quinase 2A

CDK4 - Ciclina dependente de cinase 4

c-Myc - Oncogene viral v-myc mielocitomatose

CNTF- Fator de crescimento neurotrófico ciliar

COX – Enzima ciclo-oxigenase

COX 1– Enzima ciclo-oxigenase 1

COX 2 – Enzima ciclo-oxigenase 2

COX 3 – Enzima ciclo-oxigenase 3

Ecto-5'-NT/CD73- Ecto-5'-nucleotidase

EGF- Fator de crescimento epidermal

EGFR - Receptor de fator de crescimento epidermal

E-NTPDase- Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase

FGF2- Fator de crescimento de fibroblasto GBM - Glioblastoma Multiforme

GFAP - Proteína glial fibrilar ácida

HIF-1 – Fator 1 induzido por hipóxia

IL-1_ - Interleucina-1

IL-2 - Interleucina-2

IL-4- Interleucina-4

IL-6 - Interleucina-6

IL-8- Interleucina-8

IL-10- Interleucina-10

IL-12- Interleucina-12

IL-13- Interleucina-13

INFg - Interferon gama

MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos

MIF- Fator inibitório de migração de macrófagos

MIP – Proteína inflamatória de macrófagos

p53- Gene supressor tumoral PDGF- Fator de crescimento derivado de plaquetas

PDGFR- Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas

PGI2 – Prostaglandina I2

PGE1 – Prostaglandina E1

PGE2 – Prostaglandina E2

PI3K - Fosfatidilinositol 3-Cinase

PTEN - Homólogo fosfatase e tensina deletado do cromossomo 10

RB- Proteína retinoblastoma

SNC- Sistema Nervoso Central

TNF-a - Fator de necrose tumoral- alfa

VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial

Sumário

1 Introdução	15
2 Objetivos	18
2.1 Objetivos específicos	18
3 Revisão Bibliográfica	19
3.1 Teoria sobre a origem dos gliomas	19
3.2 Classificação dos gliomas	20
3.2.1 Classificação dos gliomas quanto ao tipo celular	20
3.2.2 Classificação dos gliomas quanto à localização tumoral	22
3.2.3 Classificação dos gliomas quanto à malignidade	22
3.3 Glioblastoma multiforme	23
3.4 Alterações moleculares envolvidas na patogênese dos gliomas	24
3.5 Terapia para gliomas	26
3.6 Processo inflamatório e os gliomas	26
3.7 Sistema purinérgico e a inflamação	29
3.8 Processo inflamatório e a utilização de AINES	32
3.9 Cetoprofeno	34
3.10 Nanocápsulas poliméricas de cetoprofeno	35
4 Artigo Científico	38
5 Conclusões	77
6. Referências	79

1. Introdução

Os tumores cerebrais são considerados uma massa de células anormais que cresce e se multiplica de forma descontrolada no cérebro e sua apresentação clínica poderá variar de acordo com sua localização. Dentre os tumores cerebrais primários estão os gliomas, constituindo os tumores sólidos mais comuns em adultos (Maher e Raffel, 2004) e representam cerca de 50% de todas as neoplasias do Sistema nervoso central (SNC) (Preusser et al., 2006; Yin et al., 2007; Dunn et al., 2007), sendo caracterizados também por possuírem ampla heterogeneidade histológica e clínica.

Os gliomas são classificados em grau I à IV de acordo com as características de malignidade (Dai e Holland, 2001). Os gliomas de grau I e II são tumores de baixo grau de malignidade, caracterizados por uma baixa taxa de proliferação celular e reduzida capacidade de invadir o parênquima cerebral (Stieber, 2001). Já os gliomas de grau III e IV são classificados como tumores de alto grau (Behin et al., 2003) e apresentam características de elevada agressividade, incluindo indiferenciação celular ou anaplasia, pleomorfismo celular, elevada capacidade de proliferação (Behin et al., 2003), levando a um prognóstico muito desfavorável. Os gliomas de grau IV, o glioblastoma multiforme, são os mais comuns, malignos e letais (Robins et al., 2007; Kanu et al., 2009; Vredenburgh et al., 2009), correspondendo a cerca de 70% dos gliomas de alto grau diagnosticados (Ohgaki e Kleihues, 2007). Sua incidência vem aumentando ao longo dos anos e o prognóstico para os pacientes permanece muito ruim (Konopka e Bonni, 2003) devido a sua rápida progressão e a elevados índices de recorrência (Stupp et al., 2006; Yin et al., 2007; Goldust et al., 2008). As metástases sistêmicas são raras (Armstrong et al., 2010) porém, dentro de pouco tempo, no mesmo local da lesão primária principal ou muito próximo a ela, são observadas novas lesões (Sathornsumette e Rich, 2008).

Dessa forma o tratamento fica limitado à cirurgia, quando possível, seguido de radioterapia e quimioterapia (Butowski et al., 2006). Contudo, esses tratamentos demonstram eficácia limitada, tanto pela ausência de especificidade terapêutica das drogas citotóxicas, como pela resistência intrínseca das células tumorais à radioterapia e a apoptose, fazendo com que as terapias pró-apoptóticas não sejam tão efetivas ou falhem em induzir a regressão tumoral (Furnari et al., 2007; Van Meir et al., 2010).

Além disso, a barreira hematoencefálica (BHE) limita a entrada dos quimioterápicos no SNC, de modo que apenas fármacos altamente lipofílicos podem ser utilizados (Mousseau et al., 1993). Essa falta de fármacos empregados para o tratamento da doença, que consigam associar uma alta eficácia e baixos efeitos colaterais, tem estimulado o desenvolvimento de formulações que permitam a liberação controlada de fármacos em sítios específicos, visando à diminuição de efeitos tóxicos e/ou aumento do índice terapêutico, como as nanopartículas, que tem recebido grande atenção nos últimos anos.

As nanopartículas como vetores tornam-se estruturas promissoras para uma nova modalidade terapêutica para os gliomas, pois são sistemas coloidais matriciais ou reservatórios (Quintanar Guerreiro et al., 1998) que servem como sistemas carreadores de fármacos constituídos por polímeros capazes também de atravessar barreiras, como a BHE. Assim, fármacos com atividade farmacológica já estabelecida podem ser associados à nanocápsulas e assim ter uma maior chance de chegar ao sítio da doença, ter uma maior efetividade, além de ampliar o espectro de aplicações terapêuticas de fármacos já utilizados na clínica.

Além da participação das células tronco tumorais na etiologia dos gliomas, estudos recentes mostram que a presença de um microambiente inflamatório, composto por células imunes e rico em citocinas, pode estar correlacionada com a progressão desses tumores (Demuth et al., 2004). De fato, a superexpressão da enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2), uma enzima chave na produção de mediadores inflamatórios, está associada com gliomas clinicamente mais agressivos e de pior prognóstico para o paciente (Shono et al., 2001). Apesar dos mecanismos envolvidos no aumento da malignidade tumoral promovido pela COX-2 não estarem totalmente elucidados, alguns autores sugerem que essa enzima participa da regulação da proliferação celular, apoptose (Tsuji et al., 1995) e na interação tumor-vasos sanguíneos (Howe et al., 2001). Assim, inibidores da COX, como os anti-

inflamatórios não estereoidais (AINES), podem constituir uma estratégia interessante para a terapia anti-glioma.

Os AINES estão entre os agentes terapêuticos mais empregados no tratamento da dor e inflamação, contabilizando cerca de 5% das prescrições médicas em todo o mundo (Smalley et al., 1995). Sugere-se então a utilização de AINES na terapia de gliomas, visto que esses fármacos, ao inibirem as enzimas COX-1 e 2 e consequentemente a síntese de prostaglandinas (PGI_2 , PGE_1 e PGE_2), diminuem a vasodilatação e o recrutamento de células imunes para o sítio de inflamação (Feldman; McMahon, 2000), podendo assim modular o microambiente inflamatório e controlar a progressão desses tumores.

Assim a utilização do Cetoprofeno, ácido [2-(3-benzoilfenil) propanóico] um AINE, em formulações de nanocápsulas pode ser uma alternativa promissora para o tratamento adjuvante de gliomas, visto que esse fármaco já é amplamente utilizado na terapêutica e a sua associação a nanocápsulas pode reduzir os indesejáveis efeitos gastrointestinais e aumentar a biodisponibilidade no SNC. Além disso, cabe ressaltar que até o momento não existem relatos na literatura sobre a preparação de nanopartículas poliméricas contendo cetoprofeno visando à redução da proliferação celular.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar o efeito de formulações de cetoprofeno em nanocápsulas sobre a proliferação *in vitro* e *in vivo* de gliomas.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliação comparativa do efeito do cetoprofeno na forma livre e em nanocápsulas sobre a proliferação *in vitro* de linhagens celulares de glioblastoma multiforme.
- Verificação da citotoxicidade do cetoprofeno na forma livre e em nanocápsulas em cultura primária de astrócitos;
- Avaliação da atividade antitumoral, através de análise histológica, do cetoprofeno na forma livre e em nanocápsulas utilizando o modelo de implante de glioma *in vivo* em cérebro de ratos.
- Determinação do efeito do cetoprofeno na forma livre e em formulações de nanocápsulas no teste comportamental de campo aberto em ratos submetidos ao implante de glioma.
- Avaliação do efeito do cetoprofeno na forma livre e em formulações de nanocápsulas na atividade das ectonucleotidases em linfócitos de ratos submetidos ao implante de glioma.
- Avaliação das enzimas ALT-AST e dos níveis de creatinina e ureia em soro de ratos submetidos a implante de gliomas e tratados com cetoprofeno na forma livre e em formulações de nanocápsulas.

3. Revisão bibliográfica

3.1 A teoria sobre a origem dos gliomas

Existem duas teorias distintas sobre as células que originam os gliomas. A primeira, e mais antiga, atribui que os gliomas são oriundos de células gliais maduras como os astrócitos e os oligodendrócitos, os quais poderiam ser alvos de mutações em oncogenes e genes supressores tumorais, o que levaria à desdiferenciação celular e ao desenvolvimento tumoral (Lipton e Rosenber, 1994; Paulus e Tonn, 1995). A segunda teoria (representada na figura 1), mais recente e aceita, sugere que os gliomas se originam de células progenitoras neurais que sofreram transformação oncogênica durante seu desenvolvimento, vindo a se tornar células iniciadoras de tumor (Singh et al., 2004; Piccirillo e Vescovi et al., 2007; Piccirillo et al., 2009). Nesse contexto, as células tronco neurais são reguladas pelas mesmas vias de sinalização que estão ativas em tumores cerebrais. Consequentemente, elas são capazes de exibir comportamento similar ao dos gliomas, incluindo elevada motilidade, associação com vasos sanguíneos, desenvolvimento de fenótipos antigênicos imaturos como a expressão de nestina e do marcador de células tronco CD133, além da ativação de vias sinalizadoras de crescimento e proliferação celular (Palmer et al., 2000).

Além disso, uma vez que as células tronco neurais são precursoras de neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, a teoria da participação das células tronco tumorais na origem dos gliomas explica de forma mais convincente a geração de tumores cerebrais compostos por mais de um tipo celular como, por exemplo, o oligoastrocitoma. Dessa forma, os gliomas são constituídos por populações de células tumorais diferenciadas e de uma minoria de células tumorigênicas indiferenciadas multipotentes que varia em torno de 1-30%. Embora ambas contenham mutações oncogênicas que poderão contribuir para a tumorigênese, somente as células-tronco tumorais têm capacidade de se autorrenovar, sendo possivelmente as responsáveis pela sustentação e propagação do tumor (Sanai et al., 2005).

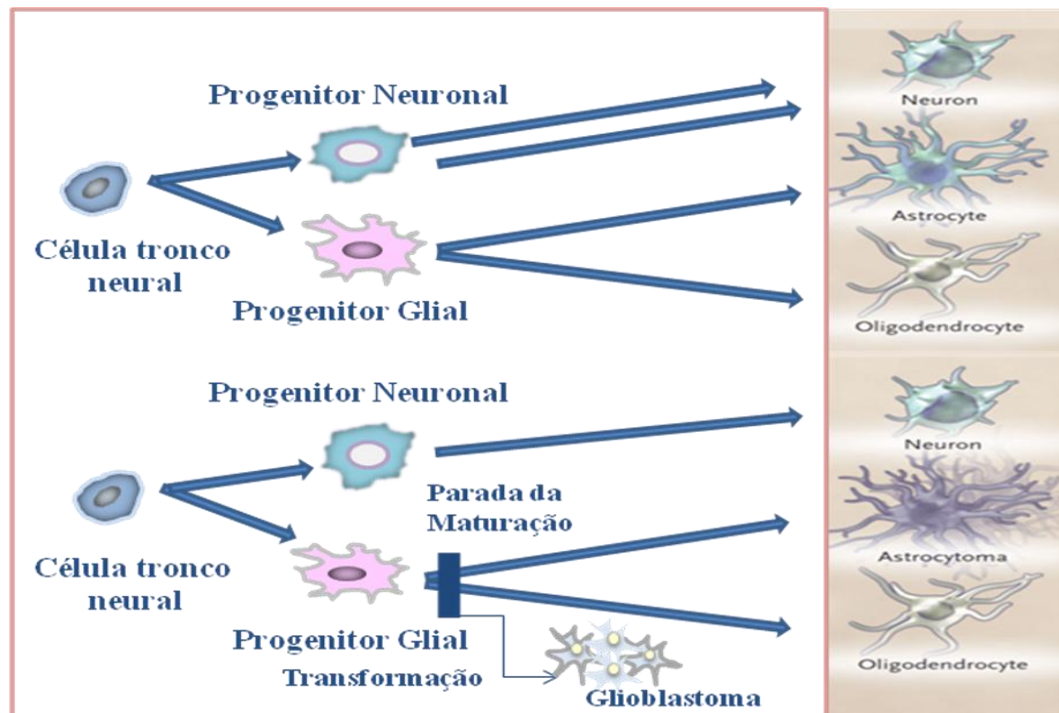


Figura 1- Teoria atual sobre a origem dos gliomas. (Adaptada de Sanai et al, 2005)

3.2 Classificação dos Gliomas

Em 2007, a Organização Mundial da Saúde (OMS) descreveu a classificação utilizada atualmente em gliomas, a qual se baseia em três parâmetros: o tipo celular, a localização tumoral e o grau de malignidade (Louis et al., 2007, Brat et al., 2007, Fuller e Scheithauer, 2007; Nakazato, 2008). Através desta classificação, é possível determinar o tipo de terapia a ser utilizada no tratamento dos pacientes, determinando particularmente o uso de radioterapia adjuvante e os protocolos específicos de quimioterapia (Louis et al., 2007).

3.2.1 Classificação dos gliomas quanto ao tipo celular

A classificação dos gliomas segundo o tipo celular é realizada a partir da análise das características histológicas, conforme a semelhança fenotípica das células tumorais com os diferentes tipos de células gliais, ou seja, com os astrócitos, oligodendrócitos ou com as células ependimais. Assim, conforme a aparência

morfológica e a presença de marcadores específicos como, por exemplo, a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) marcador de astrócitos e o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) receptor para oligodendrócitos, eles são classificados conforme apresentado na Tabela 1. Embora esta classificação histopatológica ainda seja a base para a terapia dos pacientes, existem outros critérios que são usados para avaliação e prognóstico, como: idade do paciente, estado clínico, dados radiográficos e tamanhos da área de ressecção cirúrgica (Louis, 2006). Também existem diferenças genéticas dentro desses subtipos que são de extrema importância para o prognóstico (Da Fonseca et al., 2008). Dados da análise genômica mutacional dos glioblastomas mostram que foram encontradas mutações somáticas no gene que codifica a Isocitrato Desidrogenase 1 (IDH1). Estas alterações podem auxiliar na classificação dos tumores, visto que são mais frequentes nos glioblastomas secundários e mostram um bom prognóstico, pois após cirurgia e tratamento com radioterapia esses pacientes possuem média de sobrevivência de 27,1 meses (Dang et al., 2009). Nota-se, então, a importância de uma distinção entre os tipos de gliomas, uma correta avaliação da biologia do tumor e seu grau de malignidade levando a um correto diagnóstico do paciente e um melhor prognóstico.

Tabela 1. Classificação dos gliomas quanto ao tipo celular, segundo Michote et al., 2004, Nikiforova e Hamilton, 2011.

Célula Precursora	Glioma Originado
Astrócitos	Astrocitomas
Oligodendrócitos	Oligodendrogliomas
Astrócitos, oligodendrócitos, células ependimais	Gliomas Mistos

3.2.2 Classificação dos gliomas quanto à localização tumoral

A classificação em relação à localização do glioma é feita através do local onde ele se desenvolve, com base em uma membrana que separa o cérebro

(tentorium = “teto” cerebelar) do cerebelo. Desta forma, eles podem ser classificados como supra-tentoriais, acima do tentorium e que ocorrem predominantemente em adultos ou infra-tentoriais, que se desenvolvem abaixo do tentorium, com maior predominância em crianças (Vougioukas et al., 2005; Kaloshi et al., 2009).

3.2.3 Classificação dos gliomas quanto à malignidade tumoral

O grau de malignidade dos gliomas é determinado seguindo o sistema de classificação de tumores cerebrais da Organização Mundial da Saúde (OMS) que utiliza quatro graus para descrever os gliomas, baseados na malignidade celular, nas características invasivas e na capacidade de desenvolver necrose (Chintala et al., 1999).

Os gliomas considerados de grau I são passíveis de cura por remoção cirúrgica e sem necessidade de tratamento quimioterápico, além de apresentarem baixa capacidade proliferativa, com lento crescimento, sendo geralmente encontrados em crianças e jovens. Dentre os subtipos, podemos citar o astrocitoma pilocítico (Stieber, 2001; Behin et al., 2003). Os gliomas considerados de grau II geralmente são infiltrativos, mas com crescimento lento, podendo reincidir após remoção cirúrgica. Entretanto, alguns gliomas de grau II podem progredir para gliomas mais malignos (Behin et al., 2003; Van den Bent, 2007). Estes gliomas de baixo grau não são benignos, mas apresentam um melhor prognóstico quando comparado aos gliomas de alto grau (III e IV) (Van den Bent et al, 2008; Bromberg e Van den Bent, 2009), sendo a sobrevida média destes pacientes muito superior a dos pacientes diagnosticados com gliomas malignos de alto grau (Bromberg e Van den Bent, 2009).

Os gliomas de alto grau são classificados como sendo os de grau III e IV (Behin et al., 2003). Eles apresentam características mais agressivas como indiferenciação celular ou anaplastia, pleomorfismo celular, elevada capacidade de proliferação (Behin et al., 2003), sendo o prognóstico para esses tumores desfavorável. Os gliomas de grau III são caracterizados por apresentarem evidências histológicas de malignidade, como atipia nuclear e elevada atividade mitótica, podendo progredir rapidamente a glioblastoma multiforme. Finalmente, os tumores de grau IV ou GBM são os mais comuns, apresentam características de extrema malignidade e são os mais letais de todos os gliomas, correspondendo a

cerca de 70% dos gliomas de alto grau diagnosticados (Robins et al., 2007; Kanu et al., 2009; Vredenburgh et al., 2009).

3.3 Glioblastoma Multiforme

O GBM é o tumor cerebral primário mais comum e devastador (grau IV), caracterizado histologicamente pela presença de células neoplásicas pouco diferenciadas com áreas de proliferação vascular e/ou necrose em paliçada (Sathornusumetee et al., 2008), possuem descontrole da proliferação celular, infiltração difusa no parênquima cerebral, angiogênese, intensa resistência a apoptose e elevada instabilidade genômica (Laws e Shaffrey, 1999). Os GBMs são quase sempre infiltrativos e comumente apresentam características multifocais (Dai e Holland, 2001). O padrão de crescimento multifocal, caracterizado pela formação de vários tumores espalhados pelo tecido sadio, explica sua grande capacidade de se infiltrar no parênquima cerebral que circunda o tumor, limitando a remoção cirúrgica (Stupp et al., 2007) e levando a uma rápida progressão e também a elevados índices de recorrência (Stupp et al., 2006; Yin et al., 2007). As metástases sistêmicas são raras (Armstrong et al., 2010); porém, dentro de pouco tempo, no mesmo local da lesão primária principal ou muito próximo a ela, são observadas novas lesões (Sathornsumette e Rich, 2008). Dentre as possíveis razões para a baixa propensão dos GBMs em metastizar para órgãos distantes do SNC estão incluídas a ausência de circulação linfática no cérebro e a falta de comunicação entre a barreira hematoencefálica e os espaços intra- e extracraniais.

O tecido cerebral que rodeia o tumor apresenta vários tipos de resposta inflamatória, incluindo ativação de macrófagos, astrogliose reativa, invasão vascular e formação de edema (Balassiano et al., 2006).

3.4 Alterações moleculares envolvidas na patogênese dos gliomas

Os gliomas são caracterizados por apresentarem um conjunto de alterações genéticas que afetam o controle gênico do crescimento celular, angiogênese, apoptose e invasão celular, explicando sua patogênese, rápida progressão e agressividade. Na maioria dos casos, essas alterações também afetam a expressão

de genes isolados ou a combinação de vários genes e estão correlacionadas com o grau clínico do tumor (Nagarajan e Costello, 2009; Kim et al, 2011).

Em gliomas de menor grau de malignidade, fatores de crescimento como: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2) e fator de crescimento neurotrófico ciliar (CNTF), e seus respectivos receptores geralmente estão superexpressos e a p53, que é uma proteína supressora tumoral, está frequentemente mutada. Essa proteína é responsável por diversas funções, incluindo regulação do ciclo celular, diferenciação celular, angiogênese, senescência, apoptose e resposta imune, e assim é considerada um gene supressor tumoral (Vousden e Prives, 2009; Kazufumi e Hisahiro, 2011).

Os gliomas de grau III, adicionalmente apresentam um descompasso do ciclo celular, devido a deleção do inibidor da ciclina dependente de cinase 2A (CDKN2A), amplificação da ciclina dependente de cinase 4 (CDK4), ou perda do gene do retinoblastoma (RB). Os gliomas de grau IV (GBM) apresentam todas as alterações já citadas, somadas a perda da região 10q22 – 25, porção cromossomal que carrega importantes genes supressores tumorais, entre os quais a PTEN (proteína fosfatase e homóloga a tensina) (Holland, 2001). Os tumores que expressam maiores níveis de PTEN estão correlacionados com um melhor prognóstico para os pacientes, o que sugere que a PTEN ocupa um papel decisivo na gliomagenese (Lin *et al.*, 1998). A perda da expressão da PTEN resulta em uma ativação permanente da proteína cinase B (AKT), uma das vias centrais responsável pela sobrevivência celular (Holland, 2001). A ativação da AKT medeia respostas celulares como proliferação, sobrevivência, motilidade e metabolismo (Marone et al., 2008; Roy et al., 2009;), fundamentais no processo tumoral.

Tem sido observadas alterações no gene que codifica o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), mostrando amplificação e ativação de mutações no mesmo. Quase todas essas mutações resultam em desregulação da parada do ciclo celular. Outra característica importante que difere o GBM dos tumores de menor grau é a extensiva angiogênese, que associada aos tumores mostra-se não somente uma adaptação à hipóxia, mas sim o resultado de mutações genéticas que ativam o programa transcricional da angiogênese, que é posteriormente modulado pela disponibilidade de oxigênio na área tumoral (Folkman, 2007). Entre as mutações mais relevantes estão incluídas os genes que codificam PTEN, EGFR e

CMYC e essas alterações têm como principal consequência a estabilização do HIF-1 e dos seus efetores como VEGF, PDGF ou IL-8 (Blum et al., 2005).

A soma dos efeitos provocados por alterações das vias de controle de proliferação e de sobrevivência celular, invasão e angiogênese contribui para a biologia desses tumores (Holland, 2001). A Figura 2 resume as principais vias de sinalização que contribuem para a progressão dos gliomas.

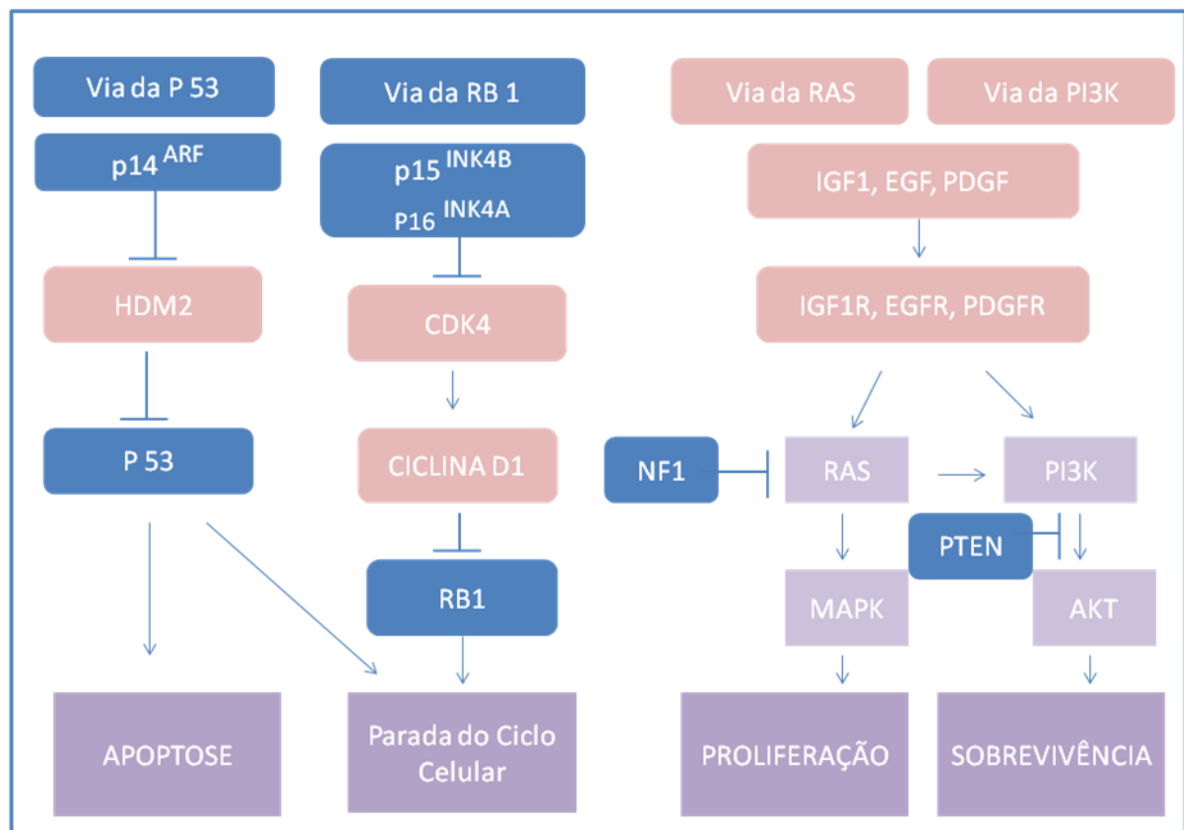


Figura 2. Principais vias de sinalização envolvidas na patogênese dos gliomas. Elementos em azul estão frequentemente inativados por mutação, deleção ou metilação do promotor; elementos em rosa estão ativados através de superexpressão ou amplificação gênica; elementos em roxo são as vias que sofrem modulação dos elementos marcados em azul e em rosa, constituindo as efetoras diretas das ações pró-tumorais (adaptado de Rich e Bigner, 2004).

3.5 Terapia para gliomas

O tratamento inicial para gliomas diagnosticados envolve ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, sendo que o fármaco preconizado para a terapia atualmente é a temozolamida (Temodal[®]), um agente alquilante que é administrado concomitante ou após a radioterapia (Sathornsumetee e Rich, 2008). Sabe-se

também que existe uma grande limitação da terapia farmacológica devido às restrições impostas pela BHE (Brandes et al., 2000).

Os gliomas malignos não são passíveis de remoção completa devido a sua capacidade infiltrativa, mas os pacientes são submetidos a ressecção cirúrgica máxima possível. Avanços nos métodos cirúrgicos tem melhorado a segurança da cirurgia e aumentado o alcance de maior parte da ressecção (Asthagiri et al., 2007).

A radioterapia é o último e considerado o tratamento mais importante para os gliomas malignos, sua implementação ao tratamento aumenta a sobrevida de pacientes de um intervalo de 3 a 4 meses para 7 a 12 meses. Segundo Stupp e colaboradores (2005), a combinação de radioterapia e temozolamida gerou um aumento na sobrevida mediana de 12,1 meses para 14,6 meses, quando comparada a radioterapia isolada.

3.6 O processo inflamatório e os gliomas

A progressão dos gliomas é um processo multifatorial, consistindo de numerosas alterações genéticas que controlam a proliferação, morte e divisão celular, conforme descrito acima. Entretanto, um grande número de evidências aponta que as alterações genéticas não garantem o desenvolvimento tumoral e indicam que interações complexas entre as células tumorais e neurônios, glia, vasculatura e sistema imune são fundamentais para a tumorigênese (Demuth e Berens, 2004). De fato, diversos tipos de câncer são originários de sítios de infecção, irritação crônica ou de inflamação. Em gliomas, a presença de infiltrado inflamatório está diretamente correlacionada com o grau de malignidade do tumor e, apesar da função das células imunes não estar completamente elucidada, evidências sugerem que a presença de leucócitos, particularmente microglia e macrófagos, no microambiente tumoral são componentes indispensáveis nos processos de proliferação, migração e sobrevivência celular e angiogênese, conforme apresentado na Figura 3.

Participação do microambiente na malignidade dos gliomas

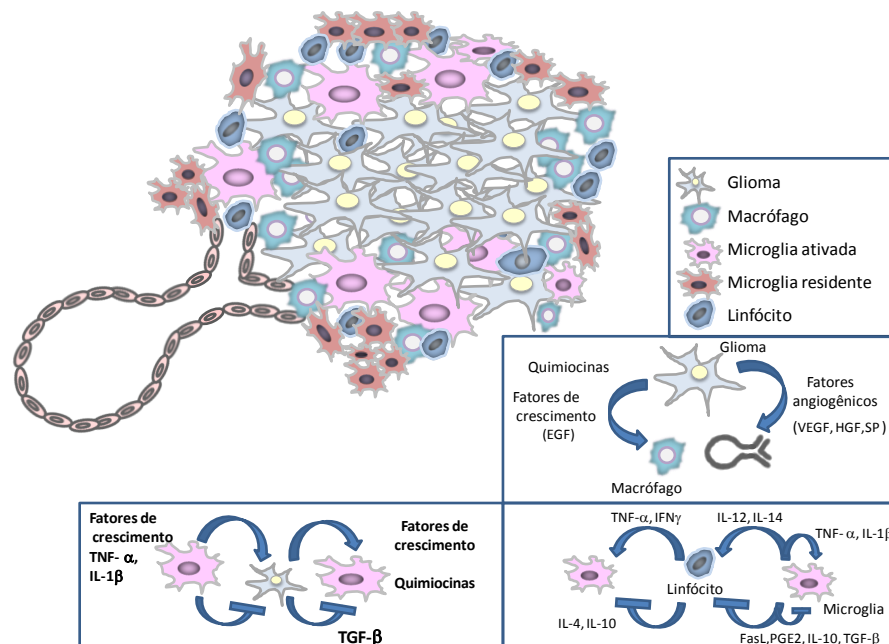


Figura 3. Possíveis interações entre células neoplásicas, macrófagos e microglia nos tumores cerebrais (Adaptado de Watters et al., 2005).

Além disso, existe uma proposta que postula que células tumorais podem modular a resposta imune ao seu favor por meio da secreção de citocinas. O modelo proposto por Chen e colaboradores (2008), é composto por 3 etapas: (1) recrutamento: através da produção de citocinas (MCP-1 e IL-8), as células tumorais recrutam células imunes para o microambiente tumoral; (2) educação: via secreção de citocinas que regulam diferenciação celular (IL-6, TNF α e MIF), as células tumorais induzem as células imunes a desempenhar funções de suporte a progressão tumoral e (3) resposta: as células imunes diferenciadas produzem citocinas, hormônios e fatores de crescimento que promovem crescimento tumoral e desenvolvimento de tolerância imune. Sabe-se também que as células tumorais podem apresentar características similares às células imunes, como por exemplo, expressão de selectinas, receptores para migração, secreção de citocinas e expressão de ciclo-oxigenases (COX), particularmente a COX-2 (Coussens e Werb, 2002; Lin e Karin, 2007).

As COXs, também chamadas de prostaglandina H sintetase, são enzimas responsáveis pela formação de prostaglandinas (PGs) a partir do ácido araquidônico. As prostaglandinas contribuem para vários processos fisiológicos,

como hemostasia, agregação plaquetária, funções gástrica e renal, dor e pirexia e processos patológicos, incluindo inflamação e câncer (Greene et al., 2011). A COX possui duas importantes isoformas: a COX-1 e a COX-2, e uma terceira isoforma recentemente descoberta, a COX-3. O perfil de expressão dessas isoformas é muito variado de tecido para tecido.

A COX-1 foi a primeira a ser caracterizada e está presente em todas as células, principalmente no endotélio dos vasos sanguíneos, plaquetas, estômago e rins e apresenta funções fisiológicas conduzindo à produção de prostaglandinas anti-trombogênicas, citoprotetoras da mucosa gástrica e envolvidas na manutenção da função plaquetária e renal. A COX-2 é frequentemente uma enzima induzível e geralmente indetectável na maioria dos tecidos saudáveis, mas seu nível aumenta drasticamente em tecidos inflamados. Essa enzima pode ser induzida por citocinas, incluindo IL-1, IL-2 e TNF α , sendo expressa por células envolvidas no processo inflamatório, como os macrófagos e monócitos (Giamarellos-Bourboulisa et al., 2003). A COX-2 é responsável pela maior produção de prostanóides durante períodos inflamatórios e superexpressa em diversos tipos de cânceres.

A terceira isoforma relatada é a COX-3, entretanto, essa enzima é uma proteína inativa e resultados demonstram que ela é um “splicing” alternativo da COX-1 (Cebola e Peinado, 2012). Sabe-se que ela é codificada pelo mesmo gene desta isoforma e encontra-se distribuída principalmente no córtex cerebral, medula espinhal e coração.

A COX-2 destaca-se por possuir um papel importante na regulação da proliferação e diferenciação celular e na tumorigênese (DuBois et al., 1996 e Bornfeldt et al., 1997). Essa enzima está superexpressa em diversos tecidos neoplásicos, como em câncer de cólon, próstata e de mama (Casper et al., 2000; Bertagnolli, 1999; Howe et al., 2001; Higashi et al., 2000). A expressão da COX-2 pode ser inibida por glicocorticóides, IL-4, IL-10 e IL-13, enquanto que a PGE₂ promove um aumento de sua expressão. Esta enzima pode também ser regulada de modo pós-transcricional. A perda de regulação pós-transcricional da COX-2, pela mutação de proteínas que interatuam especificamente em determinados elementos do ácido ribonucléico mensageiro (m-RNA) da enzima, pode resultar em um aumento da expressão da COX-2, cujo mecanismo tem sido proposto como fator crucial envolvido na carcinogênese do intestino (Fernandes et al., 2003).

Em gliomas, o aumento da expressão da COX-2 está associado a tumores mais agressivos e com um pior prognóstico (Shono et al., 2001). Assim, a utilização de medicamentos anti-inflamatórios não esteróides (AINES) e inibidores específicos de COX-2 têm emergido como um possível tratamento e prevenção de tumores (Pouliot et al.; 2002).

3.7 O sistema purinérgico e a inflamação

Geoffrey Burnstock em 1972, após observar a ação do ATP como transmissor em nervos inibitórios não adrenérgicos não colinérgicos em *Taenia coli* de roedores propôs o conceito de transmissão purinérgica (Burnstock, 1972). Ainda segundo Burnstock (2008), essa sinalização intercelular seria mediada por purinas e está presente na evolução desde cedo, sendo considerada então, uma rota amplamente distribuída para a comunicação célula-célula.

A função que normalmente se associou aos nucleosídeos e nucleotídeos derivados de purinas sempre foi particularmente intracelular, como fornecimento de energia para processos intracelulares. Atualmente sabe-se que essas moléculas também atuam como mensageiros extracelulares, através de ligação em receptores purinérgicos específicos (Abbraccio et al., 1999; Burnstock e Knight, 2004), e são capazes de sinalizar uma variedade de efeitos biológicos no meio extracelular (Burnstock, 2007) suas ações são finalizadas pela ação de ectoenzimas que realizam a hidrólise dos nucleotídeos.

Acredita-se que a liberação de adenosina trifosfato (ATP), um dos principais agonistas do sistema purinérgico, ocorre através de dano celular, através de células gliais em resposta à injúria mecânica ou por hipóxia. Existem ainda suposições que o ATP pode ser liberado para o meio extracelular por meio de transportadores e por exocitose de vesículas (Bodin et al., 2001; Burnstock, 2007; Lazarowski et al., 2003) conforme demonstrado na figura 4.

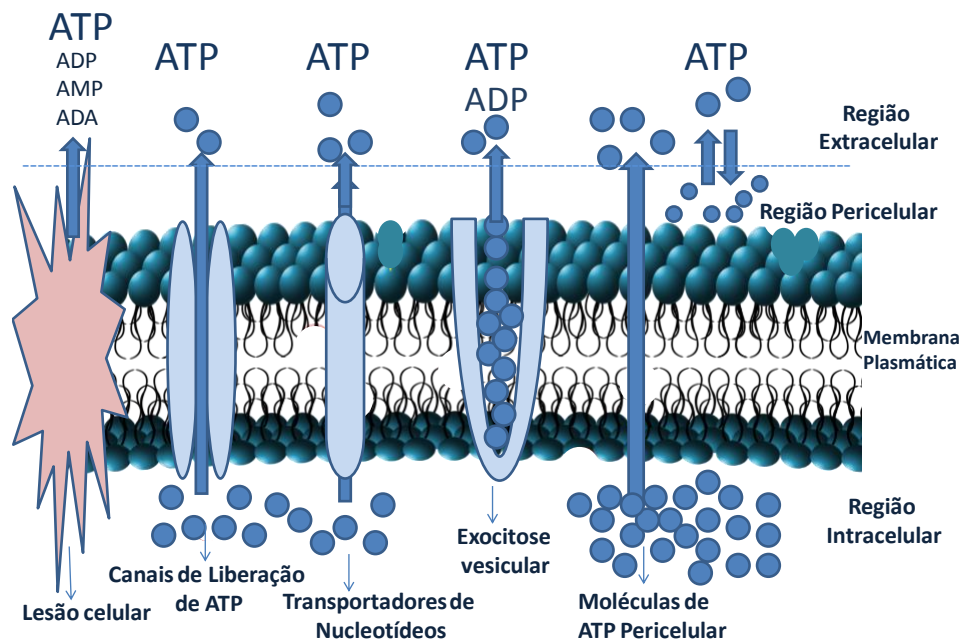


Figura 4. Demonstração das vias de liberação do ATP para o meio extracelular (Adaptado de Yegutkin, 2008).

Após liberação dos nucleotídeos para o meio extracelular, os mesmos sensibilizam receptores purinérgicos específicos, mediando diferentes respostas, como neurotransmissão, resposta imune, inflamação, agregação plaquetária (Burnstock, 2006; 2007) e ainda podem ser responsáveis pela regulação de funções patofisiológicas em diversos tecidos, incluindo doenças inflamatórias, neurodegenerativas, doenças vasculares e câncer (Burnstock, 2008). Esses receptores purinérgicos são conhecidos como purinoreceptores e se dividem em receptores do tipo P1 (possuem adenosina como principal agonista) e P2 (possuem ATP e ADP como principais agonistas) como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Receptores Purinérgicos.

Receptores P1		Receptores P2	
Ligante natural	Adenosina	ATP, ADP, UTP, UDP	
Tipo	Acoplado a proteína G	Canal Iônico	Acoplado a proteína G
Subgrupo	-	P2X	P2Y
Subtipo	A ₁ , A _{2A} , A _{2B} , A ₃	P2X ₁₋₇	P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₆ , P2Y ₁₁ , P2Y ₁₂ , P2Y ₁₄

Classificação de receptores purinérgicos (Adaptado de Ralevic e Burnstock, 1998).

Os efeitos causados pela presença dos nucleotídeos no meio extracelular podem ser controlados através da funcionalidade das células, da expressão de receptores purinérgicos específicos e pela atividade das ectoenzimas que são capazes de controlar a disponibilidade dos agonistas purinérgicos, como o ATP e a adenosina, nessas células (Robson et al., 2006). Nesse grupo de enzimas, que também são conhecidas como ectonucleotidases, estão incluídas: as ectonucleosídeo-trifosfo-difosfohidrolases (E-NTPDases), as ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPPs), as ecto-fosfatases alcalinas e a ecto-5'-nucleotidase/CD73 (ecto-5'-NT/CD73) e a adenosina deaminase (ADA) (Robson et al., 2006; Zimmermann, 2001). As ectonucleotidases compõem uma cascata enzimática que tem como função a degradação de nucleotídeos e formação dos respectivos nucleosídeos, controlando assim o tempo que os mesmos permanecem no meio extracelular (Zimmermann, 2001). Portanto, fazem parte do sistema purinérgico, regulando essa sinalização através da finalização do estímulo (Robson et al., 2006).

O ATP possui funções pró-inflamatórias e está envolvido em diversas funções do sistema imune, como secreção de INF- γ e IL-2 nas células T (Langston et al., 2003) estimulando a proliferação de linfócitos, induzindo migração e diferenciação nas células dendríticas (la Sala et al., 2003), e ainda nos macrófagos estimula a produção de IL-1 (Elssner et al., 2004) e TNF- α (Guerra et al., 2003). Essa sinalização induzida pelo ATP extracelular correlaciona-se diretamente com a

atividade da enzima E-NTPDase, que é responsável pela hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatados, incluindo ATP e ADP, levando a formação de nucleotídeos monofosfatados (Zimmermann et al., 2007). O AMP (nucleotídeo monofosfatado) gerado ao final deste processo é hidrolisado à adenosina pela ação da enzima ecto-5'-NT/CD73, que associada à membrana plasmática catalisa a hidrólise de nucleotídeos monofosfatados até seu respectivo nucleosídeo.

A adenosina, principal produto da hidrólise do ATP, também é considerada uma molécula sinalizadora de dano celular, porém com ações contrárias as do ATP (Bours et al., 2006). Esse nucleosídeo medeia uma resposta imunossupressora, inibindo produção de citocinas inflamatórias (IL-12, INF- γ , MIPs) (Stewart e Harris, 1993; Hasko et al., 2009) e a atração de linfócitos a respostas inflamatórias (Odashima et al., 2005), conseguindo assim, proteger os tecidos saudáveis dos ataques promovidos pelas células de defesa (Sitkovsky e Ohta, 2005). As principais enzimas responsáveis pela metabolização da adenosina são a adenosina cinase, que gera o AMP e a ADA que é responsável pela hidrólise da adenosina em inosina (Latini e Pedata, 2001).

3.8O processo inflamatório e a utilização de AINES

A inflamação é um processo fisiológico que consiste na resposta orgânica diante de lesão tissular ou infecção, envolvendo uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido no qual ocorreu a lesão (Cotran et al., 2006). Assim, inflamação é um termo geral usado para as mudanças que podem ocorrer nos tecidos vascularizados, como resposta a danos teciduais, infecções ou reações imunológicas (Spinosa et al., 2006).

No caso de uma evolução favorável, o processo inflamatório passa então para fase de reparação havendo a eliminação do agente causal, a formação de tecido de granulação e a cicatrização. Entretanto, em algumas situações e doenças, essa resposta pode se tornar excessiva, sem qualquer benefício e com sérios efeitos adversos (Cotran et al., 2000) ou pode haver a cronificação do processo (Spinosa et al., 2006; Gilman et al., 2006; Katzung, 2006).

Os AINES apresentam três tipos principais de ações farmacológicas: anti-inflamatória, analgésica e antipirética. Em geral, todos estes efeitos estão

relacionados à inibição da enzima COX e, conseqüentemente, inibição da síntese de prostaglandinas e tromboxanos (Rang et al., 2001). A descoberta da existência de duas isoformas da enzima, a COX-1 e a COX-2, permitiu verificar que as ações anti-inflamatórias são devidas à inibição da COX-2, enquanto que os efeitos secundários serão atribuídos à inibição da COX-1. Esta foi a base teórica para o desenvolvimento dos inibidores seletivos da COX-2. Os AINES, ao inibirem a COX e, conseqüentemente a síntese de prostaglandinas (PGI_2 , PGE_1 e PGE_2), diminuem a vasodilatação, causam efeitos inibitórios nos nociceptores, no centro termorregulador hipotalâmico e modulam os sinais e sintomas da inflamação (Feldman; McMahon, 2000).

A expressão da COX-2 ocorreria após estímulo inflamatório nas células migratórias e tecidos lesados e, por isso, foi chamada indutiva. Esse estímulo está relacionado à presença de citocinas, fatores de crescimento e estimulantes tumorais, sugerindo sua relevância no câncer e em processos inflamatórios (Chan et al., 1999; Kummer e Coelho, 2002; Franco et al., 2006; Hazewinkel et al., 2008; Steagall et al., 2009). Vários tipos de tumores superexpressam COX-2, como tumor de cólon, de mama (Hwang et al., 1998), de pele (Muller-Decker et al., 1999) e de bexiga (Shirahama et al., 2000), sendo que a presença de COX-2 pode ser essencial para a vascularização e crescimento do tumor (Thun et al., 1991). Sugere-se inclusive que a expressão de COX-2 possa ser constitutiva em alguns tipos de tumores, como observado em áreas de necrose de gliomas humanos (Shono et al., 2001). Estudos mostram que a utilização de AINES como acetaminofeno, flurbiprofeno, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno e cetoprofeno reduziu a proliferação de diferentes tipos de células tumorais, incluindo tumores de esôfago, pulmão e tumores cerebrais (Joki et al., 2000; Casper et al., 2000). Alguns autores sugerem que a COX possa estar envolvida na regulação da proliferação celular, apoptose (Tsuji et al., 1995) e na interação tumor-vasos sanguíneos (Howe et al., 2001). Entretanto, a função desempenhada pelas PG e pela COX na patogênese do câncer ainda não está definida.

3.9 Cetoprofeno

O cetoprofeno, ácido [2-(3-benzoilfenil) propanóico] (Figura 5) é considerado um AINE não seletivo, e um anti-inflamatório não-esteróide pertencente à classe dos ácidos arilalcanóicos, considerado um dos mais potentes inibidores da COX dentro das concentrações terapêuticas. Seu mecanismo de ação está envolvido na inibição da COX que resulta no bloqueio da síntese de prostaglandinas.

Esse fármaco também atua inibindo a bradicinina, que medeia dor e inflamação, o que diminui o efeito potencializante da fase vascular inflamatória e da dor, inibindo a síntese de PGs e levando a atividade antinociceptiva periférica comum dos AINES (Narita et al., 2005). Também é capaz de estabilizar as membranas lisossômicas contra a alteração osmótica, impedindo a liberação de enzimas que medeiam reações inflamatórias e causam destruição tecidual (Ashvini et al., 2011).

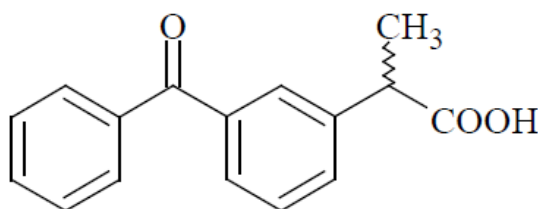


Figura 5- Estrutura química do cetoprofeno (ácido [2-(3-benzoilfenil) propanóico]). (Fonte: Farmacopéia Brasileira, 2010).

A absorção do cetoprofeno ocorre rapidamente pela via oral e possui um pico plasmático entre 0,5 - 2 horas após a administração. Esse fármaco apresenta elevada ligação a proteínas plasmáticas (99 %) e é metabolizado em sua menor parte por hidroxilação e a maior parte por conjugação ao ácido glicurônico (França; Korolkovas, 2006). A dose comumente empregada em humanos por via oral situa-se entre 50 e 300 mg (dose máxima diária). Já em ratos, a dose recomendada é de 5 mg/kg (Viana, 2007).

Apesar de o cetoprofeno apresentar uma grande eficiência no tratamento da dor aguda e crônica, sua administração é acompanhada por alguns efeitos colaterais importantes (França; Korolkovas, 2006). Essa molécula pode ser causadora de lesões agudas gastrointestinais que estão entre os efeitos colaterais mais frequentes e graves associados com AINES convencionais, ocasionando risco de perfurações e ulcerações gástricas (Lipsky, 2000; Buttgereit, et al., 2001). Apesar dos AINES desencadearem esses efeitos colaterais, são considerados relativamente seguros (Yuan et al, 2006), sendo que a terapia com esse tipo de medicamento vem ocorrendo a mais de um século (Kontogiorgis e Hadjipavloulitina, 2002). Com a finalidade de aumentar o potencial terapêutico, ao mesmo tempo em que se minimizam os efeitos colaterais, a utilização de fármacos através de sistemas nanoestruturados chega como uma alternativa promissora para o tratamento de diferentes patologias. Uma das principais razões do uso de sistemas de entrega de fármacos são as melhorias na concentração do fármaco no local de ação devido à maior permanência neste local e a concomitante diminuição de efeitos colaterais (Torchilin, 2007).

3.10 Nanocápsulas poliméricas de Cetoprofeno

Diferentes sistemas carreadores, tais como os lipossomos e as nanopartículas têm sido utilizados devido as diversas vantagens como vetores. Algumas das principais razões do uso de sistemas de entrega de fármacos são as melhorias na concentração do ativo no local de ação devido à maior permanência neste local (Torchilin, 2007). Esses sistemas proporcionam um aumento do índice terapêutico desses fármacos, modificando sua distribuição, reduzindo sua toxicidade e aumentando a eficácia terapêutica.

As nanopartículas constituídas de polímeros biodegradáveis têm atraído considerável atenção como veículos de distribuição de fármacos pelo potencial de suas aplicações na liberação controlada de ativos, na sua capacidade de focalização em determinados órgãos e tecidos, como portadores de DNA (ácido desoxirribonucléico) na terapia gênica e na sua capacidade de entregar proteínas, peptídeos e genes (Langer, 2000). O tamanho da nanocápsula pode variar entre 10 a 1000 nm e sua preparação se inicia com o fármaco dissolvido, aprisionado,

encapsulado ou ligado a uma matriz da nanopartícula e, conforme a metodologia de preparação pode ser obtida nanopartículas em forma de nanocápsulas ou nanoesferas (Figura 6) (Soppimath et al, 2001). Sendo que as nanocápsulas são sistemas vesiculares no qual o medicamento é confinado em um núcleo oleoso e/ou adsorvido a parede polimérica (Couvreur et al, 2002).

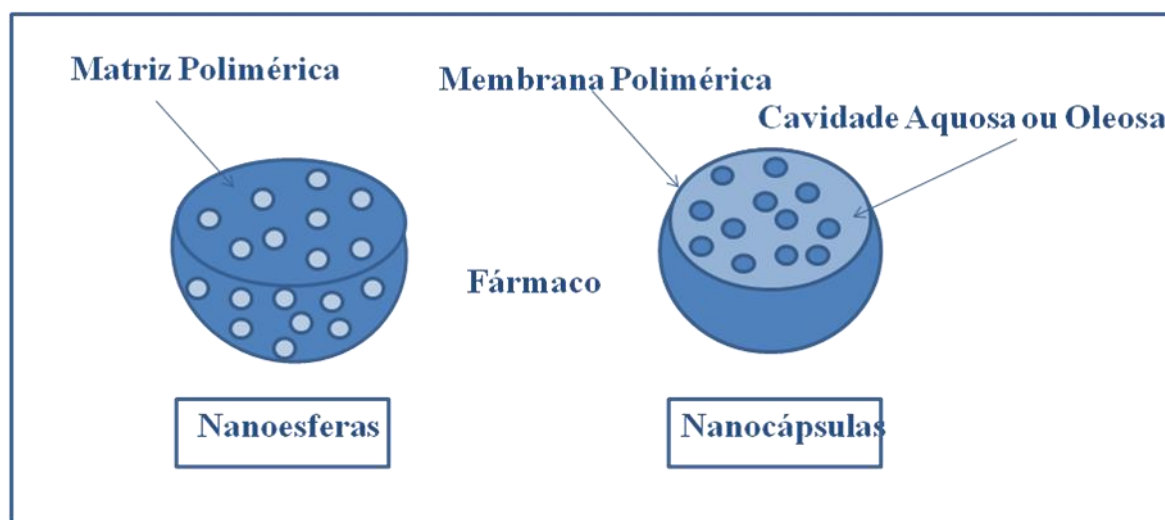


Figura 6. Nanopartículas. Ilustração representativa de nanoesferas e nanocápsulas (Adaptado de Dos Santos e Fialbo, 2008).

Sabe-se também que a BHE impõe limitações a terapia de doenças que atingem o SNC. Essa barreira separa o parênquima cerebral do sistema circulatório, protegendo o SNC de agentes patógenos, bem como de agentes terapêuticos (Beduneau, Saulnier e Benoit, 2007). A BHE limita a entrada de substâncias, de modo que apenas fármacos altamente lipofílicos podem ser utilizados no tratamento de patologias do SNC. Assim, as nanocápsulas surgem como estruturas de grande potencial para facilitar a penetração de fármacos através da BHE, melhorando a qualidade de vida dos pacientes e aumentando o leque de aplicações de fármacos já utilizados na terapia (Garcia Garcia et al, 2005). O mecanismo de ação o qual estabelece a passagem dessas estruturas pela BHE ainda não está estabelecido, mas alguns autores relatam que o cruzamento dessa barreira por nanopartículas poliméricas pode ocorrer por endocitose (Lockman et al, 2004; Park, 2009).

Portanto, a utilização de cetoprofeno em formulações de nanocápsulas pode ser uma alternativa promissora por se tratar de uma formulação capaz de atravessar

a BHE e de permitir a liberação controlada do fármaco em sítios específicos, visando uma diminuição dos efeitos tóxicos e um aumento do índice terapêutico, podendo assim controlar o microambiente inflamatório e consequentemente a progressão dos gliomas.

4. Artigo Científico

KETOPROFEN-LOADED LIPID-CORE NANOCAPSULES SELECTIVELY INHIBIT CANCER CELL GROWTH IN VITRO AND IN PRECLINICAL MODEL OF GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Elita F. da Silveira¹, Janaíne M. Chassot², Fernanda C. Teixeira¹, Juliana H. Azambuja¹, Gabriela Debom¹, Rodrigo S. Rodrigues¹, Fátima T. Beira³, Francisco A.B. Del Pino¹, Adriana da S. Lourenço³, Ana P. Horn⁴, Letícia Cruz², Roselia M. Spanevello¹, Elizandra Braganhol^{1*}.

¹Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

²Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

³Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

⁴Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil.

***Corresponding Author**

Elizandra Braganhol (E-mail: elizandra.braganhol@ufrgs.br)

Bioquímica – Prédio 29; Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos

Universidade Federal de Pelotas - Campus Capão do Leão - s/n

CEP 96010900 - Caixa Postal 354; Pelotas, RS, Brasil

Phone: 55 53 3275 7355 FAX: 55 53 3275 7354

Abstract

GBM is the worst and most common brain tumor, characterized by high proliferation and invasion rates. Nanoparticles of biodegradable polymers for anticancer drug delivery have attracted interest in recent years since they provide targeted delivery and may overcome the obstacle imposed by blood-brain barrier. Here we investigated the antitumoral effect of ketoprofen-loaded nanocapsules (Keto-NC) treatment on *in vitro* and *in vivo* glioma progression. We observed that Keto-NC treatment decreased selectively the cell viability of a panel of glioma cell lines, while did not exhibit toxicity to astrocytes. We further demonstrate that the treatment with sub-therapeutic dose of Keto-NC reduced the *in vivo* glioma growth as well as reduced the malignancy characteristics of implanted tumors. Keto-NC treatment improved the weight, the locomotion/exploration behavior of glioma-bearing rats. Importantly, Keto-NC treatment neither induced mortality or peripheral damage. Finally, Ketoprofen also altered the extracellular nucleotide metabolism of peripheral lymphocytes, suggesting that antiinflammatory effects of ketoprofen could also be associated with the modulation of the adenine nucleotide metabolism in lymphocytes. Data indicate at first time the potential of Keto-NC as a promising therapeutic alternative to GBM treatment.

Key words: Gliomas, Ketoprofen, Polymeric nanocapsules, Drug delivery.

Introduction

Glioblastoma multiforme (GBM) is the worst and most common form of malignant brain tumor. These tumors are relatively resistant to therapeutic strategies and its high proliferation rate and infiltrative growth pattern precludes curative neurosurgery, which result in a poor prognosis for patients¹. In addition, the blood-brain barrier (BBB) limits the penetration of drugs to CNS restricting the glioma therapy and favoring the development of chemoresistance². An alternative approach to overcome the BBB is the employment of nanocarriers, which improve the selective delivery of antitumor agents to brain and avoid the side effects of conventional chemotherapy³.

The development of nanocarriers as delivery systems is a promising technological tool for the development of target therapies, mainly for oncology applications. Indeed, drug-loaded nanoparticles improve the selectivity of anticancer drugs to cancer cells, which reduce the severe side-effects of chemotherapy, increase the therapeutic index and circumvent drug resistance⁴. Nanocarrier systems also provide efficient drug protection⁵, cell internalization⁶, controlled drug release and transport^{7,8} and greater solubility for lipophilic drugs, offering a pharmaceutical solution for their intravenous administration⁹. Moreover, since nanoparticles have been shown to cross the BBB, nanotechnology-based approach is an interesting strategy to CNS targeted drug delivery, an important requirement of novel therapies against gliomas¹⁰.

Increasing evidence indicates that chronic inflammatory conditions facilitate the cancer progression¹¹⁻¹³. Although the mechanism that correlates cancer and inflammation are not clear, the presence of an inflammatory microenvironment composed by non-malignant cells such as lymphocytes, microglial and macrophages is related to increased glioma malignity by modulating cell proliferation and angiogenesis¹⁴. Malignant gliomas generate several immunomodulatory mechanisms that result in evasion and suppression of immune system. For example, constitutive NF-Kb activity in cancer cells has been related to

expression of apoptosis resistance genes (bcl-xL and survivin) and inflammation genes (IL1- β , IL-6 and COX-2)¹⁵. These alterations correlate to increased tumor malignancy e chemoresistance¹⁶⁻¹⁸. In addition, a role of cyclooxygenase (COX), mainly COX-2, in cancer cell proliferation, apoptosis inhibition and evasion of immune response has been proposed¹⁹. The COX-2 expression and its products PGE2 in combination with TGF-beta release and STAT-3 inhibition contribute to recruitment and expansion of T regulatory cells and tumor associated macrophages, which further modulate the immunosuppressive environment of glioma²⁰.

In this context, studies have suggested that molecules with COX inhibitory properties are potential anticancer agents²¹⁻²³. Indeed, researchers have blocking COX activity via COX inhibitors, the members of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID; aspirin, indomethacin, ketoprofen, celecoxib) in order to inhibit the growth of gliomas^{21,24}; melanomas²⁵; ovarian²⁶; colorectal cancer²⁷; prostate cancer²⁸ and osteosarcoma²⁹. In addition, a positive correlation between COX-2 expression and poor survival of GBM patients was reported¹⁹, suggesting that COX inhibitors could be also considered in GBM treatment.

Therefore, taken into account the limited success of glioma therapy and the advantages of nanoparticulated systems for drug delivery to CNS, the aim of the present study was to investigate the antitumoral effect of ketoprofen-loaded nanocapsule treatment on *in vitro* and *in vivo* glioma progression. The results shown here give new insights into how ketoprofen-loaded nanocapsules may contribute to antiglioma therapy.

Materials and methods

Chemicals

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Fungizone, penicillin/streptomycin, 0.25% trypsin/EDTA solution and fetal bovine serum (FBS) were obtained from Gibco (Gibco BRL,

Carlsbad, CA, USA). Ketoprofen (99.45% w/w) was purchased from Henrifarma (São Paulo, SP, Brazil). Medium chain triglycerides were purchased from Brasquim (Porto Alegre, RS, Brazil). Poly(ϵ -caprolactone) and Span 80[®] (sorbitan monooleate) were acquired from Sigma Aldrich (São Paulo, Brazil) and Tween 80[®] (polysorbate 80) was supplied by Delaware (Porto Alegre, RS, Brazil). HPLC-grade methanol was acquired from Tedia (São Paulo, SP, Brazil). Other solvents and reagents were of analytical grade and used as received.

Preparation of nanocapsules

Nanocapsule suspensions were prepared by interfacial deposition of poly(ϵ -caprolactone). An organic phase constituted of polymer (0.100 g), acetone (27 mL), Span 80[®] (0.077 g), ketoprofen (0.01 g) and medium chain triglycerides (0.300 g) was kept for 60 minutes under moderate magnetic stirring at 40°C. After solubilization of all components, the acetone solution was poured to 53 mL of an aqueous dispersion of Tween 80[®] (0.077 g) and the magnetic stirring was maintained for 10 min. In the sequence, the organic solvent and part of the water were eliminated by evaporation under reduced pressure to achieve a final volume of 10 mL and ketoprofen concentration of 1mg/mL. For comparison, formulations without the drug (blank nanocapsules) were also prepared. All samples were made in triplicate.

Characterization of nanocapsule suspensions

The pH of nanocapsule suspensions was verified by directly immersing the electrode of a calibrated potentiometer (Model pH 21, Hanna Instruments, São Paulo, Brazil) in the formulations. The measures were performed at room temperature (25°C $\pm$ 2) in triplicate of batch. Particle sizes and polydispersity indexes (n=3) were determined by photon correlation spectroscopy (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, UK) after diluting the samples in

ultrapure water (1:500). Zeta potentials were measured using the same instrument after the dilution of the samples in 10 mM NaCl (1:500).

***In vitro* ketoprofen release study**

Release profiles of ketoprofen were obtained by dialysis diffusion technique at 37°C in 150 mL of phosphate buffer (pH 7.0). The samples, either free drug in methanolic solution (MS) or nanoencapsulated (NC), were placed in the dialysis bag (MWCO 10,000, Spectra Por 7) and this system was kept under continuous magnetic stirring of 50 rpm. Aliquots of 1 mL were withdrawn at predetermined times and replaced by the same volume of fresh medium. The amount of ketoprofen released was assayed by HPLC. The experiment was performed in triplicate.

General cell culture procedures

The rat (C6) and human (U138MG, U251MG) malignant GBM cell lines were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). The cells were grown and maintained in low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA) containing 0.1% Fungizone and 100 U/L gentamicin and supplemented with 5% or 10% FBS. Cells were kept at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Primary astrocyte cultures were prepared as previously described³⁰. Briefly, cortex of newborn Wistar rats (1-2 days old) were removed and dissociated mechanically in a Ca⁺² and Mg⁺² free balanced salt solution, pH 7.4, (137 mM NaCl, 5.36 mM KCl, 0.27 mM Na₂HPO₄, 1.1 mM KH₂PO₄, and 6.1mM glucose). After centrifugation at 1000 rpm for 5 min, the pellet was resuspended in DMEM supplemented with 10% FBS. The cells (1×10⁵) were plated in poly-L-lysine-coated 96-well plates. After 4-h plating, plates were gently shaken and phosphate-buffered saline (PBS)-washed, and medium was changed to remove neuron and

microglia contaminants. Cultures were allowed to grow to confluence by 20–25 days. Medium was replaced every 4 days.

***In vitro* treatment**

Ketoprofen in solution was dissolved in cell culture-grade dimethylsulphoxide (DMSO; Sigma). The ketoprofen-loaded nanocapsules and drug-unloaded nanocapsules were prepared as described above. The glioma cells were seeded at 1×10^3 cells/well in DMEM/5% FBS for C6 line or DMEM/10% FBS for U138MG and U251MG in 96-well plates. Astrocyte cultures were prepared as described above. Cultures were exposed for 48 h or 72 h to formulations: ketoprofen or ketoprofen-loaded (1, 10, 50, and 100 μ M). Control cells were treated with vehicle, ie, 1% of DMSO or with drug-unloaded nanocapsules.

Cell viability assay

Following treatments, cell viability was assessed by the 3-(4, 5-dimethyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. This method is based on the ability of viable cells to reduce MTT to a blue formazan product. MTT solution (sterile stock solution of 5 mg/mL) was added to the incubation medium in the wells at a final concentration of 0.5 mg/mL. The cells were left for 60 min at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. The medium was then removed and plates were shaken with DMSO for 30 min. The optical density of each well was measured at 492 nm. Results were expressed as absorbance.

Propidium iodide assay

Cellular damage was assessed by fluorescent image analysis of propidium iodide (PI) uptake. At the end of the treatment, U138MG glioma cells were incubated with PI (7.5 μ M) for 1 h. PI fluorescence was excited at 515–560 nm using an inverted microscope (Olympus IX71,

Tokyo, Japan) fitted with a standard rhodamine filter. Images were captured using a digital camera connected to the microscope.

Glioma implantation

C6 glioma cells were cultured to approximately 70% confluence and a total of 1×10^6 cells in 3 μ L DMEM with 5% FBS was injected in the right striatum at a depth of 6.0 mm (coordinates with regard to bregma: 0.5 mm posterior and 3.0 mm lateral) of male Wistar rats (250–270 g, 8 weeks old) anesthetized by intraperitoneally (i.p.) administration of ketamine and xilazine³¹. The same procedure was carried out for the negative control group, except that 3 μ L DMEM with 5% FBS (no cells) was injected. All procedures used in the present study followed the Principles of Laboratory Animal Care from NIH and were approved by the Ethical Committee of the Universidade Federal de Pelotas.

Treatment of animals

Five days after glioma implantation, the animals were randomly divided into four groups as follows: (1) Control (DMSO-treated); (2) NC (drug-unloaded nanocapsules); (3) Keto-free (treated with 3 mg/Kg/day of Ketoprofen dissolved in DMSO); (4) Keto-NC (3 mg/Kg/day of ketoprofen-loaded nanocapsules). The formulations were administered i.p. to the animals for 15 consecutive days. After 20 days (5 days for glioma implantation + 15 days for treatment), the rats were decapitated and the entire brain was removed, sectioned and fixed with 10% paraformaldehyde. Blood samples were collected from all animals for posterior enzymatic assays (alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, creatinine and urea). For body weight analysis, the experimental groups were compared to the control group.

Pathological analysis and tumor volume quantification

At least five Hematoxylin and Eosin (HE) sections (2-3 μm thick, paraffin embedded) from each animal were analyzed by a pathologist. For tumor size quantification, images were captured using a digital camera connected to a microscope (Nikon Eclipse TE300) and the tumor area (mm^2) was determined using Image Tool SoftwareTM. The total volume (mm^3) of the tumor was computed by the multiplication of the slice sections and by summing the segmented areas³².

Behavioral assay

After 19 days of tumor implantation, animals were exposed to an Open Field assay. Open field exploration was carried on a 40 x 45 cm arena, surrounded by 45 cm high walls, made of brown plywood with a frontal glass wall. The floor of the arena was divided into nine equal squares by black lines. Rats were put in the apparatus, placed on its left rear quadrant, and left to freely explore the arena for 5 min. Crossings of the black lines, rearings, grooming and fecal bolus performed were counted. The number of crossings and rearings was used respectively as measures of locomotor activity and exploratory behavior, whereas the number of grooming and fecal bolus was used as measures of anxiety. Comparisons were made between the Control, NC, Keto-free and Keto-NC groups.

Isolation of lymphocytes

Lymphocytes were isolated from blood collected with EDTA and separated on Ficoll-Histopaque density gradients as described by Böyum and colleagues³³.

NTPDase enzyme assay

After isolation of lymphocytes, the NTPDase activity was determined as described by Leal and colleagues³⁴ where the reaction medium contained 0.5 mM CaCl_2 , 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM glucose and 50 mM the Tris HCl buffer pH 8.0, at a final volume of 200 μL . Twenty microliters of the intact mononuclear cells suspended in saline solution was added to the reaction medium (2-4 μg of protein) and pre-incubated for 10 min at 37°C and incubation proceeded for 70 minutes. The reaction was initiated by the addition of substrate (ATP or ADP) at a final concentration of 2.0 mM and stopped with 200 μL of 10% trichloroacetic acid (TCA). The released inorganic phosphate (Pi) was assayed by the method of Chan and colleagues³⁵ using malachite green as colorimetric reagent and KH_2PO_4 as standard. Controls were carried out by adding the enzyme preparation after TCA addition to correct for non-enzymatic nucleotide hydrolysis. Protein was measured by the Coomassie blue method according to Bradford³⁶ using serum albumin as standard. All samples were run in triplicate and the specific activity is reported as mol Pi released/min/mg of protein.

ADA enzyme assay

Adenosine deaminase activity was measured spectrophotometrically in lymphocytes by the method of Giusti and Gakis³⁷. The ammonia produced was measured using the colorimetric technique of the Berthelot reaction. Briefly, the ammonia reacts in the presence of the catalyst sodium nitrosylpentacyanoferrate (III) with the hypochlorite and phenol, under alkaline, to form the intense blue indofenol. The ammonia concentration is directly proportional to the absorption of indofenol in 650 nm (620-650 nm). The reaction catalyzed by ADA is interrupted at the end of the incubation period (60 min/37°C) by the addition of a nitroprusside and phenol solution. The specific activity is reported as U/L.

Statistical analysis

Data were expressed as mean $\pm$ SD and were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey–Kramer post-hoc test (for multiple comparisons). Differences between mean values were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Characterization of nanocapsule suspensions and *in vitro* ketoprofen release evaluation

After preparation, nanocapsule suspensions showed a milky appearance with an opalescent bluish reflection (Tyndall effect), regardless of the presence of drug. These characteristics are in accordance with other nanocapsule systems reported in the literature^{38,39}. The pH determination revealed that the samples (drug-loaded and blank formulations) possess values around 5.0, which is in accordance with other nanocapsule suspensions prepared with PCL⁴⁰. As for the evaluation of particle sizes, nanocapsules showed average diameter smaller than 270 nm. Regarding the literature, polymeric nanocapsules usually have dimensions between 100-500 nm⁴¹. Furthermore, polydispersity indexes were lower than 0.2, which indicates a narrow size distribution. Concerning zeta potential, the nanocapsules showed negative values, which is in accordance with the anionic nature of their components.

Concerning *in vitro* drug release experiments, Figure 1 shows that nanocapsules presented a similar profile to the drug in methanolic solution. In a period of 4 h, 84% of the drug was released from nanocapsules, while 96% of Keto-free was released in the same period.

Ketoprofen-loaded nanocapsules selectively decreases the GBM cell viability but not in astrocytes

We determine the ketoprofen-loaded nanocapsules (Keto-NC) effect on viability of C6, U138MG and U251MG glioma cells by exposing GBM cell lines to increasing Keto-NC concentrations (1, 10, 50 and 100 μ M) for 48 h and 72 h. Ketoprofen in solution (Keto-free) was used to compare its actions with Keto-NC. At the end of incubations, MTT assay was performed. In parallel, astrocyte cultures were used as a non-transformed cell model in order to evaluate the selectivity of Keto-NC. Control cultures were exposed to equivalent concentration of DMSO (control vehicle) or drug-unloaded nanocapsules (NC). Overall, the treatment of a panel of GBM cell lines with Keto-NC resulted in a decrease of cell viability when compared to controls and to Keto-free solution (Fig. 2). The decrease of C6 cell viability ranged from 40 to 50% after exposition to Keto-NC (10, 50 or 100 μ M) for 48 h and 72 h (Fig. 2A and B). In human U138MG cell line, Keto-NC (50 or 100 μ M) promoted a decrease of cell viability of 40% and 35% following 48 h and 72 h of treatment, respectively (Fig. 2C and D). Finally, Keto-NC at higher concentration (100 μ M) decreased the human U251MG glioma cell viability in 25% and 45% following 48 h and 72 h of treatment, respectively (Fig. 2E and F). The drug-unloaded nanocapsules (NC) did not promoted cytotoxic effect suggesting that the decrease in glioma cell viability may be attributed to Ketoprofen- encapsulated rather than nanoparticle components. Notably, Keto-NC did not promote significant alterations on astrocyte cell growth (Fig. 2G and H). These results suggest that Keto-NC target selectively cancer cells. In addition, the membrane cell permeability was also evaluated by PI incorporation. As show in Figure 3, Keto-NC (50 and 100 μ M) exposure of human U138MG glioma cells for 72 h promoted a decrease in the cell density, significant morphological alterations and PI incorporation at both Keto-NC concentrations. These results

suggest that the anti-proliferative effect of Keto-NC is mediated by necrosis. However, the involvement of other cell death pathways cannot be excluded.

Ketoprofen-loaded nanocapsules inhibits GBM growth *in vivo*

In order to evaluate whether Keto-NC antiproliferative potential *in vitro* could be reproduced *in vivo*, C6 glioma cells were implanted by intracranial injection into adult Wistar rats. The *in vivo* rat glioma model is a useful tool to evaluate the anticancer properties of promising drugs, since the tumor is induced in immune competent animals, thus reproducing the inflammatory microenvironment of GBM¹³. The animals were treated intraperitoneally with 3 mg/Kg/day Keto-NC or Keto-free solution from 5th to the 20th day after glioma implantation. Control groups received equivalent volume of DMSO (vehicle) or drug-unloaded nanocapsule (NC). Twenty days after glioma implantation, rat brains were fixed and the tissue blocks were processed for HE staining. The analysis showed that animals treated with Keto-NC presented in the site of implantation glioma cells with characteristics of a residual tumor. The glioma volume analysis was performed in the animals that exhibited a quantifiable tumor mass, e.g., four of five Ket-NC treated animals. Indeed, Keto-NC treatment promoted a significant reduction in the tumor volume ($13.9 \pm 4.9 \text{ mm}^3$) compared to control ($124.8 \pm 62.6 \text{ mm}^3$), NC ($107.1 \pm 51.7 \text{ mm}^3$) and Keto-free ($67.9 \pm 23.2 \text{ mm}^3$) groups (Fig. 4). Of note, Keto-free treatment exhibited a tendency to reduce the glioma progression. However, the difference was not significantly different. These results suggest that the encapsulation process improve the Ketoprofen delivery to the brain, further increasing its efficacy.

In contrast to control glioma-implanted animals, which exhibited pathological characteristics closer to human GBM, Keto-NC treatment produced gliomas with characteristics related to decreased tumor malignancy. Indeed, Keto-NC treated animals

developed gliomas with reduced coagulative necrosis, intratumoral hemorrhage, lymphocytic infiltration, peritumoral edema, and vascular proliferation (Fig.5 and Table 1). Additionally, it was observed the presence of apoptotic cells in Keto-NC treated glioma-implanted animals (Fig. 5, arrows show apoptotic areas).

Importantly, Keto-NC treatment neither cause mortality and or exert metabolic toxicity as evaluated from determinations of ALT and AST activities (markers of liver damage) and creatinine and urea serum levels (markers of kidney damage) (Table 2). In addition, Keto-NC and Keto-free treatment improve the animal weight when compared to control and NC (Fig. 6).

Ketoprofen-loaded nanocapsules treatment promoted behavioral improvement in glioma-implanted rats.

Cognitive deficits constitute a component of the GBM development and it is recognized as an independent prognostic factor in survival of glioma patients⁴². Therefore the effect of Keto-NC treatment on general behavioral aspects of brain function was also evaluated by exposing the glioma-bearing animals to the open-field paradigm⁴³. The numbers of crossings and rearings were used as measures of exploration and motor activity, while number of grooming and fecal bolus were taken as measures of anxiety (Table 3). The total number of crossings and rearings increased significantly in the Keto-NC treated glioma-bearing group (94.8 ± 3.2 and 44 ± 4.5 , respectively) compared with the control (60.7 ± 15.2 and 22.5 ± 5 , respectively); NC (62.4 ± 15.2 and 31 ± 9.1 , respectively) and Keto-free (72.4 ± 16 and 28.8 ± 5.8 , respectively). No alterations on grooming and fecal bolus number were observed in the groups. These results suggest that Keto-NC treatment improve the exploration and motor activity of glioma-bearing rats, which can be related to decreased malignity of implanted gliomas.

Ketoprofen-loaded nanocapsules treatment modulated the ectonucleotidase activities in lymphocytes from glioma-implanted rats.

In order to evaluate whether Keto-free and Keto-NC treatment affect general aspects of immune response, lymphocytes from glioma-bearing rats were isolated as described in materials and methods and the ectonucleotidase activities were evaluated. Extracellular nucleotides are well known components of immune response and inflammation⁴⁴. Ectonucleotidases, as NTPDase1/CD39 and ADA, have an important role in regulating the extracellular levels of the pro-inflammatory ATP and anti-inflammatory adenosine, thus controlling the lymphocyte responses. The results obtained showed that both Keto-free and Keto-NC treatment altered the ectoenzyme activities in lymphocytes from glioma-bearing rats when compared to controls. As observed in Figure 7, ATP and ADP hydrolysis were significantly increased in lymphocytes from rats treated with Keto-free (2 and 4 times increase for ATP and ADP hydrolysis, respectively) and Keto-NC (1.5 and 2.4 times increase for ATP and ADP hydrolysis, respectively) when compared to controls (Fig. 7A and B). In contrast, Keto-free and Keto-NC significantly decreased 2 and 3.8 times, respectively, ADA activity in lymphocytes from glioma-bearing rats (Fig. 7C).

Discussion

The present work demonstrates a novel function of Keto-NC as an alternative to glioma treatment. First we evaluated the effect of Keto-NC on *in vitro* glioma cell proliferation. We observed that Keto-NC treatment decreased selectively the cell viability of a panel of glioma cell lines, while did not exhibited toxicity to astrocytes. We further demonstrate that the treatment with sub-therapeutic dose of Keto-NC reduced the *in vivo* glioma growth as well as reduced the malignity characteristics of implanted tumors. In addition, Keto-NC treatment improved the weight and the locomotion/exploration behavior of

glioma-bearing rats. Keto-NC treatment neither induced mortality or liver/kidney damage. Finally, Ketoprofen modulated the nucleotide metabolism in peripheral lymphocytes.

Although intense effort to develop effective drugs the GBM therapy remains a challenge². In addition to high glioma proliferation and invasion rates, the BBB represents an obstacle to the majority of antineoplastic agents, restricting the drug delivery to SNC⁴⁵. The application of nanocarriers to drug delivery is a promising strategy to overcome the BBB and to improve the treatment efficiency of brain tumors. Previous studies have shown that NSAIDs exhibit antitumor properties by inhibiting COX and/or by inducing cell death via caspase activation and cell cycle arrest^{20,46}. Here we hypothesize that Ketoprofen in nanocapsule formulation could be more cytotoxic and selective for glioma cells than the Ketoprofen in solution. By comparing similar concentrations of Ketoprofen, we observed that the encapsulated drug was more efficient to decrease glioma cell viability when compared to the drug in solution. Keto-NC treatment also increased the cell membrane permeability, which is an indicative of cell death by necrosis. Importantly, Keto-NC cytotoxicity was selective to gliomas, since astrocyte cell viability was not altered by the treatment. The difference in the sensitivity of different glioma cell lines to Keto-NC and the insensibility to Keto-free solution may be related to an enhanced nanocarrier uptake, genetic mutations profile, membrane permeability, and multidrug resistance mechanisms⁴⁷. These points will be properly addressed in a future study.

Inflammatory microenvironment is thought to support carcinogenesis and *in vivo* tumor angiogenesis¹². Indeed, the overexpression of COXs and LOXs has been related in a variety of tumors, including gliomas⁴⁸, and the application of NSAIDs raised expectations that these agents might be beneficial for cancer prevention and therapy. However, the potential of Ketoprofen to treat gliomas *in vivo* remains poorly investigated, and it has been restricted to some *in vitro* studies^{46,49,50}. Therefore, we evaluated whether Ketoprofen in solution or

nanoencapsuled could exhibit pharmacological activity in an *in vivo* rat glioma model. In according to results obtained in cell culture, Keto-NC was more efficient to reduce *in vivo* glioma growth when compared to Ketoprofen in free solution. Moreover, pathological analysis showed that Keto-NC reduced the malignant characteristic correlated to poor survival and worst prognosis for patients. Among these, of note the presence of apoptotic cells and reduction of inflammatory infiltrates and vascular proliferation. In addition to modulate COX and LOX activities, we speculate that Ketoprofen by inhibiting the recruitment of platelets, neutrophils and lymphocytes may contribute to decrease tumor angiogenesis and progression. Indeed, studies have shown that Ketoprofen exhibits antiplatelet aggregation activity⁵¹ and acts as a potent and specific noncompetitive inhibitor of CXCL8-induced neutrophil chemotaxis⁵². Although the exact role of these cells in cancer progression remains unclear, studies suggest that platelets are essential in the initiation of an immune response and that the interactions between platelets, leukocytes and cancer cells favors angiogenesis and tumor invasion^{53,54}.

In addition to modulate negatively the immune cells recruitment to glioma site, Ketoprofen also altered the extracellular nucleotide metabolism of peripheral lymphocytes. We demonstrated that both treatments with Ketoprofen free or in nanocapsule increased the NTPDase activity and decreased the ADA activity in lymphocytes from glioma-bearing rats. We can suggest that the alteration on nucleotide metabolism pattern promote the ATP degradation, a pro-inflammatory molecule, and favors the increase of adenosine levels, an anti-inflammatory and immunosuppressive molecule. Interestingly, an increase of ADA activity has been reported in patients with lung, ovarian and bladder cancer⁵⁵⁻⁵⁷ and the decrease of ADA has been correlated with tumor regression following chemotherapy⁵⁸. We propose the alterations of the NTPDase and ADA by Ketoprofen can be represent an important mechanism to decrease cancer-related inflammation and might contribute to tumor

growth impairment. Additionally, these findings suggest that the antiinflammatory effects of ketoprofen also could be associated with the modulation of the adenine nucleotide metabolism in lymphocytes in a COX-independent manner.

The poor specificity and the massive toxicity of current chemotherapy-based regimens represent a limitation to cancer treatment⁵⁹. Importantly, Keto-NC promoted neither mortality nor systemic toxicity. Besides, Keto-NC treated animals exhibited a general improvement of health quality parameters, as demonstrated by the improvement of both weight and exploration and motor behavior. Similar to what was seen in this study, polymeric nanostructures also were efficient to reduce the *in vivo* rat glioma growth without promote systemic toxicity^{24,60}. Despite the promising potential, further experiments are necessary to establish a therapeutic dose range and the toxicity of Keto-NC formulation in other tumor animal models.

In conclusion, our data indicate at first time the potential of Ketoprofen-loaded nanocapsules as a therapeutic alternative to glioma treatment. Sub-therapeutic doses of Ketoprofen-NC were efficient to decrease the tumor growth in a pre-clinical model of gliomas, suggesting an improvement in the *in vivo* performance of the nanocapsule formulation. The data reported herein support further studies to test and improve the Keto-NC formulations as a novel therapeutic modality for the treatment of brain tumors in the future.

Acknowledgements

We thank Carolina Perry, Mirian da Silva and Sabrina Pereira for their excellent technical assistance; Dr A.M.O. Battastini for C6 cell line. This study was supported by the Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de

Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS - Processo 10/0286-2). E.F. da Silveira, F.C. Teixeira were recipient of CAPES Master fellowship.

References

1. Stupp R, Hegi ME, Gilbert MR, Chakravarti A. Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. *J Clin Oncol*. 2007; 25: 4127–36.
2. Soffietti R, Leoncini B, Ruda R. New developments in the treatment of malignant gliomas. *Expert Rev Neurother*. 2007; 7: 1313–26.
3. Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis, *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2002; 54: 631–651.
4. Rahman M, Hoh B, Kohler N, Dunbar EM, Murad GJ. The future of glioma treatment: stem cells, nanotechnology and personalized medicine. *Future Oncol*. 2012; 8(9):1149-56.
5. C. Chavany, T. Saison-Behmoaras, T. Le Doan, F. Puisieux, P. Couvreur, C. Helene, Adsorption of oligonucleotides onto polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles protects them against nucleases and increases their cellular uptake. *Pharm. Res*. 1994; 11: 1370–1378.
6. P. Couvreur, P. Tulkens, M. Roland, A. Trouet, P. Speiser, Nanocapsules: a new type of lysosomotropic carrier. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett*. 1977; 84 : 323–326.
7. S. Bennis, C. Chapey, P. Couvreur, J. Robert, Enhanced cytotoxicity of doxorubicin encapsulated in polyisohexylcyanoacrylate nanospheres against multidrug-resistant tumour cells in culture. *Eur. J. Cancer*. 1994; 1: 89–93.
8. A.C. Colin de Verdiere, C. Dubernet, F. Nemati, E. Soma, M. Appel, J. Forte, Reversion of multidrug resistance with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: towards a mechanism of action. *Br. J. Cancer*. 1997; 76: 198–205.

9. Huynh NT, Passirani C, Saulnier P, Benoit JP. Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine. *Int J Pharm.* 2009; 11: 379 (2): 201-9.
10. Jain KK. Nanobiotechnology-based strategies for crossing the blood-brain barrier. *Nanomedicine.* 2012; 7(8):1225-33.
11. Lin, W.W., Karin, M., A. cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest.* 2007; 117(5): 1175-83.
12. Mantovani, A., Inflaming metastasis. *Nature.* 2009; 457 (7225): 36-7.
13. Watters, J.J., Schartner, J.M., Badie, B., Microglial function in brain tumors. *J Neurosci Res.* 2005; 81: 447–55.
14. Nieto-Sampedro M, Valle-Argos B, Gómez-Nicola D, Fernández-Mayoralas A, Nieto-Díaz M. Inhibitors of Glioma Growth that Reveal the Tumour to the Immune System. *Clin Med Insights Oncol.* 2011; 5:265-314.
15. Nogueira L, Ruiz-Ontañón P, Vazquez-Barquero A, Moris F, Fernandez-Luna JL. The_NFκB pathway: a therapeutic target in glioblastoma. *Oncotarget.* 2011; 2(8): 646-53.
16. Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5(4):297–309.
17. Baud V, Karin M. Is NF-kB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov.* 2009; 8:33–40.
18. Zanotto-Filho A, Braganhol E, Edelweiss MI, Behr GA, Zanin R, Schröder R, Simões-Pires A, Battastini AM, Moreira JC. The curry spice curcumin selectively inhibits cancer cells growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma. *J Nutr Biochem.* 2012; 23(6):591-601.

19. Shono T, Tofilon PJ, Bruner JM, Owolabi O, Lang FF. Cyclooxygenase2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. *Cancer Res.* 2001; 61(11):4375-81.
20. Hussain M, Javeed A, Ashraf M, Al-Zaubai N, Stewart A, Mukhtar MM. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, tumour immunity and immunotherapy. *Pharmacol Res.* 2012; Jul; 66(1):7-18.
21. Exploiting cyclooxygenase-(in)dependent properties of COX-2 inhibitors for malignant gliomatherapy. Schönthal AH. *Anticancer Agents Med Chem.* 2010; 10(6):450-61.
22. Bernardi A, Frozza RL, Hoppe JB, Salbego C, Pohlmann AR, Battastini AM, Guterres SS. The antiproliferative effect of indomethacin-loaded lipid-core nanocapsules in glioma cells is mediated by cell cycle regulation, differentiation, and the inhibition of survival pathways. *Int J Nanomedicine.* 2013; 8:711-29.
23. Dovizio M, Bruno A, Tacconelli S, Patrignani P. Mode of action of aspirin as a chemopreventive agent. *Recent Results Cancer Res.* 2013; 191:39-65.
24. Bernardi A, Braganhol E, Jäger E, Figueiró F, Edelweiss MI, Pohlmann AR, Guterres SS, Battastini AM. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. *Cancer Lett.* 2009; 281(1):53-63.
25. Sanz-Motilva V, Martorell-Calatayud A, Nagore E. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and melanoma. *Curr Pharm Des.* 2012; 18(26):3966-78.
26. Li W, Tang YX, Wan L, Cai JH, Zhang J. Effects of combining Taxol and cyclooxygenase inhibitors on the angiogenesis and apoptosis in human ovarian cancer xenografts. *Oncol Lett.* 2013; (3):923-928.

27. Kraus S, Naumov I, Arber N. COX-2 active agents in the chemoprevention of colorectal cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2013; 191:95-103.
28. Del Rosso A, Saldutto P, Di Pierro ED, Masciovecchio S, Galatioto GP, Vicentini C. Impacts of antibiotic and anti-inflammatory therapy on serum prostate specific antigen in asymptomatic men: our experience. *Urologia.* 2012; 79:37-40.
29. Kamei S, Sakayama K, Tamashiro S, Aizawa J, Miyawaki J, Miyazaki T, Yamamoto H, Norimatsu Y, Masuno H. Ketoprofen in topical formulation decreases the matrix metalloproteinase-2 expression and pulmonary metastatic incidence in nude mice with osteosarcoma. *J Orthop Res.* 2009; (7):909-15.
30. Da Frota Jr ML, Braganhol E, Canedo AD, Klamt F, Apel MA, Mothes B, et al. Brazilian marine sponge *Polymastia janeirensis* induces apoptotic cell death in human U138MG glioma cell line, but not in a normal cell culture. *Invest New Drugs.* 2009; 27(1):13–20.
31. Takano T, Lin JH, Arcuino G, Gao K, Yang J, Nedergaard M. Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nature Med.* 2001; 7: 1010–15.
32. Braganhol E, Morrone FB, Bernardi A, Huppes D, Meurer L, Edelweiss MI, Lenz G, Wink MR, Robson SC, Battastini AM. Selective NTPDase2 expression modulates in vivo rat glioma growth. *Cancer Sci.* 2009; 100(8):1434-42.
33. Böyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation.* 1968; 97: 77-89.
34. Leal, D.B.R.; Streher, C.A.; Neu, T.N.; Bittencourt, F.P.; Leal, C.A.M.; Silva, J.E.P.; Morsch, V.M.; Scheringer, M.R.C. Characterization of NTPDase (NTPDase 1: ecto-

- apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; E.C. 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005; 1721: 9-11.
35. Chan, K.; Delfert, D.; Junger, K. D. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} - ATPase activity. *Analytical Biochemistry*. 1986; 157: 375-378.
 36. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72: 248-254.
 37. Giusti, G., Gakis, C. Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues. *Enzyme*. 1971; 12: 417-425.
 38. Schaffazick S.R., Freitas L.L., Pohlmann A.R., Guterres S.S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*. 2003; 25, 726-737.
 39. Mora-Huertas C.E., Fessi H., Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010; 385, 113-142.
 40. Cruz, L., Soares, L.U., Dalla Costa, T., Mezzalira, G., Silveira, N., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006; 313, 198-205.
 41. Quintanar-Guerrero D., Allémann E., Fessi H., Doelker E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1998; 24, 1113-1128.
 42. Taphoorn MJ, Klein M. Cognitive deficits in adult patients with brain tumours. *Lancet Neurol*. 2004; 3:159–168.
 43. Wang YY, Liu SC, Yang Z, Zhang T. Impaired hippocampal synaptic plasticity in C6 glioma-bearing rats. *J Neurooncol*. 2011; 103(3):469-77.

44. Eltzschig HK, Sitkovsky MV, Robson SC. Purinergic signaling during inflammation. *N Engl J Med*. 2012; 367(24):2322-33.
45. Aktas, Y., Andrieux, K., Alonso, M.J., Calvo, P., Gürsoy, R.N., Couvreur, P., Capan, Y. Preparation and in vitro evaluation of chitosan nanoparticles containing a caspase inhibitor. *Int. J. Pharm.* 2005; 298, 378–383.
46. Lee HC, Park IC, Park MJ, An S, Woo SH, Jin HO, Chung HY, Lee SJ, Gwak HS, Hong YJ, Yoo DH, Rhee CH, Hong SI. Sulindac and its metabolites inhibit invasion of glioblastoma cells via down-regulation of Akt/PKB and MMP-2. *J Cell Biochem*. 2005; 94(3):597-610.
47. Lamprecht, A., Benoit, J.P. Etoposide nanocarriers suppress glioma cell growth by intracellular drug delivery and simultaneous P-glycoprotein inhibition. *J. Control. Release*. 2006; 112, 208–213.
48. Zhang L, Zhang WP, Hu H, Wang ML, Sheng WW, Yao HT, Ding W, Chen Z, Wei EQ. Expression patterns of 5-lipoxygenase in human brain with traumatic injury and astrocytoma. *Neuropathology*. 2006; (2):99-106.
49. Wolfe LS, Rostworowski K, Pappius HM. The endogenous biosynthesis of prostaglandins by brain tissue in vitro. *Can J Biochem*. 1976; 54(7):629-40.
50. Gàti I, Bergström M, Westerberg G, Csòka K, Muhr C, Carlsson J. Effects of prostaglandin and leukotriene inhibitors on the growth of human glioma spheroids. *Eur J Cancer*. 1990; 26(7):802-7.
51. Van Solingen RM, Rosenstein ED, Mihailescu G, Drejka ML, Kalia A, Cohen AJ, Kramer N. Comparison of the effects of ketoprofen on platelet function in the presence and absence of aspirin. *Am J Med*. 2001; 111(4):285-9.
52. Allegretti M, Bertini R, Cesta MC, Bizzarri C, Di Bitondo R, Di Cioccio V, Galliera E, Berdini V, Topai A, Zampella G, Russo V, Di Bello N, Nano G, Nicolini L, Locati

- M, Fantucci P, Florio S, Colotta F. 2-Arylpropionic CXC chemokine receptor 1 (CXCR1) ligands as novel noncompetitive CXCL8 inhibitors. *J Med Chem.* 2005; 48(13):4312-31.
53. Chen M, Geng JG. P-selectin mediates adhesion of leukocytes, platelets, and cancer cells in inflammation, thrombosis, and cancer growth and metastasis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2006; 54: 75–84.
54. Sprague DL, Sowa JM, Elzey BD, Ratliff TL. The role of platelet CD154 in the modulation in adaptive immunity. *Immunol Res.* 2007; 39: 185–93.
55. Zanini D, Schmatz R, Pelinson LP, Pimentel VC, da Costa P, Cardoso AM, Martins CC, Schetinger CC, Baldissareli J, do Carmo Araújo M, Oliveira L, Chiesa J, Morsch VM, Leal DB, Schetinger MR. Ectoenzymes and cholinesterase activity and biomarkers of oxidative stress in patients with lung cancer. *Mol Cell Biochem.* 2013; 74(1-2):137-48.
56. Urunsak IF, Gulec UK, Paydas S, Seydaoglu G, Guzel AB, Vardar MA. Adenosine deaminase activity in patients with ovarian neoplasms. *Arch Gynecol Obstet.* 2012; 286(1):155-9.
57. Pirinççi N, Geçit I, Güneş M, Yüksel MB, Kaba M, Tanık S, Demir H, Aslan M. Serum adenosine deaminase, catalase and carbonic anhydrase activities in patients with bladder cancer. *Clinics* . 2012; 67(12):1443-6.
58. Roberts EL, Roberts OT. Plasma adenosine deaminase isoform 2 in cancer patients undergoing chemotherapy. *Br J Biomed Sci.* 2012; 69(1):11-3.
59. C. Vauthier, C. Dubernet, C. Chauvierre, I. Brigger, P. Couvreur, Drug delivery to resistant tumors: the potential of poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles, *J. Control.* 2003; 151–160.

60. Zanotto-Filho A, Coradini K, Braganhol E, Schröder R, de Oliveira CM, Simões-Pires A, Battastini AM, Pohlmann AR, Guterres SS, Forcelini CM, Beck RC, Moreira JC. Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment. *Eur J Pharm Biopharm.*2013, 83: 156–167.

Legend to Figures

Figure 1. *In vitro* Ketoprofen release profiles from methanolic solution (MS) and from nanocapsules (NC) using the dialysis bag method.

Figure 2. Comparative cytotoxicity of Ketoprofen in solution and Ketoprofen-loaded nanocapsules against C6, U138MG, U251MG glioma cells and primary astrocytes. Time-course effect of different concentrations of Ketoprofen in solution and Ketoprofen-loaded nanocapsules on (A, B) C6; (C, D) U138MG; (E, F) U251MG; (G, H) primary astrocytes cell viability at 48 h (left panel) and 72 h (right panel). Legends: C (DMSO); Keto-free (Ketoprofen dissolved in DMSO); NC (drug-unloaded nanocapsules); Keto-NC (ketoprofen-loaded nanocapsules). The values represent the mean $\pm$ SD of at least three independent experiments carried out in triplicate. Data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc comparisons (Tukey-Kramer test). *Significantly different from Control or NC treated cells ($P < 0.05$).

Figure 3. Propidium iodide incorporation in U138MG glioma cells following Ketoprofen in solution and Ketoprofen-loaded nanocapsules treatment. Cell cultures were exposed to Keto-free or Keto-NC (50 or 100 μ M) and after 72 h of treatment the cells were incubated with PI diluted in culture medium. Legends: Control cultures were exposed to DMSO (Control) or drug-unloaded nanocapsules (Control-NC). Fluorescence (right panel) and phase contrast (left panel) microphotographs were taken using an Olympus inverted microscope (20x magnification).

Figure 4. Antiglioma activity of Ketoprofen-loaded nanocapsules treatment against C6 gliomas *in vivo*. Animals were treated as described in Material and methods. Tumor size was

measured 20 days after implantation of C6 cells by three hematoxylin and eosin (HE) sections of each tumor. For tumor size quantification, images were captured using a digital camera connected to a microscope and total volume (mm^3) was determined using Image Tool SoftwareTM. Tumor size quantification of implanted gliomas. Legends: C (DMSO); NC (drug-unloaded nanocapsules); Keto (Ketoprofen dissolved in DMSO); Keto-NC (ketoprofen-loaded nanocapsules). The values represent the mean $\pm$ SD of at least four animals per group. Data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc comparisons (Tukey's test). **Significantly different from the C, NC and Keto groups ($P < 0.01$).

Figure 5. Histological analysis of implanted gliomas. The sections of implanted rat glioma were stained with hematoxylin and eosin (HE), as described in Material and Methods. Representative pictures of histological characteristics that define glioblastoma multiform, as seen in rats implanted with gliomas and treated with unloaded-drug nanocapsule (NC - upper panel) or treated with Ketoprofen-loaded nanocapsules (Keto-NC - down panel). Necrosis (N), microvascular proliferation (V), edema (E), Hemorrhage (H), immune cell infiltrate (IC) and apoptotic cells (arrows) were observed. (20x magnification - left panel; 40x magnification - right panel).

Figure 6. Body weight of animals with implanted gliomas. Animals were treated as described in Material and Methods. Weights were observed each three days. Legends: C (DMSO); NC (drug-unloaded nanocapsules); Keto (Ketoprofen dissolved in DMSO); Keto-NC (ketoprofen-loaded nanocapsules). The values represent the mean $\pm$ SD of at least four animals per group. Data were analyzed by Repeated Measures Analysis of Variance. *Significantly different from the C and NC groups ($P < 0.01$).

Figure 7. NTPDase activity using ATP (A) and ADP (B) as substrates and ADA activity (B) in lymphocytes the rats with brain glioma and treated with ketoprofen. Legends: C (DMSO), NC (drug-unloaded nanocapsules); Keto (Ketoprofen dissolved in DMSO); Keto-NC (ketoprofen-loaded nanocapsules). The values represent the mean $\pm$ SD of at least four animals per group. Data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc comparisons (Tukey's test). *, **Significantly different from the C and NC ($P < 0.05$ or $P < 0.01$, respectively).

Figure 1

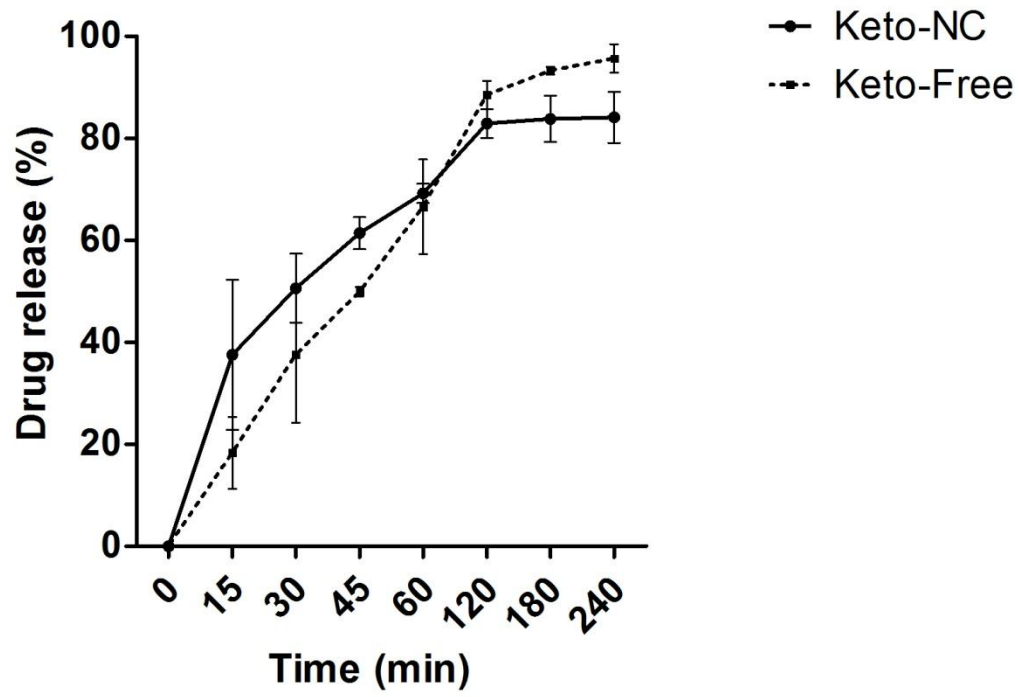


Figure 2

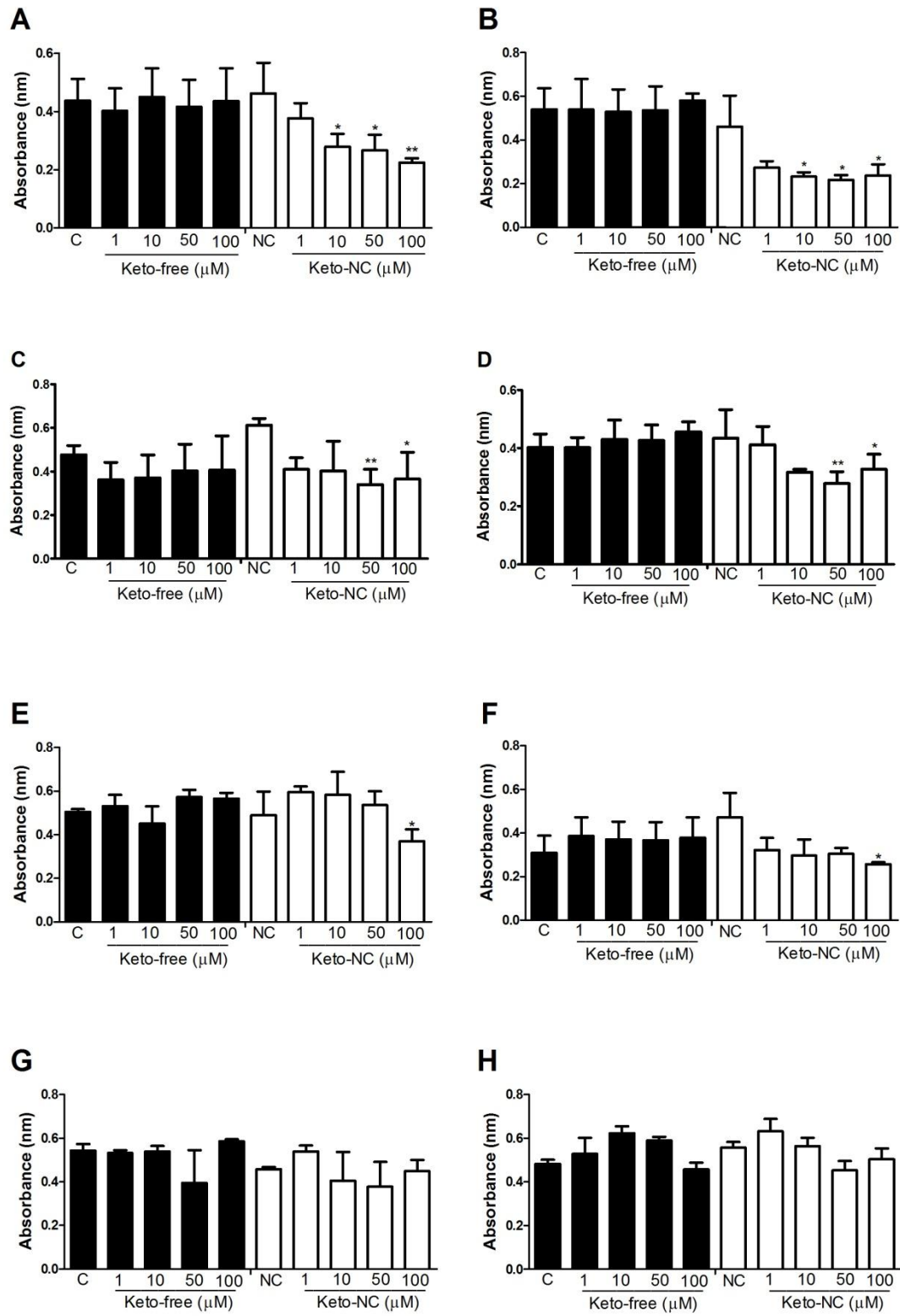


Figure 3

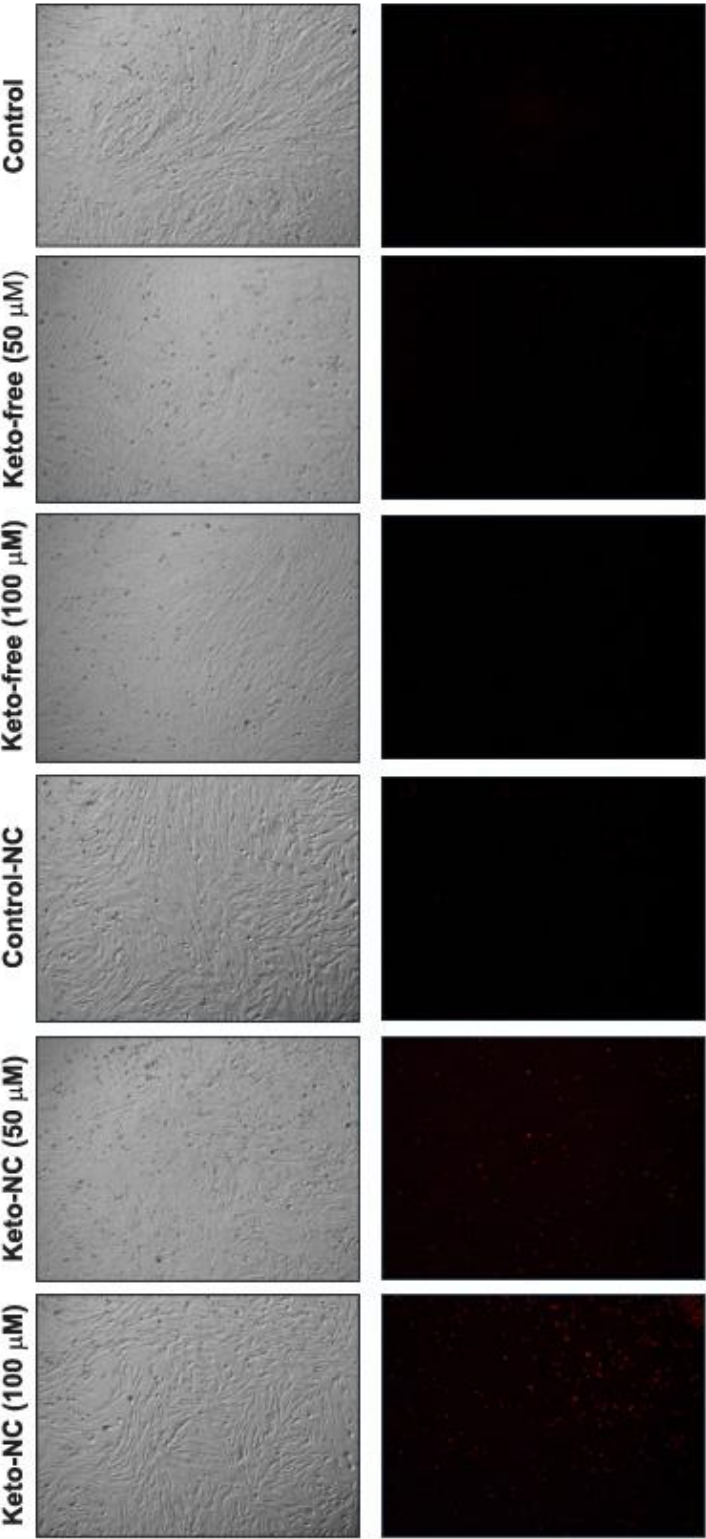


Figure 4

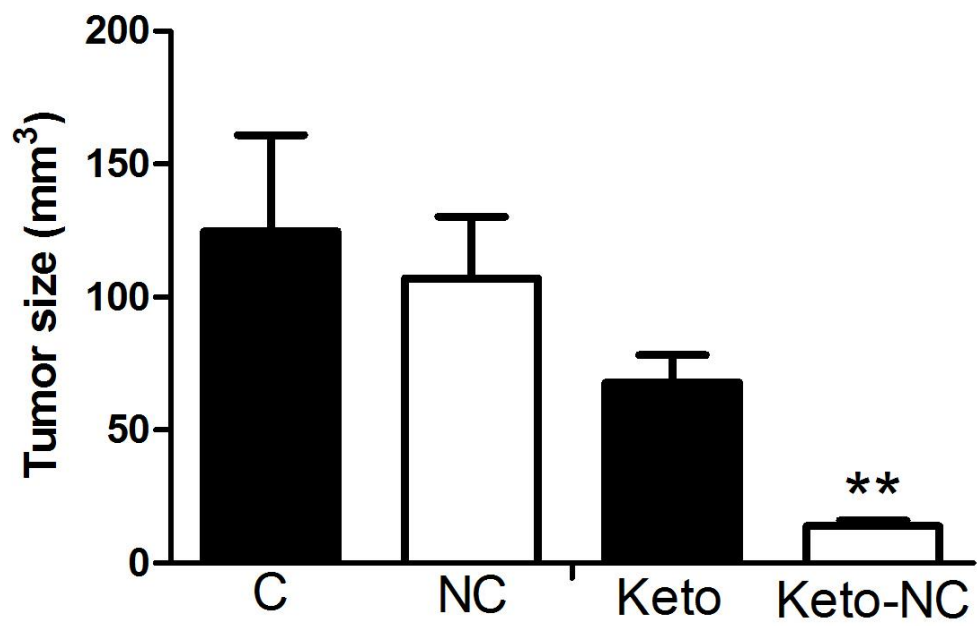


Figure 5

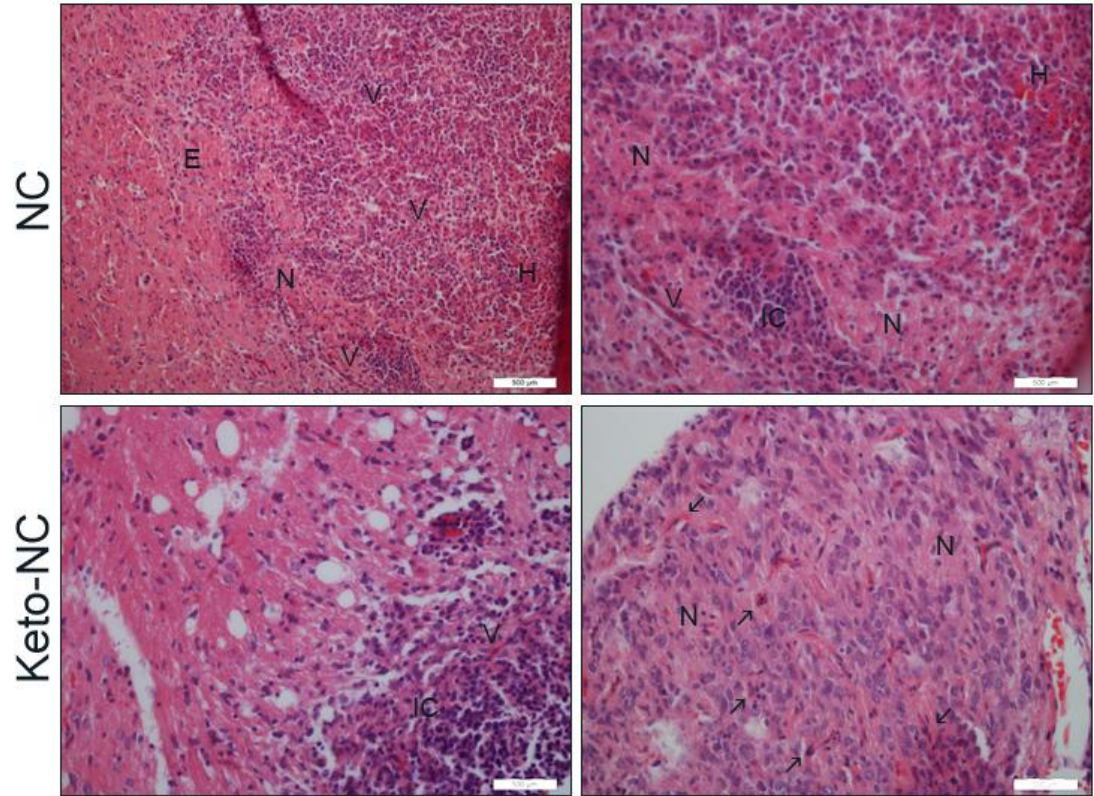


Figure 6

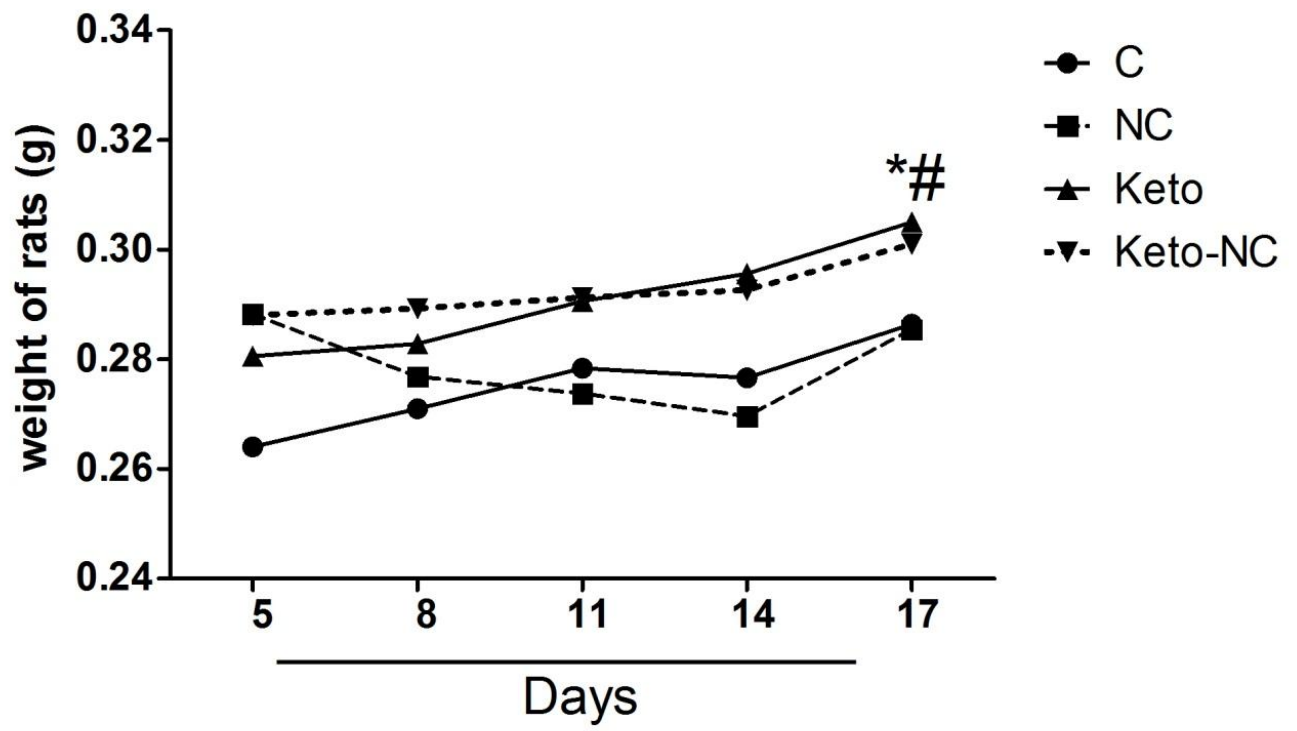


Figure 7

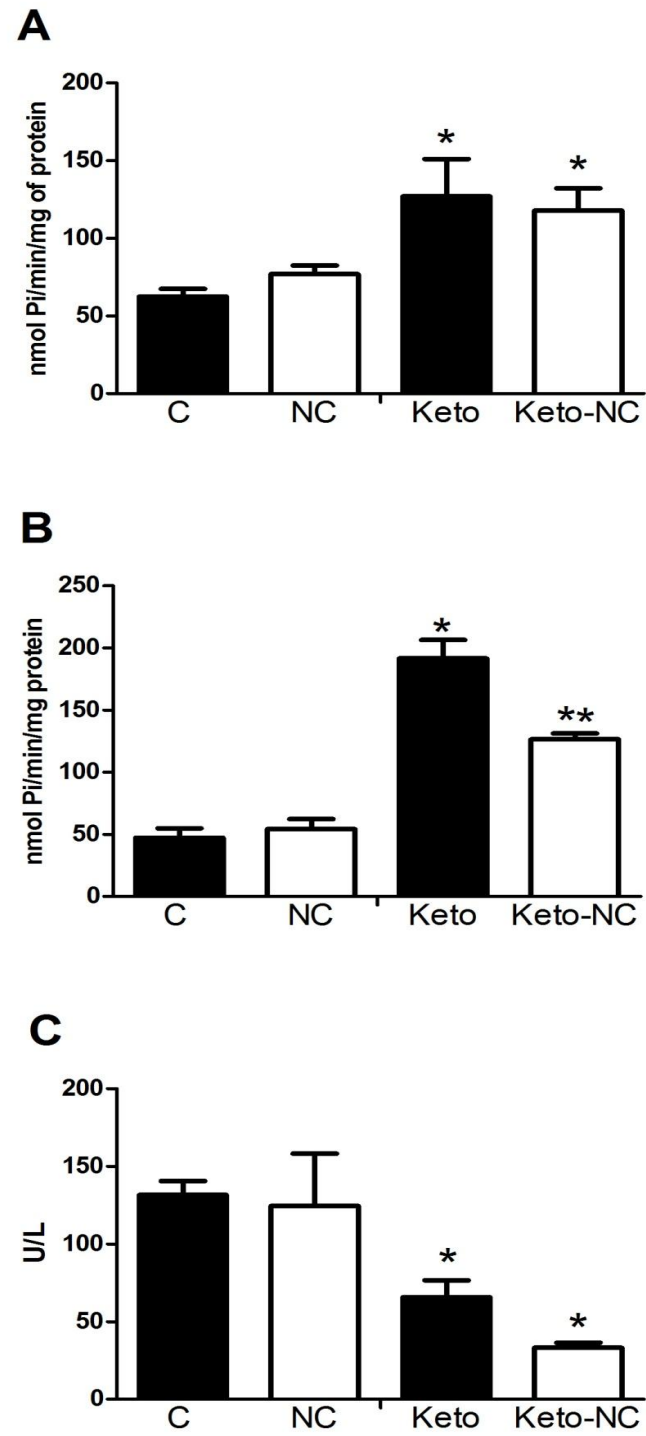


Table 1. Histological characteristics of implanted gliomas.

	Control (n=5)	NC (n=5)	Keto-free (n=5)	Keto-NC (n=4)
Coagulative Necrosis	4/5	3/5	3/5	1/4
Intratumoral hemorrhage	3/5	3/5	2/5	0/4
Lymphocytic infiltration	5/5	4/5	3/5	1/4
Peritumoral edema	5/5	4/5	4/5	1/4
Vascular Proliferation	5/5	5/5	3/5	0/4

Five days after glioma implantation, the animals were divided in four groups and treated for 15 days as follow: Control (DMSO-treated); NC (drug-unloaded nanocapsules); Keto-free (3 mg/Kg/day of Ketoprofen); Keto-NC (3 mg/Kg/day of ketoprofen-loaded nanocapsules). The histological variables (coagulative necrosis, intratumoral hemorrhage, lymphocytic infiltration, peritumoral edema and vascular proliferation) were regarded as present or absent.

Table 2. Tissue damage serum markers in control or treated C6 implanted rats.

	Control (n=5)	NC (n=5)	Keto-free (n=5)	Keto-NC (n=4)
AST (U/L)	200.8 ± 53.9	197.2 ± 59.3	196.2 ± 50.1	206.4 ± 40.3
ALT (U/L)	61.4 ± 8.6	83.2 ± 17.4	78.5 ± 13.2	74.8 ± 24.6
Urea (mg/dL)	53.5 ± 5.2	48.9 ± 3.6	50 ± 4.1	50.2 ± 5.3
Creatinine (mg/dL)	0.5 ± 0.08	0.5 ± 0.05	0.6 ± 0.04	0.5 ± 0.05

Five days after glioma implantation, the animals were divided in four groups and treated for 15 days as follow: Control (DMSO-treated); NC (drug-unloaded nanocapsules); Keto-free (3 mg/Kg/day of Ketoprofen); Keto-NC (3 mg/Kg/day of ketoprofen-loaded nanocapsules). Tissue damage serum markers were evaluated in a LabMax 240 Analyzer using commercial kits. The values represent the mean ± SD. Data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc comparisons (Tukey's test).

Table 3. Behavioral analysis in control or treated C6 implanted rats.

	Control	NC	Keto-free	Keto-NC
Crossings	60.7 ± 15.2	62.4 ± 15.2	72.4 ± 16.0	94.8 ± 3.2*
Rearing	22.5 ± 5.0	31 ± 9.1	28.8 ± 5.8	44 ± 4.5**
Grooming	0.8 ± 0.8	0.4 ± 0.8	0.4 ± 0.5	0.4 ± 0.5
Fecal bolus	4.0 ± 3.3	4.6 ± 1.1	3.0 ± 1.4	1.4 ± 1.6

Five days after glioma implantation, the animals were divided in four groups and treated for 15 days as follow: Control (DMSO-treated); NC (drug-unloaded nanocapsules); Keto-free (treated with 3 mg/Kg/day of Ketoprofen); Keto-NC (3 mg/Kg/day of ketoprofen-loaded nanocapsules). Behavior analysis was performed in the open field after 19 days of glioma implantation. The values represent the mean ± SD. Data were analyzed by ANOVA followed by post-hoc comparisons (Tukey's test). *Significantly different from the control, NC and Keto-free groups ($p < 0.05$).

5. Conclusões

Nossos resultados sugerem uma nova possibilidade de aplicação terapêutica para o cetoprofeno, fármaco amplamente utilizado com finalidade anti-inflamatória, em formulações de nanocápsulas pode contribuir no tratamento adjuvante de gliomas. As nanocápsulas de cetoprofeno, diferente do cetoprofeno na sua forma livre, *in vitro* foram capazes de diminuir a viabilidade e proliferação de diferentes linhagens celulares. As mesmas, *in vivo*, possivelmente foram capazes de vetorizar o cetoprofeno ao cérebro, reduzindo o volume do tumor e suas características de malignidade.

Sabendo que a presença de um microambiente inflamatório e a secreção de citocinas podem vir a modular a resposta imune e assim contribuir para o elevado grau de malignidade dos gliomas, acreditamos que o cetoprofeno em formulações de nanocápsulas possivelmente controla esse processo inflamatório, fazendo com que ocorra uma diminuição do recrutamento de células imune para o local da injúria, diminuindo a interação entre tumor- células imunes- vasos sanguíneos e o consequente controle desta modulação.

A COX-2 está envolvida na regulação de proliferação e diferenciação celular e na tumorigênese e sabe-se que em gliomas o aumento da expressão dessa enzima está diretamente relacionado à gliomas de maior grau de malignidade e pior prognóstico, assim o cetoprofeno sendo um inibidor da COX pode estar controlando o processo inflamatório e contribuindo para o controle dessa proliferação e para uma redução tumoral.

Na avaliação da atividade das ectonucleotidases em linfócitos de ratos, nos animais tratados com cetoprofeno na sua forma livre e em formulações de nanocápsulas, verificamos o aumento da hidrólise de ATP e ADP, enquanto que a atividade da enzima adenosina deaminase diminuiu o que sugere uma maior concentração de adenosina. Sendo essa molécula imunossupressora, acreditamos que ela pode estar envolvida na diminuição da ativação de linfócitos, controlando assim o processo inflamatório e prótumoral.

As formulações de cetoprofeno em nanocápsulas foram seletivas para as células tumorais como evidenciado pela ausência de toxicidade sobre culturas primárias de astrócitos de ratos e também não causaram dano sistêmico como

verificado através da avaliação de marcadores bioquímicos como ALT – AST, creatinina e uréia que não mostraram injúria hepática e renal.

Através do teste comportamental de campo aberto, foi observado que os animais tratados com cetoprofeno em formulações de nanocápsulas quando submetidos aos testes, apresentaram comportamentos como locomoção (número de linhas cruzadas no chão da arena pelo animal) e frequência de rearings, significativamente maior que os animais dos demais grupos. Esses dados somam aos demais, demonstrando que os animais submetidos ao tratamento com cetoprofeno em formulações de nanocápsulas não apresentaram declínio da atividade locomotora.

6. Bibliografia

Abbracchio, M.P., et al. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 1, p. 19-29, 2009.

Andrade C.A.S., Correia M.T.S., Coelho L.C., Nascimento S.L., Santos-Magalhaes N.S. Antitumor activity of Cratylia mollis lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, 278, p. 435–445, 2004.

Bardot V, Dutrillaux AM, Delattre JY et al. Purine and pyrimidine metabolism in human gliomas: relation to chromosomal aberrations. **British Journal of Cancer**, 70, p. 212-218, 1994.

Béduneau, A.; Saulnier, P.; Benoit, J.P. Active targeting of brain tumors using nanocarriers. **Biomaterials**, v. 28, p. 4947-4967, 2007.

Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, Delattre JY. Primary brain tumours in adults. **Lancet**, 361, p. 323-331, 2003.

Bodin, P., and Burnstock, G. Purinergic signalling: ATP release. **Neurochemistry**, Res. 26, p. 959–969, 2001.

Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, 112 (2), p. 358-404, 2006.

Braganhol E, Morrone F.B, Bernardi A. et al., "Selective NTPDase2 expression modulates in vivo rat glioma growth," **Cancer Science**, vol. 100, n. 8, p. 1434–1442, 2009.

Broder GM, Seeger RC, Schwab M, et al. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. **Science**; 224: p. 1121-4, 1984.

Burnstock, G. Purinergic Nerves. **Pharmacological Reviews**, v. 24, n. 3, p. 509-581, 1972.

Burnstock G. Purinergic signalling--an overview. **Novartis Found Symp**, 276, p. 26-48, 2006.

Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiological Reviews**, 87 (2), p. 659-797, 2007.

Burnstock G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. **Nature Reviews Drug Discovery**, 7 (7), p. 575-590, 2008.

Burnstock G. Purinergic signalling: past, present and future. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 42, p. 3-8, 2009.

Burnstock, G. Purines and sensory nerves. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 194, p. 333-92, 2009b.

Buttgereit F, Burmester G.R., Simon L.S. - Gastrointestinal toxic side effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs and cyclooxygenase II specific inhibitors. **American Journal of Medicine**, v. 110, p. 13-19, 2001.

Butowski NA, Sneed PK, Chang SM. Diagnosis and treatment of recurrent highgrade astrocytoma. **Journal of Clinical Oncology**, 24 (8), p. 1273-1280, 2006.

Canbolat O., Durak I., Cetin R., Kavutcu M., Demirci S., Ozturk S., Activies of adenosine deaminase, 5'- nucleotidase, guanase and cytidine deaminase enzymes in cancerous an non-cancerous human breast tissues. **Breast Cancer Reviews**, treat 37, p. 189-93,1996.

Chan, C.C., Boyce, S., Brideau, C., Charleson, S., Cromlish, W., Ethier, D., Evans, J., Ford-Hutchinson, A.W., Forrest, M.J., Gauthier, Y., Gordon, R., Gresser, M., Guay, J., Kargman,S., Kennedy, B., Leblanc, Y., Leger, S., Mancici, J., O'Neill, G.P., Ouellet, M., Patrick, D., Percival, M.D., Perrier, H., Prasit, P., Rodger, I., Tagari, P., Therien, M., Vickers, P., Visco, D., Wang, Z., Webb, J., Wong, E., Xu, L.J., Young, R.N., Zamboni, R., Riendeau, D. J Pharmacol Exp Ther, v.290, n.2, p.551-560. Dai C, Holland E. Glioma models. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1551, p. 19-27, 1999.

Cotran, R. S, Kumar, V., Collins, T. Patologia Estrutural e Funcional. 6ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000.

Cotran, R.S.; Kumar, V.; Collins, T. Patologia Estrutural e Funcional. 7ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006.

Couver, P.; Barrat, G.; Fattal, E.; Legrand, P.; Vauthier, C. Nanocapsule technology: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 19, p. 99-134, 2002.

Da Fonseca, C.O.; Linden, R.; Futuro, D.; Gattas, C.R.; Quirico-Santos, T. Ras pathway activation in gliomas: a strategic target for intranasal administration of perillyl alcohol Arch. **Immunology Ther**, v. 56, p. 267–276, 2008.

Dora C.L., Silva L.F.C., Tagliari M., Silva M.S., Formulation study of Quercetin-loaded lipid-based nanocarriers obtained by hot solvent diffusion method. **Latin American Journal of Pharmacy**, v 30 (2), p. 289-96, 2011.

Dos Santos, R.M.M.; Fialbo, S.L. Nanopartículas: Uma alternativa para a administração de biofármacos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 37, 2008.

Dunn, G. P.; Dunn, I. F.; Curry, W. T. Focus on TILs; Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human glioma. **Cancer Immunity**, 7, p. 12-28, 2007.

Dunwiddie, T., e MASINO, S. The Role and Regulation of Adenosine in the Central Nervous System. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p. 31-55, 2001.

Elssner A, Duncan M, Gavrillin M, Wewers MD. A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release. **Journal Immunological**, v. 172 (8), p. 4987-4994, 2004.

Fernandes, E., Toste, S. A., Lima, J. L. F. C, Reis, S. The metabolism of sulindac enhances its scavenging activity against reactive oxygen and nitrogen species. **Free Radical Biology & Medicine**, v 35, p. 1008-1017, 2003.

França, F. F. de A. C. DE; Korolkovas, A. Dicionário Terapêutico Guanabara. Edição 2006/2007. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

Franco, G.C.N., Moretti, D., Cavalcante, P.F.C., Lopes, L.C. Uma análise crítica sobre viabilidade do uso dos inibidores seletivos de COX II em odontologia. **Rev. de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 18, n.1, p.75-81, 2006.

Franco, R. Neurotransmitter receptor heteromers in neurodegenerative diseases and neural plasticity. **Journal of Neural Transmission**, v. 116, n. 8, p. 983-7, 2009.

Garcia-Garcia, E.; Andrieux, K.; Gil, S.; Couvreur, P. Colloidal carriers and blood-brain (BBB) translocation: A way to deliver drugs to the brain?. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 298, p. 274-292, 2005.

Giamarellos-Bourboulisa, E. J., Tzivras, M., Kourtesas, D., Arnaoutis, T. P., Delladatsima, I., Dionyssiou-Asteriou, A., Davaris, P., Vafiadis-Zouboulis, I., Archimandritis, A. Lipid peroxidation in chronic gastritis; any influence of Helicobacter pylori? Prostaglandins Leukot. **Essential Fatty Acids**, v. 68, p. 257-261, 2003.

Gilman, A.G.; Goodman, L.S.; Rall, T.W.; Murad, F. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11a ed. Rio de Janeiro: Grow-Hill, 2006.

Guerra AN, Fisette PL, Pfeiffer ZA, Quinchia-Rios BH, Prabhu U, Aga M, Denlinger LC, Guadarrama AG, Abozeid S, Sommer JA, Proctor RA, Bertics PJ. Purinergic receptor regulation of LPS-induced signaling and pathophysiology. **Journal of Endotoxin**, v. 9, n. 4, p. 256-263, 2003.

Haskó G, Csóka B, Németh ZH, Vizi ES, Pacher P. A(2B) adenosine receptors in immunity and inflammation. **Trends Immunology**, v. 30, n. 6, p. 263-270, 2009.

Hazewinkel, H.A.W., Van Den Brom, W.E., Theyse, L.F.H., Pollmeier, M., Hanson, P.D. Comparison of the effects of firocoxib, carprofen and vedaprofen in a sodium urate crystal induced synovitis model of arthritis in dogs. **Research in Veterinary Science**, v.84, p.74-79, 2008.

Huncharek M, Muscat J. Treatment of recurrent high grade astrocytoma; results of a systematic review of 1,415 patients. **Anticancer Res**, v. 18, n. 2b, p. 1303-1311, 1998.

Hwang D, Scollard D, Byerne J, Levine J. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. **Journal of the National cancer institute**, v. 90, p. 455-460, 1998.

Kanu O.O., Hughes B., Di C., Lin N., Fu J., Bigner D.D., Yan H., Adamson C. .Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. **Clinical Medicine Oncology**, v. 3, p. 39-52, 2009.

Katzung, B.G. Farmacologia básica e clínica. 9a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

Kazufumi S., Hisahiro M. (2011). Recent Advances in p53 Research and Cancer Treatment. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 1-7, 2011.

Kim E.O., Kim H.J., Eom K.S., Cho B.S., Lee S.E., Yahng S.A., Lee J.W., Min W.S. Second Primary Glioblastoma Multiforme Following Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation in a Patient with Acute Myelogenous Leukemia. **Cancer treatment and research**, v. 43, p. 195-198, 2011.

Konopka G, Bonni A . Signaling pathways regulating gliomagenesis. **Current Molecualr Medicine**, v. 3, p. 73-84, 2003.

Kontogiorgis, C.A.; Hadjipavlou-litina, D.J. Non steroidal anti inflammatory and anti-allergy agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 89-98, 2002.

Kummer, C.L. & Coelho, T.C.R.B. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase II (COX II): aspectos atuais. **Revista Brasileira Anestesiologia**, v. 5, n. 4, 2002.

la Sala A, Ferrari D, Di Virgilio F, Idzko M, Norgauer J, Girolomoni G. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n.3, p. 339-343, 2003.

Langer, R. Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: One laboratory's experience, Acc. **Chemical Research**, v. 33, p. 94–101, 2000.

Langston HP, Ke Y, Gewirtz AT, Dombrowski KE, Kapp JA. Secretion of IL-2 and IFN-gamma, but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. **Journal Immunology**, v. 170, n.6, p. 2962-2970, 2003.

Latini S & Pedata F. (2001). Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. **Journal Neurochemistry**, v. 49, p. 463-484.

Lazarowski ER, Shea DA, Boucher RC, and Harden TK. Release of cellular UDP-glucose as a potential extracellular signaling molecule. **Molecular Pharmacology**, v. 63, p. 1190–1197, 2003.

Lipski, P.E. Unresolved issues in the role of cyclooxygenase II in normal physiologic processes and diseases. **Archives of Internal Medicine**, v.160, p.913-920, 2000.

Lockmam, P.R.; Kosiara, J.M.; Mumper, R.J.; Allem, D.D. Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability, **Journal of Drug Targeting**. v. 12, p. 635-641, 2004.

Lu, W.L., Zhang, Q., Zheng, L., Wang, H, Yu-Li, R., Feng-Zhang, L., Binshen, W., de-tu, X. Antipyretic, analgesic and anti-inflammatory activities of ketoprofen β -Cyclodextrin inclusion complexes in animals. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.27, n.10, p.1515-1520, 2004.

Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. **Lancet**, v.369 (9579) p. 2106-20, 2007.

Marone, R., Cmiljanovic, V., Giese, B. & Wymann, M.P. Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. **Biochimica & Biophysica Acta**, 1784, p. 159-185, 2008.

Maher CO, Raffel C. Neurosurgical treatment of brain tumors in children. **Pediatric Clinics North America**, v.51, n.2, p. 327-357, 2004.

Makhlof A., Fujimoto S., Tozuka Y., Takeuchi H. In vitro and in vivo evaluation of WGA–carbopol modified liposomes as carriers for oral peptide delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, p. 216–224, 2011.

Muller- Decker K, Reinerth G, Krieg P, Zimmermann R, Heise H, Bayerl C, Marks F, Furstenberger G. Prostaglandin-H- Synthase isozyme expression in normal and neoplastic human skin. **Journal International of Cancer**, v. 82, p. 648 – 656, 1999.

Nagarajan R.P., Costello J.F. Epigenetic mechanisms in glioblastoma multiforme. **Seminars in Cancer Biology**, v. 19, p. 188-197, 2009.

Odashima M, Otaka M, Jin M, Komatsu K, Wada I, Matsushashi T, Horikawa Y, Hatakeyama N, Oyake J, Ohba R, Linden J, Watanabe S. Selective adenosine186 A receptor agonist, ATL-146e, attenuates stress-induced gastric lesions in rats. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 20, n.2, p. 275-280, 2005.

Ohgaki H., Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. **Acta Neuropathol (Berl)**, v.109, p. 93-108, 2005.

Park, K. Transport across the blood–brain barrier using albumin nanoparticles, **Journal Control**, v. 137, p. 1, 2009.

Preusser M., Haberler C., Hainfellner J.A., Wien. Med. Wochenschr. 156. Malignant glioma: neuropathology and neurobiology. **Wien Med Wochenschr**, v. 156, p. 332-337, 2006.

Quintanar Guerreiro, D.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, p. 1113-1128, 1998.

Ralevic, V; Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol Rev**, v. 50, p. 413-492, 1998.

Robbins; Cotran. Patologia - Bases Patológicas das Doenças. 7 ed., **Elsevier – Campus**, 2005.

Robins, I. H.; Chang, S.; Butowski, N.; Mehta, M. Therapeutic Advance for Glioblastoma Multiforme: Current Status and Future Prospects. **Current Oncology**, v. 9, p. 66-70, 2007.

Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signal**, v.2, n.2, p. 409-430, 2006.

Roy, P., Kalra, N., Prasad, S., George, J. & Shukla, Y. (2009). Chemopreventive potential of resveratrol in mouse skin tumors through regulation of mitochondrial and PI3K/AKT signaling pathways. **Pharmacology Res**, v. 26, p. 211-217, 2009.

Sadej R, Spychala J, Skladanowski C. Expression of ecto-5'-nucleotidase (eN,CD73) in cell lines from various stages of human melanoma. **Melanoma Re**, v. 16, p. 213–222, 2006.

Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and the origin of gliomas. **New England Journal of Med**, p. 353:811, 2005.

Sitkovsky MV, Ohta A. The 'danger' sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors? **Trends Immunology**, v. 26, n.6, p. 299-304, 2005.

Shirahama T. Cyclooxygenase- 2 expression is up- regulated in transitional cell carcinoma and its preneoplastic lesions in the human urinary bladder. **Clinical cancer**, v. 6, p. 2424-2430, 2000.

Shono T, Tofilon J, Bruner M, Owolabi O, Lang F. Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. **Cancer Res**, v. 61, p. 4375- 4381, 2001.

Soppimath, K.S.; Aminabhavi, T.M.; Kulkarni, A.R.; Rudzinski, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal Control Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

Spinosa, H.S., Górnaiak, S.L., Bernardi, M.M. Farmacologia aplicada a Medicina Veterinária. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 239-272, 2006.

Spychala J. Tumor- promoting functions of adenosine. **Pharmacol**, v. 87, 161-73, 2000.

Steagall, P.V.M., Moutinho, F.Q., Matovani,F.B., Passareli, D., Thomassian, A. Evaluation of the adverse effects of subcutaneous carprofen over six days in healthy cats. Research in Veterinary Science, v.86, p.115-120, 2009. Stieber VW. Low-grade gliomas. **Current Treatment Options in Oncol**, v. 2, p. 495-506, 2001.

Stewart AG, Harris T. Adenosine inhibits platelet-activating factor, but not tumour necrosis factor-alpha-induced priming of human neutrophils. **Immunology**, v. 78, n.1, p. 152-158, 1993.

Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW. Aspirin use and reduced risk of afaal colon cancer. **Nwe England Journal of Medicine**, v. 325, p. 1593- 1596, 1991.

Torchilin, V.P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging, **AAPS Journal**, v. 9, p. 128–147, 2007.

Viana, F.B. Guia Terapêutico Veterinário. 2a ed. Minas Gerais: Editora CEM, 2007. 464p.

Vredenburgh J.J., Desjardins, A., Reardon, D.A., Friedman, H.S. Experience with irinotecan for the treatment of malignant glioma. **Journal of Neuro-oncol**, v. 11, p. 80-89, 2009.

Wang L, Zhou X, Zhou T et al. Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. **J. Cancer Res. Clin. Oncol**, v. 134, p. 365–372, 2008.

Wink MR, Lenz G, Braganhol E, Tamajusuku AS, Schwartzmann G, Sarkis JJ, Battastini AM. Altered extracellular ATP, ADP and AMP catabolism in glioma cell lines. **Cancer Letters**, v. 198, n.2, p. 211-218, 2003.

White N, Burnstock G (2006). P2 receptors and cancer. **Trends Pharmacology Science**, v. 27, n.4, p. 211-217.

Yin, L. T.; Fu, Y. J.; Xu, Q. L.; Yang. J.; Liu, Z. L.; Liang, A. H.; Fan, X. J.;et al. Potential biochemical therapy of glioma cancer. **Biochemical and Biophysical**, v. 362, p. 225-229, 2007.

Yegutkin,G.G. Nucleotide and nucleoside- converting ectoenzymes : important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et biophysica acta**, 1783 v.5, p. 673-694, 2008.

Yuan, Y.; Li, S.; Mo, F.; Zhong, D. Investigation of microemulsion system for transdermal delivery of meloxicam. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 321, p. 117- 123, 2006.

Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. **Cell**,v. 137, p. 413-431, 2009.

Zhang X, Mosser DM. Macrophage activation by endogenous danger signals. **Journal of Pathology**, v.214, p. 61-178, 2008.

Zimmermann H. Ectonucleotidases: some developments and a note on nomenclature. **Drug Development Res**, v. 52, p. 44-56, 2001.